



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

"SÍNTESIS DE DERIVADOS DE LA PROGESTERONA CON UN  
SUSTITUYENTE EN C-16 COMO ANTIANDROGENOS"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

**DIANA MONTES CHAVEZ**



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

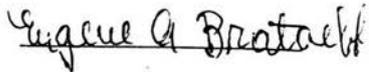
Presidente: Eugene Athanas Bratoeff Titeff  
Vocal: Armando Cabrera Ortiz  
Secretario: María del Rayo Salinas Vázquez  
1er. Suplente: Federico Jesús Jiménez Cruz  
2do. Suplente: Georgina Artemisa Duarte Lisci

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Departamento de Farmacia. Edificio E. Lab-125  
División de Estudios de Posgrado  
Facultad de Química, U.N.A.M.

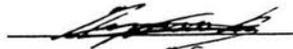
**ASESOR:**

Dr. Eugene A. Bratoeff Titeff



**SUPERVISOR TÉCNICO:**

Dra. Elena G. Ramírez López



**SUSTENTANTE:**

Diana Montes Chávez



## AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y hacer realidad mi sueño.

A la Facultad de Química por darme todos los elementos necesarios para llegar a ser Q.F.B.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA) que a través del proyecto IN- 2000301, otorgaron el soporte financiero para el desarrollo de éste trabajo.

A la USAI por el apoyo que me brindaron para la caracterización de los compuestos

Al Dr. Bratoeff por toda la paciencia que me tuvo, por tener siempre una sonrisa, por sus pláticas tan agradables a la hora de la comida, por darme la oportunidad de trabajar con él y compartirme sus conocimientos.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios, correcciones y sugerencias.

A la UAM Xochimilco y a la Dra. Marisa Cabeza, por otorgarme los elementos necesarios para la realización de las pruebas biológicas.

**A Jair y Yibrant**

**Con mucho amor por ser el tesoro más grande que tengo.**

### **Dedicatorias:**

A Dios, a la Virgen y a la vida por permitirme llegar a este día.

A mis padres **Ismael** y **Atagracia** por darme la vida, por darme siempre lo mejor, por sus sabios consejos, por sus regaños merecidos, por brindarme su amor y su apoyo en todo momento, por ser un gran ejemplo, porque los quiero muchísimo, por ser lo que soy y porque sin ellos no estaría viviendo éste momento.

A mis hijos **Jair** y **Yibrant** por permitirme vivir la gran experiencia de ser mamá, por sus sonrisas, sus caricias, su amor, por darle alegría a mi vida y por ser el motivo más grande que tengo para seguir adelante.

A mi esposo **Eduardo** por ser mi compañero, mi amigo, mi confidente, por saberme escuchar y motivar, por ser el papá de mis hijos, por su apoyo, por que lo amo y porque está a mi lado a pesar de todo.

A mis hermanos **Liz** y **Ricky** porque los quiero mucho, por todos los momentos bonitos, por soportarme cuando me enojo y a **Ricky** por hacerme reír todos los días.

A mis tías **Tere**, **Rosi** y **Michell** por sus consejos, sus oraciones, su apoyo que siempre me han brindado, por saberme escuchar y porque están en mi corazón.

A mi tío **Alejandro** (q.e.p.d.) por ser un ejemplo de lucha constante y por haber sido una persona muy querida para mí.

A mi tía **Chana**, **Sabina**, **Amelia** y a mi abuelita **Agustina** por su cariño que me han dado y por que las quiero mucho.

A todos mis primos (**Lucy**, **Kary**, **Lilí**, **Hugo**, **Angélica**, **Jacqueline**, **Lorena**...) por todos los momentos divertidos que hemos pasado.

A mis suegros **Rebeca** y **Enrique** por ser muy buenos conmigo, por brindarme siempre su cariño y apoyo.

A mis cuñados y sobrinos por permitirme ser parte de su familia.

A Elenita y José Luis por ser mis compadres y por brindarme su apoyo y sus consejos; a Elenita en especial por toda la paciencia que me tuvo en mi estancia en el laboratorio 125, por trasmitirme sus conocimientos y porque mas que mi asesora fue y es mi amiga.

A todos mis amigos que he tenido (Juan Carlos, Miriam, Melisa, Aída, Vero, Jorge, David, América, Norma, Ricardo, Rosa, Lilia, Roberto...) por brindarme su amistad, por ayudarme a estudiar y porque con ellos pasé gran parte de mi vida.

A todos los profesores que he tenido desde el Kinder hasta la Universidad, por su paciencia, su desempeño, por haberme formado profesionalmente, por transmitirme sus conocimientos y por que gracias a ellos estoy presentando esta Tesis.

A todos aquellos que por cuestión de espacio no mencioné pero han sido parte de mi vida.

*Gracias.*

## ÍNDICE.

| CONTENIDO  | PÁGINA |
|--|--------|
| <b>ÍNDICE</b> .....  | 1      |
| <b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 3      |
| <b>CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES</b> .....  | 8      |
| 2.1 Esteroides .....   | 9      |
| 2.2 Andrógenos.....  | 12     |
| 2.3 Síntesis y biogénesis de la testosterona.....  | 12     |
| 2.4 Enzima 5 $\alpha$ -reductasa.....  | 14     |
| 2.5 La próstata.....   | 16     |
| 2.6 Hiperplasia prostática Benigna y cáncer de próstata .....  | 17     |
| 2.7 Métodos de diagnóstico.....  | 19     |
| 2.8 Tratamiento.....   | 22     |
| 2.9 Antiandrógenos.....  | 26     |
| 2.10 Características para el uso terapéutico de antiandrógenos.....  | 29     |
| <b>CAPITULO 3. OBJETIVOS</b> .....   | 31     |
| <b>CAPITULO 4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....  | 33     |
| <b>ETAPA I. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN</b> .....   | 34     |
| 4.1 Purificación y caracterización de la materia prima (I): Acetato de 16-dehidropregnenolona o 3 $\beta$ -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona..... | 36     |
| 4.2 Síntesis del derivado (II): 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona.....                                       | 37     |
| 4.3 Síntesis del derivado (III):3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona.....                                       | 38     |
| 4.4 Síntesis del derivado (IV): 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено.....                              | 39     |
| 4.5 Síntesis del derivado (V): 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -metil-5-pregнено.....                              | 41     |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.6 Síntesis del derivado (VI): 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregn-20-ona.....                | 42        |
| 4.7 Síntesis del derivado (VII): 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona.....                 | 44        |
| 4.8 Síntesis del derivado (VIII): 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona.....  | 45        |
| 4.9 Síntesis del derivado (IX): 17 $\beta$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\alpha$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona..... | 48        |
| ETAPA II. PARTE BIOLÓGICA: Evaluación de la actividad antiandrogénica...   | 50        |
| 4.10 Prueba en la vesícula seminal y próstata.....   | 51        |
| 4.11. Análisis de la velocidad de formación de DHT en vesículas seminales.....   | 52        |
| <b>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>  | <b>55</b> |
| 5.1 PARTE QUÍMICA: Síntesis y caracterización.....   | 56        |
| 5.2 PARTE BIOLÓGICA.....   | 65        |
| 5.2.1 Efecto del esteroide sobre el peso el peso de las vesículas seminales y próstata.....                            | 65        |
| 5.2.2 Efecto del esteroide sobre la velocidad de formación de T a DHT.....   | 65        |
| <b>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>68</b> |
| <b>CAPITULO 8. ANEXO EXPERIMENTAL.....</b>   | <b>73</b> |
| Lista de espectros.....  | 74        |
| Espectros.....   | 76        |
| Artículo.....  | Al final  |

# **CAPÍTULO 1.**

## **INTRODUCCIÓN.**

## 1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna son enfermedades muy comunes en hombres con edad promedio de 55 años, debido a que la próstata es un órgano susceptible de sufrir aumento de tamaño, y que está relacionado con tumores benignos o malignos y enfermedades de tipo infeccioso (prostatitis). Este órgano está localizado en la pelvis debajo de la vejiga rodeando la porción superior de la uretra, por tal razón, cualquier trastorno ocurrido a la próstata puede obstruir el flujo de orina causando que la micción se torne difícil y dolorosa provocando alteraciones graves en la vejiga, los uréteres y los riñones. El agrandamiento de la próstata es un trastorno que presenta uno de cada tres individuos de más de 60 años de edad, en los que el órgano incrementa su tamaño dos o cuatro veces en relación al tamaño normal<sup>1,2</sup>.

El cáncer de próstata es la segunda neoplasia más frecuentemente diagnosticada (seguida por el cáncer de piel) y es la segunda causa de muerte por cáncer en la población masculina. Este mal surge cuando las células del tejido empiezan a multiplicarse sin ningún control y de manera progresiva hasta llegar a la formación de un tumor; si este tumor no invade los tejidos vecinos y queda circunscrito, se forma un tumor benigno. Si el tumor invade tanto los tejidos vecinos como los que se encuentran a distancia (metástasis) entonces se forma un tumor maligno (cáncer). El Registro Nacional de Patología en México citó 20,000 casos de éste padecimiento al año, de los cuales mueren 3,000. Aproximadamente, un 20% más de individuos no acuden a las clínicas por falta de información o debido a que renuncian al examen diagnóstico por el tacto rectal que se realiza<sup>2</sup>.

Por otra parte, la hiperplasia prostática benigna (hiperplasia nodular) se caracteriza por la formación de voluminosos nódulos bien delimitados en la región periuretral de la próstata, cuando alcanzan el tamaño suficiente, los nódulos comprimen y estrechan el conducto uretral, causando una obstrucción parcial o casi completa de la uretra<sup>3</sup>.

La hiperplasia prostática benigna, el cáncer de próstata y la alopecia androgénica, entre otros padecimientos, están relacionados con una serie de factores etiológicos en común como la raza, la edad, factores ambientales, la dieta y el factor más importante es un exceso de andrógenos en el organismo<sup>1,3</sup>.

Los tratamientos más comunes para el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna son la cirugía y la radiación, empleados principalmente para erradicar el cáncer local. Existen otras formas disponibles para el tratamiento de éstas enfermedades, como es la utilización de antagonistas androgénicos<sup>2</sup>.

Los antiandrógenos son un tratamiento útil para un gran número de enfermedades mediadas por andrógenos entre las cuales se encuentran el acné, alopecia androgénica (calvicie prematura), pubertad precoz, hirsutismo (exceso de vello en mujeres), cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna<sup>4,5</sup>.

El acetato de ciproterona es un potente antagonista androgénico, su distribución en el mercado es amplia debido a su uso en diversas patologías entre las cuales puede mencionarse: acné, alopecia androgénica, hirsutismo y síndromes virilizantes. También se ha tratado de usar en el tratamiento de la pubertad temprana e hiperplasia, carcinomas prostáticos y también para inhibir la libido en varones con desviaciones graves de conducta sexual. Este fármaco presenta efectos progestacionales (feminizantes) no deseados que limitan su uso, por esta razón, existe un gran interés por desarrollar nuevos fármacos que compitan con el acetato de ciproterona en actividad farmacológica y presenten el mínimo de efectos progestacionales posibles<sup>6</sup>.

El finasteride es otro medicamento conocido como inhibidor de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 que está presente en la próstata, también tiene un efecto inhibitorio limitado para la isoenzima tipo 1 encontrada en la piel. El finasteride (ver figura 7) ha sido indicado para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata, también origina una disminución del tamaño de la próstata, mejorías del flujo urinario y reducción de los síntomas. Este medicamento proporciona una alternativa a la intervención quirúrgica y se

tienen antecedentes que los pacientes tratados presentan pocos efectos colaterales y casi todos presentan tolerancia a este fármaco<sup>7,8</sup>.

Del análisis de la relación estructura-actividad biológica de los antiandrógenos esteroidales comerciales se ha concluido que su actividad se debe a la estructura casi plana de la molécula, a la presencia del  $1\alpha$ - $2\alpha$  ciclometileno en C-1 y C-2 o bien un doble enlace entre estos dos átomos de carbono, a los dobles enlaces entre los carbonos C-4 y C-5 y C-6 y C-7, al sustituyente electronegativo en C-6 y al grupo  $\alpha$ -acetoxi en C-17, así como a los grupos cetónicos en C-3 y C-20<sup>9</sup>.

Se conoce que la relación estructura actividad encontrada en nuestro laboratorio es válida para la serie del pregnano, todo esto nos llevó a proponer en el siguiente trabajo de tesis, la síntesis de dos derivados de la progesterona, que reúna las siguientes características moleculares<sup>9</sup>:

#### COMPUESTO I

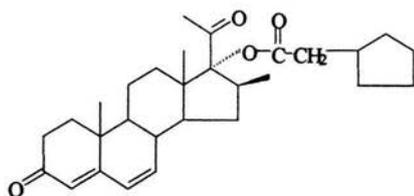
- Dobles enlaces en los carbonos C-4 y C-6.
- Un grupo alquilo en C-16.
- Un sustituyente en C-17.
- Un grupo carbonilo en C-3.

#### COMPUESTO II

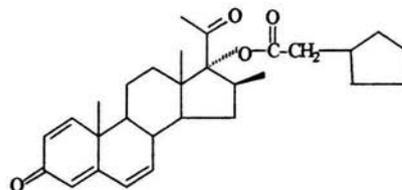
- Dobles enlaces en los carbonos C-1, C-4 y C-6.
- Un grupo alquilo en el C-16.
- Un sustituyente en el C-17.
- Un grupo carbonilo en C-3.

Para obtener los derivados de progesterona de interés se siguió una ruta de síntesis parcial que consta de ocho pasos, el compuesto I ( $17\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi- $16\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona) se obtuvo del paso siete y el compuesto II ( $17\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi- $16\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona) del paso ocho. Se

empleó como materia prima el acetato de 16-dehidropregnenolona, lo que finalmente nos llevó a obtener los compuestos de interés:



COMPUESTO I



COMPUESTO II

Estos compuestos se evaluaron farmacológicamente como inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -reductasa y también su actividad antiandrogénica. Además, se caracterizaron por sus propiedades físicas (punto de fusión experimental) y espectroscópicas (UV, IR, RMN,  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y EMIE).

# **CAPÍTULO 2.**

# **ANTECEDENTES.**

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 Esteroides.

Los esteroides son sustancias que contienen en su estructura base el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (ver figura 1). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en el reino animal como en el vegetal<sup>10,11</sup>.

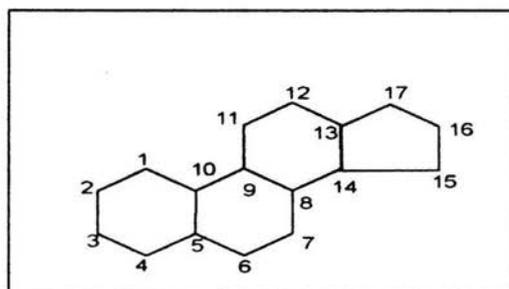
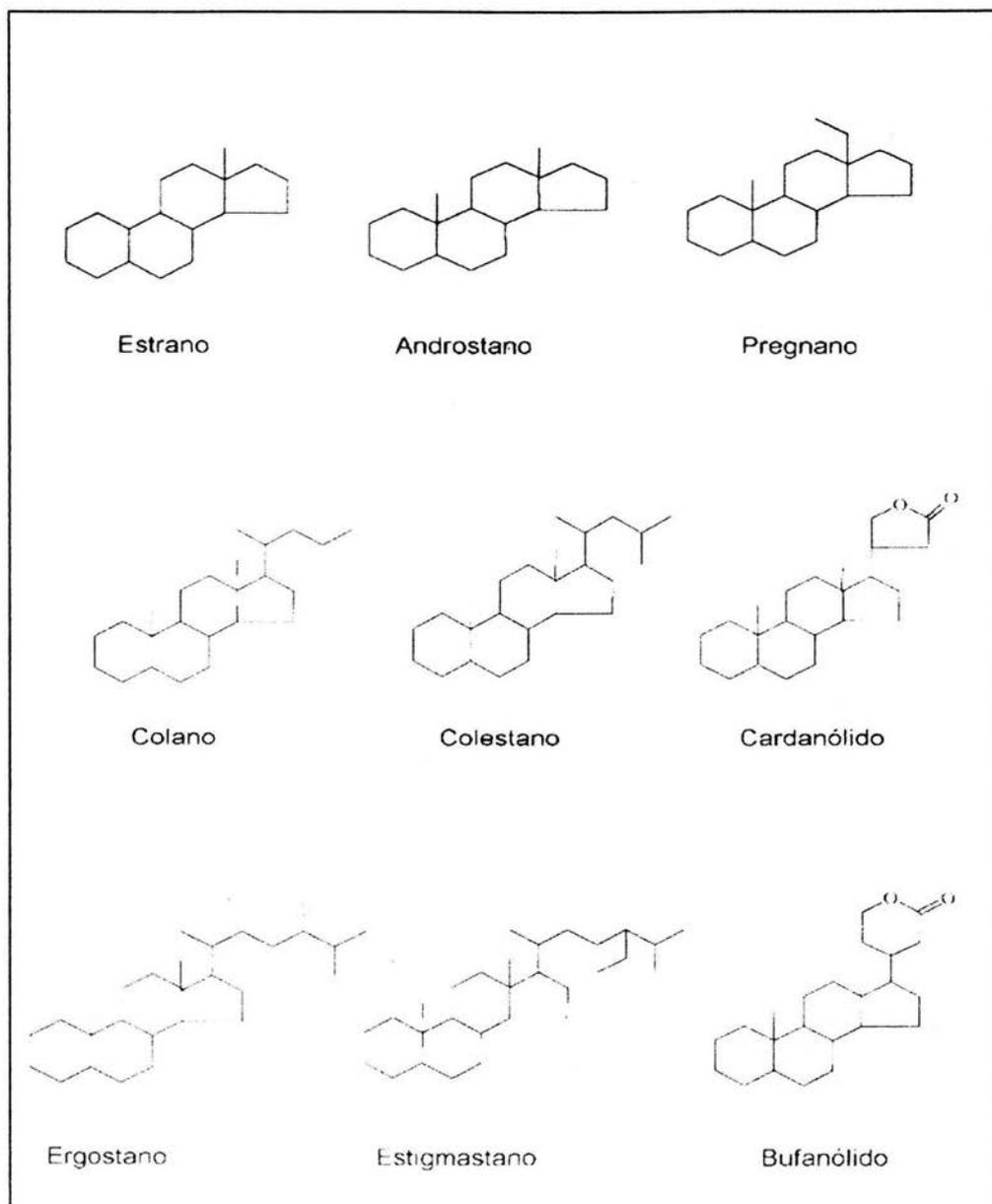


Figura 1

### 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.



**Figura 2. Clasificación de los esteroides**

**Efecto Fisiológico de los esteroides.**

Los efectos fisiológicos varían de unos compuestos a otros y van desde la actividad de las vitaminas hasta las hormonas sexuales<sup>12,13</sup>.

Algunas hormonas y sus propiedades fisiológicas son:

**ESTRONA:** Es la hormona estrogénica de la mujer, es la responsable, del crecimiento, madurez, desarrollo y del mantenimiento del aparato reproductor femenino.

**PROGESTERONA:** Es la llamada hormona del embarazo, estimula el crecimiento de la membrana mucosa del útero para prepararlo en la implantación del óvulo fecundado (ver figura 3).

**TESTOSTERONA:** Es la hormona sexual masculina, regula el desarrollo de los órganos reproductores y las características sexuales secundarias (ver figura 3).

**ÁCIDO CÓLICO:** Se encuentra en la bilis, en la forma de su sal de sodio y junto con otras sales forman las sales biliares, que actúan en los procesos de digestión.

**CORTISONA:** Es una de las 28 hormonas adrenocorticales. No solo es importante para el control del metabolismo de los carbohidratos sino que además, resulta eficaz para el tratamiento de la artritis reumática.

**COLESTEROL:** Es un alcohol esteroide u esteroide, se encuentra en casi todos los tejidos de los vertebrados y es el principal constituyente de los cálculos biliares. El organismo lo necesita como materia prima para la síntesis de otros esteroides.

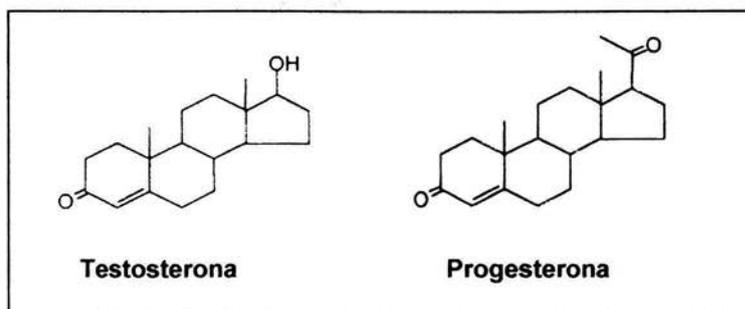


Figura 3.

## 2.2 Andrógenos.

Los andrógenos son una clase de hormonas esteroidales pertenecientes al grupo del androstano y son responsables de regular la fisiología sexual en el varón, promoviendo y manteniendo las características sexuales primarias y secundarias. La testosterona (T) es el andrógeno predominante en la circulación sanguínea, sin embargo, su metabolito  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) es el andrógeno endógeno más potente<sup>14</sup>.

Los andrógenos son secretados por las células de Leydig, mismas que se encuentran agrupadas en el tejido conectivo entre los tubos seminíferos de los testículos. Otros órganos como el hígado, la próstata y las glándulas suprarrenales contribuyen en forma mínima en la producción de andrógenos<sup>1</sup>.

## 2.3 Síntesis y biogénesis de la testosterona.

La producción de T en los testículos y su liberación en el organismo se muestra en la figura 4. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (HLG) que controla la síntesis y liberación de las hormonas de las gónadas, su nombre específico es Factor de

Liberación de la Hormona Luteinizante (FLHL), el cual, estimula la secreción de la Hormona Estimulante de las Células Intersticiales (HECI) y la Hormona Folículo Estimulante (HFE) en el lóbulo anterior de la hipófisis. El siguiente paso es la producción de T en los testículos, bajo la influencia de HECI y HFE por las células intersticiales de Leydig. Aproximadamente un 95% de la T es producida en los testículos y el 5% es liberada en glándulas suprarrenales.

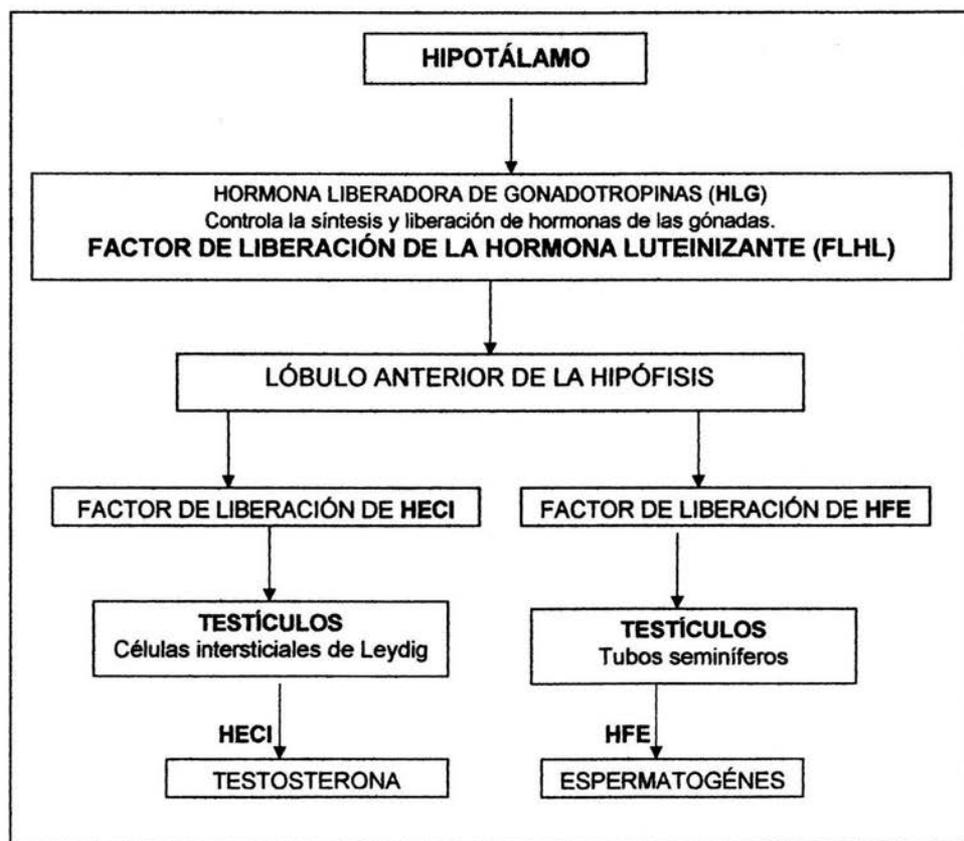
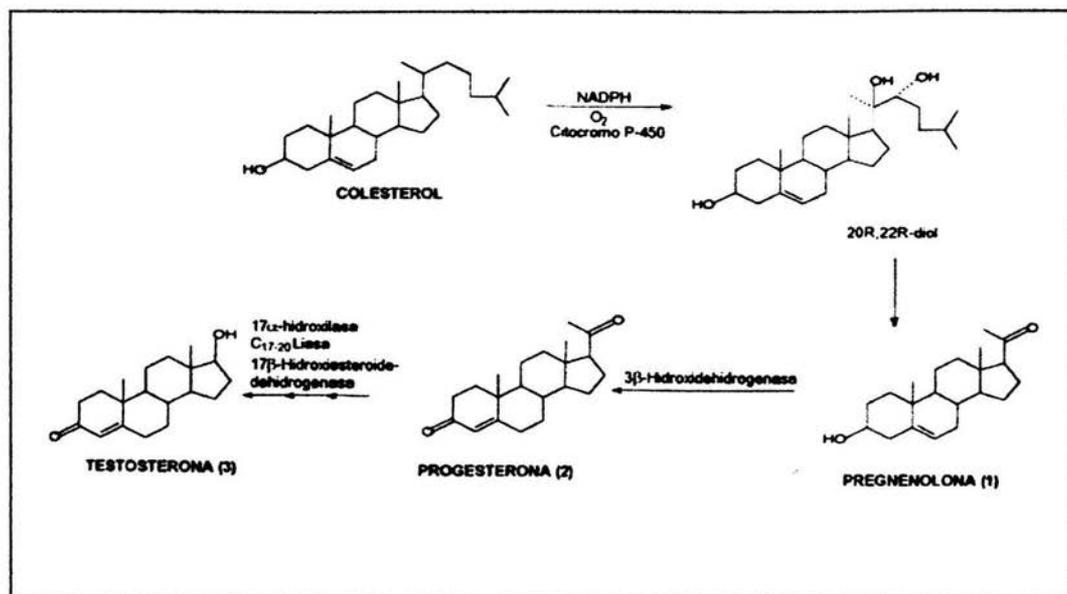


Figura 4. Liberación de testosterona en el organismo.

La biogénesis<sup>3</sup> de la T en el organismo (figura 5) se lleva a cabo mediante la degradación enzimática parcial de la cadena lateral del colesterol (C-20) dando lugar a la formación de la pregnenolona (1) y posteriormente la producción de progesterona (2) que es el precursor de T (3)<sup>5,6</sup>.



**Figura 5. Biogénesis de la Testosterona en el organismo.** Reacciones enzimáticas de degradación de la cadena lateral del colesterol que dan origen a la pregnenolona y testosterona. (Tomado de Brueggemier R.W.)

#### 2.4 Enzima $5\alpha$ -reductasa.

El cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna (HPB) están relacionados con la transformación de T a su metabolito reducido  $5\alpha$ -DHT, en presencia de la enzima  $5\alpha$ -reductasa (presente en el citoplasma de las células prostáticas) dependiente del cofactor NADPH (forma reducida del fosfato de dinucleótido niacina-adenina).

La T está considerada como una prehormona, el mecanismo de acción de la T para convertirse en DHT es el siguiente: La T entra a la célula al parecer por difusión pasiva<sup>7</sup>, en el retículo endoplásmico o en la membrana nuclear se lleva a cabo la transformación de la DHT a T, la transformación es biológicamente irreversible y está catalizada por la enzima 5 $\alpha$ -reductasa que se encuentra fija en la membrana y es dependiente de NADPH. Esta transformación consiste en la reducción regio y estereoespecífica por la adición del hidruro del NADPH a la posición 5 de la T. El enolato formado en C3-C4 se estabiliza por un residuo electrofílico (E<sup>+</sup>) de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa. Posteriormente, por tautomerismo, se regenera el grupo carbonilo formándose la 5 $\alpha$ -DHT y la liberación de NADP<sup>+</sup> (ver figura6)<sup>6,7,15</sup>.

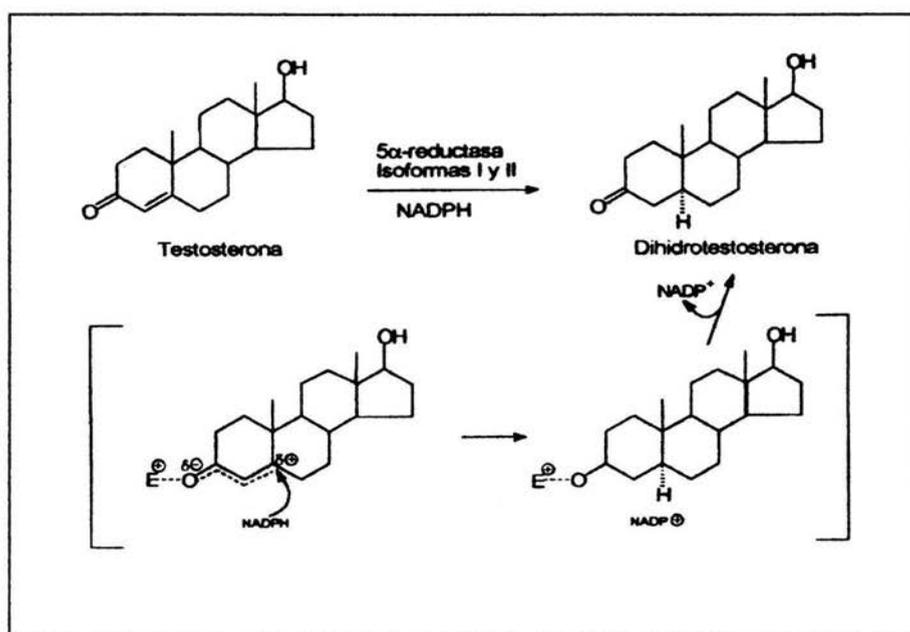


Figura 6. Mecanismo de acción de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa.

La unión de la DHT a receptores intracelulares específicos forma un complejo hormona-receptor<sup>16</sup> que penetra al núcleo celular y que se une a la cromatina, se produce

entonces una estimulación de la síntesis del ácido ribonucleico (RNA) tanto mensajero como ribosómico; como consecuencia, se produce un aumento de la síntesis protéica y de enzimas intracelulares, las cuales son responsables de las acciones androgénicas<sup>7</sup>.

La enzima 5 $\alpha$ -reductasa se encuentra en dos isoformas denominadas Tipo I y Tipo II; las cuales difieren en sus propiedades bioquímicas, tejido de localización y su función<sup>3,6,15</sup>. La isoenzima Tipo I se encuentra predominantemente en la piel no genital y en el hígado, requiere de un pH ligeramente alcalino (pH=6-8.5) y concentraciones elevadas de T para saturarse ( $K_m=3\mu M$ ), funcionando de un modo catabólico en la remoción de andrógenos, por medio del hígado y la piel no genital. La isoenzima Tipo II, requiere de un pH óptimo de 5 y de concentraciones bajas de T para saturarse ( $K_m=0.5\mu M$ ), se encuentra predominantemente en la próstata y testículos, relacionándose directamente al cáncer de próstata y a la HPB; funciona de manera anabólica en la expresión de los andrógenos por la conversión efectiva de T en DHT<sup>3,7,16-18</sup>. También se menciona la relación inversa que presenta la actividad de las dos isoenzimas frente a un mismo tipo de inhibidor, ya que mientras un compuesto resulta ser muy activo sobre la isoenzima tipo II, en la mayoría de los casos es poco activo sobre la isoenzima tipo I<sup>3,7</sup>.

## 2.5 La próstata.

La próstata es un órgano que se encuentra debajo de la vejiga y rodeando la uretra. El tamaño normal de la próstata es el de una nuez. Sin embargo, el tamaño puede variar con el tiempo, y en muchos hombres la próstata incrementa su tamaño conforme avanza la edad, principalmente cuando el hombre llega a la edad de 40 ó 50 años. Este incremento también hace difícil la habilidad para orinar<sup>1</sup>.

La próstata tiene dos funciones: La primera consiste en ayudar en el control urinario y la segunda es su participación en la actividad sexual. En el proceso urinario, la próstata ayuda a controlar la velocidad con que sale la orina de la vejiga y entra a la uretra. En su segunda función, se encarga de producir una secreción líquida que se añade al semen

durante la eyaculación. Esta secreción ayuda a la motilidad de los espermatozoides y constituye la tercera parte del semen.

## **2.6 Hiperplasia Prostática Benigna y Cáncer de próstata.**

### **Hiperplasia Prostática Benigna.**

La palabra "hiperplasia" indica un aumento de tamaño debido al incremento del número de células. "Benigna" denota el hecho de que estas células no son cancerosas. Por lo tanto, "hiperplasia prostática benigna" significa simplemente que la próstata ha aumentado de tamaño sin que se deba a causas cancerosas. La HBP no es un proceso canceroso y no causa cáncer.

La HBP se caracteriza por un agrandamiento anormal de la próstata y la formación de nódulos. Es una faceta normal del envejecimiento que aparece a menudo en los varones mayores de 50 años.

Tanto la HBP como el cáncer de próstata tienen características en común como lo es su alta incidencia en la vejez y que ambas se encuentran ligadas a concentraciones altas de andrógenos, respondiendo a terapias que remueven o disminuyen la concentración de estos últimos<sup>11,14</sup>.

### **Cáncer de próstata**

La palabra cáncer se utiliza para agrupar aproximadamente 200 enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal de las células, situación que es transmitida a células hijas y que se manifiesta por una reducción del control del crecimiento y la función celular<sup>1,2</sup>.

Términos para describir cambios en órganos y tejidos asociados con crecimientos anormales<sup>14,19</sup> :

Aplasia: Es un desarrollo defectuoso que presentan los órganos y tejidos.

Hipertrofia: Incremento en el tamaño de órganos y tejidos provocado por un aumento en el tamaño de las células.

Hiperplasia: Incremento en el tamaño de órganos y tejidos provocado por un aumento en el número de células.

Metaplasia: Un cambio reversible en el cuál una célula diferenciada es reemplazada por otro tipo de células.

Displasia: Es un cambio reversible, el cual incluye una alteración en la forma o tamaño y organización de los órganos.

Neoplasia: es un nuevo crecimiento relativamente autónomo y descontrolado. El término tumor se utiliza como sinónimo.

Carcinoma: Tumor maligno epitelial.

Cáncer: Tumor maligno desarrollado en cualquier lugar del organismo.

Metástasis: proceso por el cual las células tumorales invaden y destruyen otros órganos y tejidos.

Cuando una célula normal se transforma en neoplásica, se presentan cambios celulares, uno de los aspectos importantes es que las células neoplásicas alcanzan a segregar una mayor cantidad de proteasas, enzimas que se encargarán de romper estructuras proteicas para que estas células puedan invadir otros órganos y tejidos del organismo (metástasis)<sup>1,14</sup>.

El cáncer de próstata se origina generalmente en el lóbulo posterior del órgano adyacente al recto, cuando provoca metástasis invade otros órganos alejados como huesos y ganglios linfáticos. Se desarrolla cuando el ciclo celular se encuentra alterado por diversos factores, promoviendo un crecimiento inadecuado de la glándula prostática. Dentro de los signos y síntomas que caracterizan este mal son: flujo de orina lento o interrumpido, frecuente necesidad de orinar y dolor pélvico o en la espalda así como los propios del cáncer. Estos síntomas se deben precisamente al agrandamiento de la próstata ocasionando una obstrucción del paso de la orina por la uretra<sup>11,14,19,20</sup>.

### **2.7 Metodos de diagnóstico<sup>2,13,19,20</sup>**

El diagnóstico para el cáncer de próstata e HPB consiste en detectar por tacto rectal el tamaño, consistencia, movilidad, delimitación y regularidad de la próstata, pero sólo se identifican tumores no microscópicos, por tal motivo este método tiene una sensibilidad= 69% y especificidad= 92%. Es la prueba más adecuada para la HPB, y para palpar algunos tumores en estadios muy tempranos.

Otro método de diagnóstico consiste en la prueba del Antígeno Prostático Específico (APE) en sangre, con una Sensibilidad= 84% y Especificidad= 98%. El APE es una glucoproteína producida por las células epiteliales de la próstata, tanto en estado normal como maligno, pero cuando se presenta el cáncer, su concentración aumenta. El nivel del APE que se considera normal en el hombre promedio va de 0 a 4 nanogramos por mililitro (ng/mL). Un nivel de APE de 4 a 10 ng/mL es considerado ligeramente elevado; los niveles entre 10 y 20 ng/ml se consideran moderadamente elevados; y cualquier nivel arriba de eso se considera altamente elevado. En cuanto más elevado está el nivel de APE en un hombre, hay más posibilidades de que presente el cáncer. También este método puede servir para observar la evolución del tratamiento del cáncer de próstata, ya que si el nivel se eleva tras una prostatectomía es indicativo de que persiste tejido maligno o una recurrencia del mismo.

Una vez que se sospecha que el paciente tenga cáncer de próstata o se ha diagnosticado, se hacen exámenes para determinar si las células cancerosas se han extendido dentro de la próstata o a otras partes del organismo.

El proceso que se emplea para definir si el cáncer se ha extendido dentro de la próstata o a otras partes del organismo se llama clasificación por estadios (o estadificación). Es importante conocer el estadio (también conocido como etapa) de la enfermedad a fin de planificar el tratamiento. Los siguientes procedimientos se emplean para determinar el estadio en que se encuentra el cáncer de la próstata:

- **Gamagrafía ósea con isótopos radiactivos:** Procedimiento para determinar la presencia de células de rápida multiplicación como las cancerígenas en el hueso. Se inyecta una pequeña cantidad de material radiactivo en una vena y este viaja a través del torrente sanguíneo; se concentra en los huesos y se detecta con una cámara de rayos gamma si hay o no células cancerígenas.
- **IRM (imágenes por resonancia magnética):** Procedimiento que utiliza un imán, ondas de radio y una computadora para crear fotografías detalladas de áreas internas del cuerpo. Este procedimiento se denomina también imágenes por resonancia magnética nuclear (IRMN).
- **Linfadenectomía pélvica:** Procedimiento quirúrgico para extirpar los nódulos linfáticos de la pelvis. Un patólogo examina el fluido bajo el microscopio para determinar si existen células cancerosas en los nódulos linfáticos.
- **Tomografía computarizada o Tomografía axial computarizada (TAC):** Procedimiento mediante el cual se toma una serie de fotografías detalladas de áreas internas del cuerpo, desde ángulos diferentes. Las imágenes son creadas por una computadora conectada a una máquina de rayos X. Es posible que al paciente se le inyecte o se le dé a beber un tipo de tintura que sirve para que el órgano o tejido aparezca más claro en la radiografía.

- **Biopsia de las vesículas seminales:** Se inserta una aguja en las vesículas seminales y se obtiene líquido que luego se revisa en busca de células cancerosas. Un patólogo examina el fluido bajo el microscopio para determinar si existen células cancerosas.

Los resultados de estas pruebas se ven en conjunto con los resultados de la biopsia del tumor original con el fin de determinar el estadio en que se encuentra el cáncer de la próstata.

### **Estadíos del cáncer de la próstata<sup>13,14,19</sup>:**

#### **Estadio I**

En el estadio I, el cáncer está restringido únicamente a la próstata. No puede palparse durante un tacto rectal y no es visible mediante un examen por imagen. Suele encontrarse de manera accidental durante una cirugía programada por otras razones, como la hiperplasia prostática benigna.

#### **Estadio II**

En el estadio II, el cáncer está más avanzado que en el estadio I, pero aún no se ha extendido fuera de la próstata.

#### **Estadio III**

En el estadio III, el cáncer se ha extendido más allá de la capa externa de la próstata hasta los tejidos vecinos. Se puede encontrar cáncer en las vesículas seminales.

#### **Estadio IV**

En el estadio IV, el cáncer ha hecho metástasis a los ganglios linfáticos cercanos y no cercanos a la próstata; en otras partes del cuerpo, como la vejiga, el recto, los huesos o los pulmones. El cáncer de la próstata suele extenderse a los huesos.

## 2.8 Tratamiento<sup>2,19</sup>

El pronóstico (posibilidad de recuperación) y las opciones de tratamiento dependen de lo siguiente:

- El estadio del cáncer, ya sea que afecte parte de la próstata, que involucre toda la glándula o que se haya extendido a otras partes del organismo.
- La edad y la salud general del paciente.
- Si el cáncer ha sido recién diagnosticado o ha regresado

La elección del tratamiento más adecuado para el cáncer es una decisión que idealmente involucra al paciente, su familia y el equipo de atención médica. Comúnmente se emplean cinco tipos de tratamientos:

### Cirugía

A los pacientes que gozan de buena salud y que son menores de 70 años por lo general se les ofrece un tratamiento con cirugía para cáncer de la próstata. Se practican los siguientes tipos de intervenciones quirúrgicas:

**Linfadenectomía pélvica:** Es un procedimiento quirúrgico en la cual se extraen los ganglios linfáticos de la pelvis. El patólogo examina una muestra de tejido al microscopio en búsqueda de células cancerosas.

**Prostatectomía radical:** Procedimiento quirúrgico que se utiliza para extirpar la próstata los tejidos circundantes y ganglios linfáticos cercanos. Existen dos tipos de prostatectomía radical:

a) **Prostatectomía retropúbica:** Procedimiento quirúrgico para extirpar la próstata a través de una incisión (corte) practicada en la pared abdominal. La extirpación de los ganglios linfáticos se puede realizar al mismo tiempo.

b) **Prostatectomía perineal:** Procedimiento quirúrgico mediante el cual se extirpa la próstata a través de una incisión (corte) practicada en el perineo (área entre el escroto y el ano). A la misma vez, se podrían extraer los ganglios linfáticos.

**Resección transuretral de la próstata (RTUP):** Este es un procedimiento quirúrgico para extirpar tejido de la próstata mediante el uso de un instrumento llamado citoscopio (un tubo delgado con luz) que se inserta a través de la uretra. Esta operación en ocasiones se realiza para aliviar los síntomas causados por el tumor antes de dar otro tratamiento. La resección transuretral de la próstata también se puede hacer en varones en los cuales no se puede practicar la prostatectomía radical a causa de su edad u otra enfermedad.

La impotencia y el escape de orina de la vejiga o de materia fecal del recto puede presentarse en los hombres que han sido sometidos a cirugía. En algunos casos, los médicos recurren a una técnica conocida como cirugía de preservación de la inervación. Este tipo de intervención respeta los nervios que controlan la erección. Sin embargo, los varones que tienen tumores de gran tamaño o que están demasiado cerca de los nervios pueden no estar aptos para esta operación.

## **Radioterapia**

La radioterapia es un tratamiento para el cáncer el cual utiliza rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para eliminar células cancerosas. Existen dos tipos de radioterapia: la **radioterapia externa** y la **radioterapia interna**. La radioterapia externa utiliza una máquina fuera del cuerpo la cual envía radiación al área donde se encuentra el cáncer. Dentro de la radioterapia interna se encuentra la braquiterapia, es un procedimiento sencillo que no requiere cirugía: con anestesia local y por medio de una aguja acanalada que atraviesa el periné del enfermo (el espacio entre el ano y los testículos), el médico inserta alrededor de 100 semillitas en una intervención que dura cuando mucho una hora y tras la cual el paciente sale a pie del quirófano y una semana más tarde puede reanudar sus actividades cotidianas. Los efectos colaterales son casi inexistentes. La braquiterapia ya se

practica regularmente en estados Unidos, Francia y Reino Unido, en México apenas hay 25 casos (hasta la fecha) de enfermos curados con este tratamiento, cuya principal desventaja es el costo (170,000 pesos) y solo se aplica en hospitales privados. La forma en que se administra la quimioterapia va a depender del tipo o estadio en que se encuentre el cáncer bajo tratamiento. Las personas tratados con radioterapia pueden desarrollar impotencia y problemas urinarios, además de la caída del cabello, náuseas, vómitos, entre otros.

### **Hormonoterapia<sup>7</sup>.**

La terapia hormonal es un tratamiento que elimina la acción de las hormonas o intercepta su acción para detener el crecimiento del cáncer. Las hormonas son sustancias químicas producidas por glándulas del cuerpo que circulan por el torrente sanguíneo. La presencia de ciertas hormonas producen el crecimiento de ciertos cánceres. Si las pruebas revelan que las células cancerosas tienen sitios donde se adhieren las hormonas (receptores) se puede utilizar medicamentos, cirugía o radioterapia para reducir la producción de hormonas o impedirles que ejerzan su función.

La hormonoterapia utilizada en el tratamiento del cáncer de la próstata puede incluir lo siguiente:

- Los antagonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante pueden impedir que los testículos produzcan testosterona. .
- Los antiandrógenos pueden bloquear la acción de los andrógenos (hormonas que producen las características sexuales masculinas) en su sitio de acción.
- Los fármacos que pueden impedir que las glándulas suprarrenales produzcan andrógenos.

- La orquectomía es un procedimiento quirúrgico que se lleva a cabo para extirpar uno o ambos testículos, la principal fuente de hormonas masculinas, con el fin de reducir la producción de estas hormonas.
- Los estrógenos (hormonas que producen las características sexuales femeninas) pueden impedir que los testículos produzcan testosterona. Sin embargo, los estrógenos rara vez se utilizan en el tratamiento del cáncer de la próstata debido al riesgo de efectos secundarios peligrosos.

Los hombres tratados con hormonoterapia pueden quejarse de deterioro de la función sexual y pérdida del apetito sexual.

### **Criocirugía**

Este tratamiento consiste en el uso de un instrumento que se emplea para congelar y destruir tejido anormal. Este procedimiento se denomina también crioterapia.

### **Quimioterapia**

La quimioterapia consiste en el uso de medicamentos para impedir la proliferación de células cancerosas, ya sea eliminándolas o deteniendo su multiplicación. Estos pueden tomarse en forma oral o pueden administrarse en el cuerpo mediante la inyección de una aguja en una vena o músculo. Se dice que la quimioterapia es un tratamiento sistémico ya que el medicamento se introduce en el torrente sanguíneo, se transporta a través del cuerpo y puede eliminar células cancerosas en todo el cuerpo (quimioterapia sistémica). Cuando se coloca directamente en la columna vertebral, un órgano o una cavidad corporal como el abdomen, el medicamento afecta primordialmente las células cancerosas en esas áreas. La forma en que se administra la quimioterapia va a depender del tipo o estadio en que se encuentre el cáncer.

## 2.9 Antiandrógenos.

Son sustancias químicas generalmente esteroides sintéticos o de origen endógeno, que constituyen una amplia gama de fármacos que están asociados con hiperandrogenismo. Los antiandrógenos previenen la expresión de los andrógenos en su sitio de acción, debido al carácter antagónico competitivo de estos frente a los andrógenos por unirse a la misma proteína receptora.<sup>-18,20</sup>

### Clasificación química.

Los antiandrógenos se clasifican en dos grupos: esteroidales y no esteroidales. Los antiandrógenos de tipo esteroideal son compuestos que derivan de la progesterona, como son la medrogesterona, acetato de ciproterona, anorprogesterona y la finasteride (ver figura 7) o de la testosterona como por ejemplo la metiltestosterona (ver figura 8), además de los antiandrógenos ya mencionados se conoce otro grupo de éstos cuya síntesis no deriva ni de la testosterona ni de la progesterona (ver figura 9), pero poseen características similares a la progesterona<sup>7,21</sup>.

Los antiandrógenos no esteroidales (ver figura 10) tienen afinidad por el receptor debido a su estructura química con geometría semejante y reducen del 25 al 30% el tamaño de la próstata.

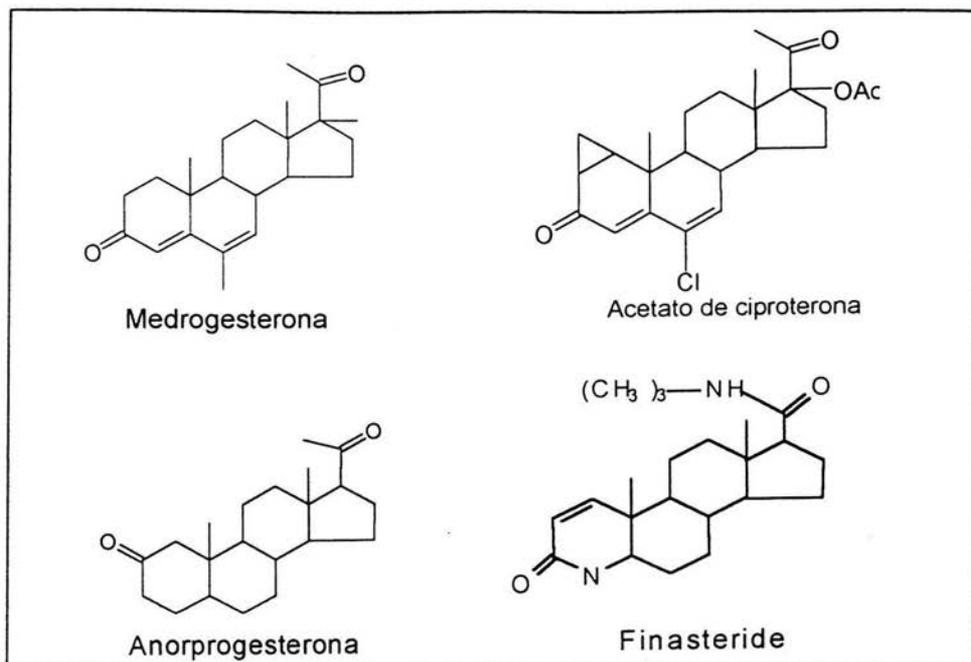


Figura 7. Antiandrógenos esteroidales derivados de la progesterona.

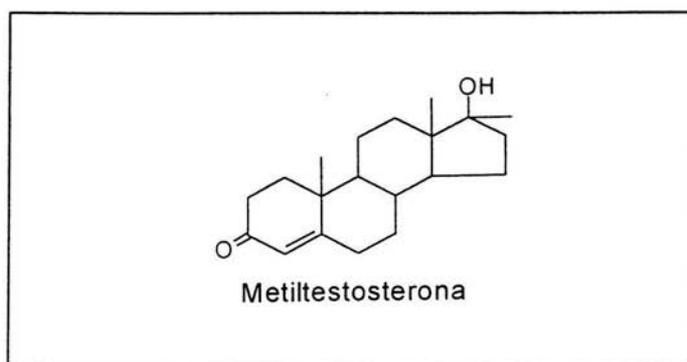
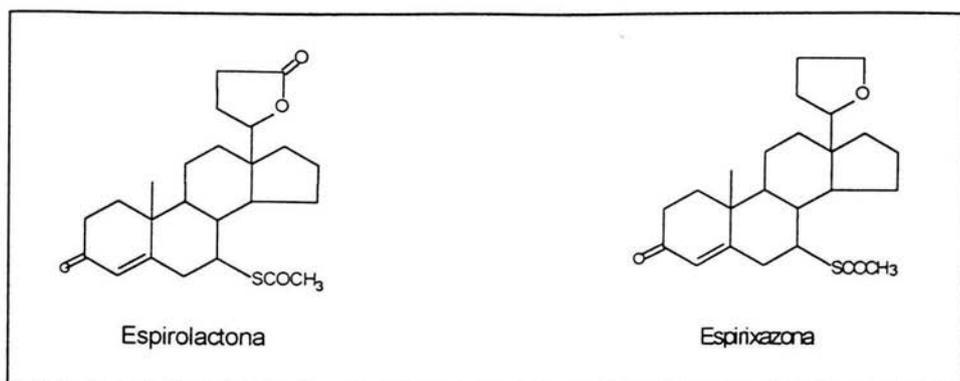
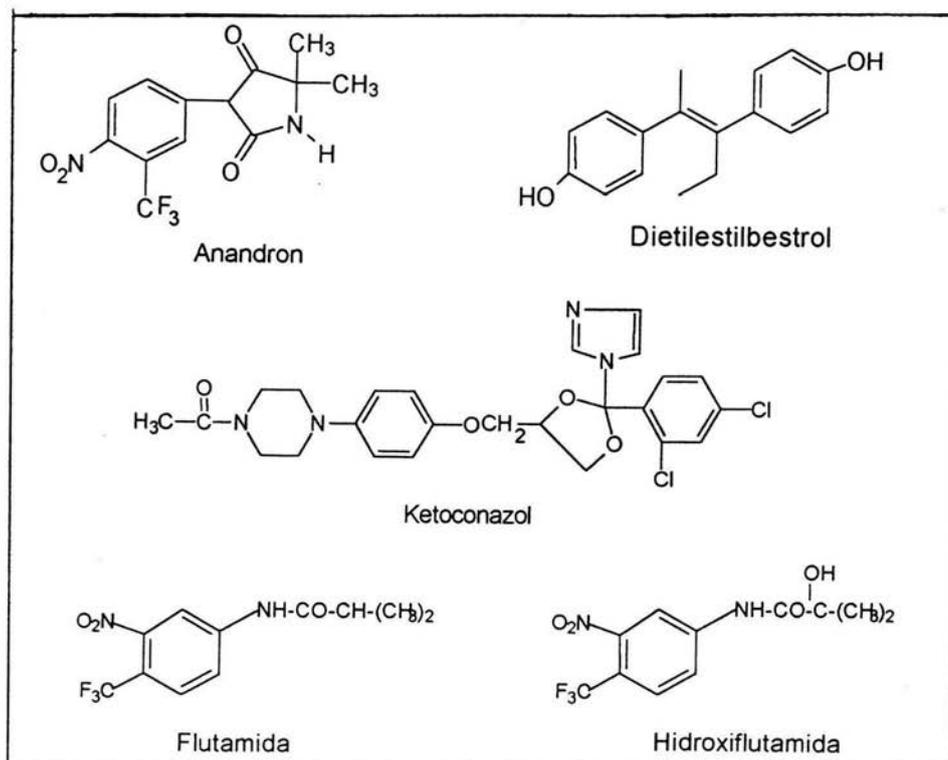


Figura 8. Antiandrógeno esteroidal derivado de la testosterona.



**Figura 9. Antiandrógenos esteroidales que no derivan de la progesterona ni de la testosterona.**



**Figura 10. Antiandrógenos no esteroidales.**

## 2.10 Características para el uso terapéutico de antiandrógenos.

Para que un derivado de la progesterona se pueda usar como antiandrógeno debe poseer las siguientes características<sup>22</sup> :

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

Actualmente, el desarrollo de agentes hormonales antiandrogénicos se ha enfatizado debido a su amplia utilidad en la terapia médica, pues se emplean en el tratamiento del cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, hipersexualidad en el hombre, pubertad precoz en niños, virilización en la mujer, alopecia androgénica, en el tratamiento del acné y como anticonceptivos en el hombre<sup>3,18</sup>.

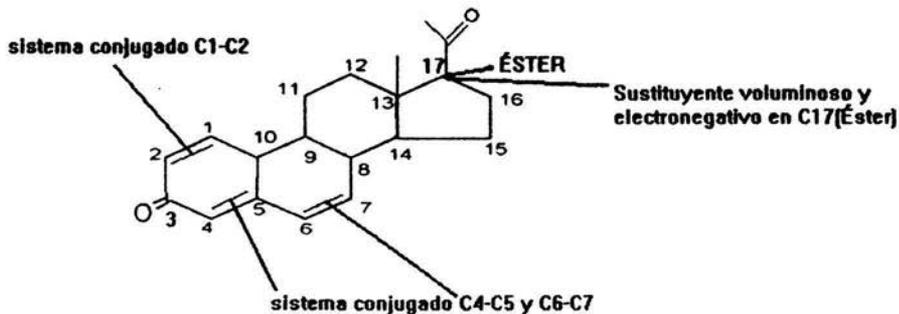
Existen sustancias como los estrógenos que son antagonistas de los andrógenos, pero no son considerados como antiandrógenos. Estos compuestos, como el Dietilestilbestrol (figura 10), ejercen su acción a nivel gonadotrópico.

Los antiandrógenos esteroidales son los de mayor interés terapéutico, en especial los derivados de la progesterona, por ser homólogos de los esteroides de origen natural. No obstante la gran importancia de los antiandrógenos en la terapia médica, su uso es restringido debido a los efectos colaterales que generalmente ocasionan, como diarrea, intolerancia al alcohol, efectos hepatotóxicos severos, alteraciones hormonales, fallas cardíacas, retención de líquidos y pérdida del deseo sexual entre otras<sup>2,3,16</sup>.

Los efectos nocivos provocados por estos fármacos constituyen un factor que estimula el esfuerzo para buscar nuevas entidades químicas con mayor potencia antiandrogénica y menores efectos colaterales.

La modificación de la molécula de progesterona resulta atractiva para obtener un derivado esteroide con posible actividad antiandrogénica que presente además baja actividad hormonal, baja toxicidad y no disminuya el deseo sexual. En años recientes se han sintetizado, en nuestro laboratorio bajo la dirección del Dr. Bratoeff, varias moléculas esteroidales derivadas de la progesterona con actividad antiandrogénica<sup>12,21-25</sup>. Con base a estudios de relación estructura-actividad de derivados de la progesterona realizados en el laboratorio, se estableció una relación empírica entre el carácter antiandrogénico de cada molécula y su estructura. Tomando en consideración esta relación se plantean los requerimientos estructurales para el diseño de un nuevo fármaco antiandrogénico basado en la molécula de progesterona:

- 1.-La presencia del sistema conjugado 4, 6-dien-3-ona ó el sistema conjugado 1,4,6-trien-3-ona.
- 2.-Introducción de un sustituyente electronegativo y voluminoso en C-17 (éster)
- 3.-Presencia de un grupo metilo beta orientado en C-16 para evitar la hidrólisis enzimática del grupo éster en C-17<sup>9</sup>.



Para la síntesis de las moléculas planteadas en este trabajo  $17\alpha$ -ciclopentilacetiloixi- $16\beta$ -metil -4, 6-pregnadien-3,20-diona y  $17\alpha$ -ciclopentilacetiloixi- $16\beta$ -metil -1,4, 6-pregnatrien-3,20-diona, se tomo en cuenta los requerimientos estructurales antes mencionados.

# **CAPÍTULO 3.**

## **OBJETIVOS.**

### 3. OBJETIVOS.

#### Objetivo general.

Sintetizar y purificar compuestos derivados de la progesterona con un sustituyente en C-16, que presenten actividad antiandrogénica mayor a la de la Finasteride.

#### Objetivos particulares.

- Sintetizar y purificar los compuestos: 17 $\beta$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona y 17 $\beta$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona, con base a los siguientes requerimientos estructurales: un grupo metilo en C-16, un grupo éster en C-17; un grupo carbonilo en C-3 conjugado con C-4 y C-6 para el primer compuesto y conjugado con C-1, C-4 y C-6 para el segundo compuesto.
- Aislar, purificar y caracterizar los intermediarios de reacción mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas.
- Probar la actividad antiandrogénica de los compuestos sintetizados y compararla con la actividad del fármaco Finasteride; esperando que los compuestos sintetizados sean más activos.

# **CAPÍTULO 4.**

## **PARTE EXPERIMENTAL.**

#### 4. PARTE EXPERIMENTAL.

La parte experimental se llevó a cabo en dos etapas, la primera etapa involucró la síntesis química y la caracterización física y espectroscópica de los intermediarios y el producto final. En la segunda etapa (parte biológica), se efectuó la evaluación de la actividad antiandrogénica de los y el productos finales, utilizando sistemas *in vivo* e *in vitro*, tomándose como parámetros de actividad (respuestas biológicas), la capacidad de inhibir el crecimiento de la vesícula seminal y la velocidad de formación de T a DHT en hámsters macho gonadoctemizados (castrados).

##### ETAPA I. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN.

La ruta de síntesis planteada para la preparación de los derivados esteroidales y el producto final, se muestra en la figura 11 y algunas abreviaciones utilizadas son: Ac<sub>2</sub>O/Py: Anhídrido acético/piridina, THF: tetrahidrofurano, DMF: dimetilformamida, APTS: ácido p-toluensulfónico, DDQ: 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona, *pf<sub>st</sub>*: punto de fusión del estándar.

El equipo empleado para determinar la Espectrofotometría de Absorción al Ultravioleta fue el Perkin-Elmer Hitachi modelo 200, utilizando como disolvente metanol. La Espectrofotometría de Absorción al Infrarrojo se determinó empleando el espectrofotómetro IR de transformada de Fourier Perkin-Elmer modelo 1600. Las determinaciones se realizaron en película. La Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN <sup>1</sup>H) y Carbono (RMN <sup>13</sup>C) para los derivados y los productos finales, se determinaron en el aparato de RMN Varian VXR-300s, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm). Los patrones de acoplamiento se designaron con las siguientes abreviaturas: s (señal simple), d (señal doble), t (señal triple), m (señal múltiple). La Espectrometría de Masas se realizó en un espectrómetro de masas HP 5985-B CG/MS

mediante la técnica de Impacto Electrónico. Los valores se expresan en relación  $m/z$  (masa/carga).

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

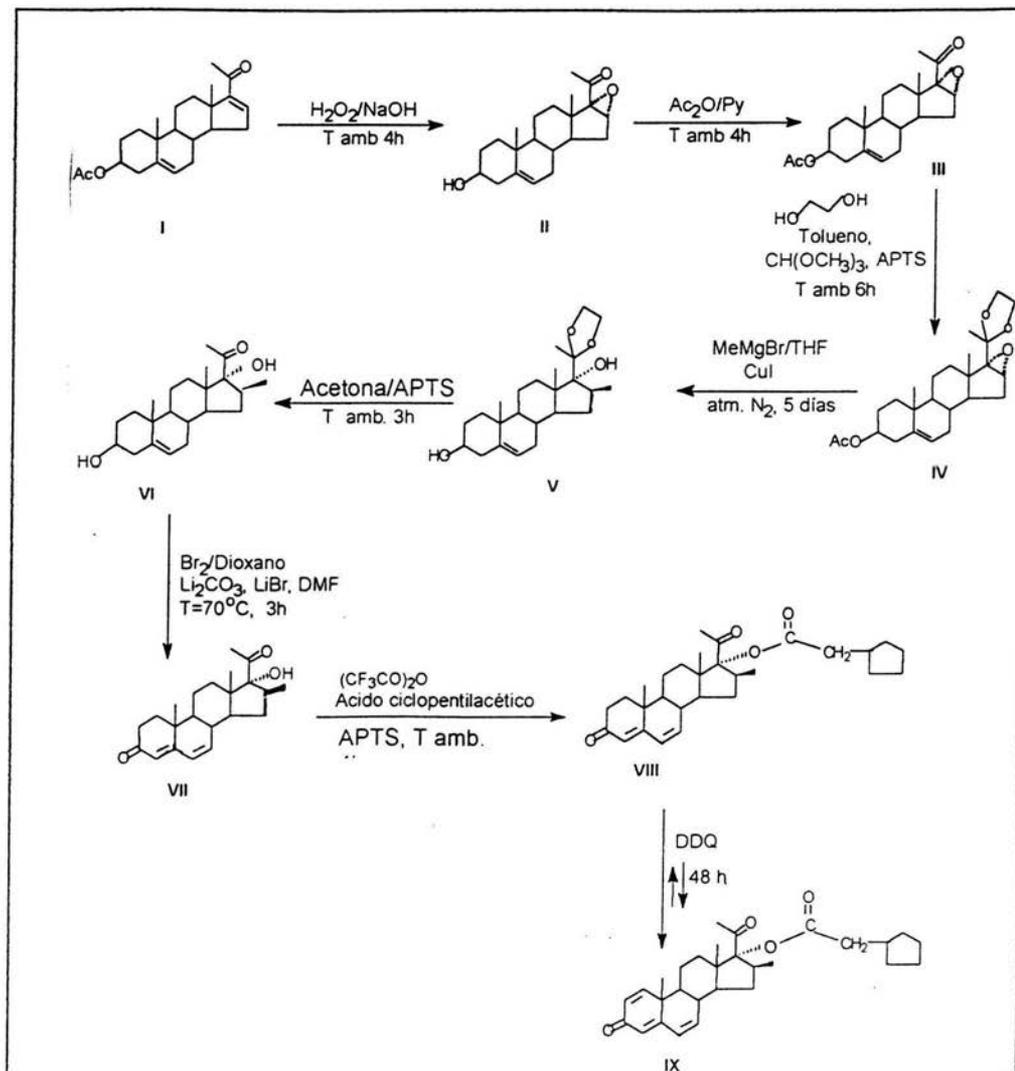


Figura 11. Ruta general de síntesis

#### 4.1 Purificación y caracterización de la materia prima (I): Acetato de 16-dehidropregnenolona o 3 $\beta$ -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona.

La materia prima (I) se encontraba como polvo amarillo el cual se recristalizó de metanol. El producto se obtuvo como cristales en forma de agujas de color blanco con punto de fusión 169-171 °C. Como paso previo a la síntesis del compuesto II, se caracterizó a la materia prima por sus propiedades físicas y espectroscópicas (tabla1) y se compararon con las reportadas en la literatura. pf. 170-171°C<sup>14,23</sup>.

**Tabla 1. Propiedades físicas y espectroscópicas de la materia prima 3 $\beta$ -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona (I).**

| Propiedad  | Valor  |
|--|--|
| Punto de fusión (°C)                                     | 169-171  |
| Fórmula molecular  | C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub> |
| Peso molecular (uma)                                     | 356  |
| <b>Valor espectroscópico</b>                             | <b>Asignación</b>                              |
| <b>UV (nm)                    ESPÉCTRO 1</b>             |  |
| $\lambda_{max}$ 238                                      | <u>C=O</u> $\alpha,\beta$ insaturado en C-20   |
| <b>IR(cm<sup>-1</sup>)                    ESPÉCTRO 2</b> |  |
| 2945   | -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> -          |
| 1730   | <u>C=O</u> de éster en C-3                     |
| 1661   | <u>C=O</u> $\alpha,\beta$ insaturado en C-20   |
| 1584   | <u>C=C</u> conjugado en C-16                   |
| 1451   | -CH <sub>2</sub> -                             |
| 1440   | <u>CH<sub>3</sub>-CO</u> en C-20               |
| 1373   | <u>CH<sub>3</sub>-</u>                         |
| 1246   | <u>C-O</u> de CH <sub>3</sub> CO en C-3        |
| 1036   | <u>C-O</u> de CH <sub>3</sub> CO en C-3        |

| RMN <sup>1</sup> H (ppm) | ESPÉCTRO 3                       |
|--------------------------|----------------------------------|
| 0.92 (s, 3H)             | -CH <sub>3</sub> en C-18         |
| 1.05 (s, 3H)             | -CH <sub>3</sub> en C-19         |
| 2.03 (s, 3H)             | -CH <sub>3</sub> en C-21         |
| 2.26 (s, 3H)             | CH <sub>3</sub> COO- en C-3      |
| 4.60 (m, 1H)             | -CH CH <sub>3</sub> -COO- en C-3 |
| 5.40 (d, 1H;)            | C=CH en C-6                      |
| 6.7 (t, 1H)              | C=CH en C-16                     |

#### 4.2 Síntesis del derivado (II): 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona.

En un matraz bola de 100 mL, se disolvió la materia prima (I) (1 g, 2.8 mmol) en 66 mL de metanol caliente. Posteriormente se adicionaron 2 mL de una solución de hidróxido de sodio 4 N y 4 mL de peróxido de hidrógeno al 30 %. Esta mezcla se agitó por espacio de 4 horas a temperatura ambiente. Se monitoreó el curso de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Transcurrido el tiempo de reacción se destiló el metanol en exceso (por destilación a presión reducida en un rotavapor) y se agregó hielo a la mezcla. Por filtración al vacío se separó un sólido blanco (II), el cual se lavó con agua hasta pH neutro. El producto se secó a temperatura ambiente y después se recrystalizó de metanol. Rendimiento: 99% (0.92g, 2.79 mmol). El punto de fusión experimental reportado en la tabla 2 se comparó con el punto de fusión del estándar  $p_{st}$ : 188-190 °C<sup>12,26,27</sup>.

**Tabla 2. Propiedades físicas y espectroscópicas de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).**

| Propiedad            | Valor  |
|----------------------|--|
| Punto de fusión (°C) | 188-190  |
| Formula molecular    | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> |
| Peso molecular (uma) | 330  |

| Valor espectroscópico    |            | Asignación                            |
|--------------------------|------------|---------------------------------------|
| IR (cm <sup>-1</sup> )   | ESPÉCTRO 4 |                                       |
| 3355                     |            | -OH en C-3                            |
| 2937                     |            | -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> - |
| 1691                     |            | C=O en C-20                           |
| 1446                     |            | -CH <sub>2</sub> -                    |
| 1374                     |            | -CH <sub>3</sub>                      |
| 1053                     |            | C-O de -OH secundario en C-3          |
| 855                      |            | C-O-C de epóxido en C-16-C-17         |
| RMN <sup>1</sup> H (ppm) | ESPÉCTRO 5 |                                       |
| 1.02 (s, 3H)             |            | -CH <sub>3</sub> en C-18              |
| 1.05 (s, 3H)             |            | -CH <sub>3</sub> en C-19              |
| 2.03 (s, 3H)             |            | -CH <sub>3</sub> en C-21              |
| 3.20 (s, 1H)             |            | -CH- base de epóxido en C-16          |
| 3.52 (m, 1H)             |            | -CH base en C-3                       |
| 3.68 (s, 1H)             |            | -OH en C-3                            |
| 5.34 (d, 1H)             |            | C=CH en C-6                           |

### 4.3 Síntesis del derivado (III): 3β-Acetoxi-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona.

En un matraz bola de 25 mL, se disolvió 1g (3.0 mmol) del producto (II) en 5 mL (61.9 mmol) de piridina. Se agregaron bajo agitación constante 10 mL (106 mmol) de anhídrido acético. La mezcla de reacción se agitó por 6 horas a temperatura ambiente, monitoreando su avance mediante cromatografía en capa fina. Al término de la reacción, la mezcla se vertió en un vaso de precipitados con hielo y se agitó vigorosamente por 30 minutos. El precipitado blanco (III) se lavó con agua hasta un pH neutro y se dejó secar. El producto se recrystalizó de metanol. Rendimiento : 91% (1.02g, 2.75 mmol). El punto de fusión experimental reportado en la tabla 3 se comparó con el punto de fusión del estándar  $p_{f_{st}}$ : 160-161 °C<sup>26,27</sup>.

**Tabla 3. Propiedades físicas y espectroscópicas de 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (III).**

| Propiedad                       | Valor   |
|---------------------------------|---|
| Punto de fusión ( $^{\circ}$ C) | 159-161   |
| Fórmula molecular               | C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>          |
| Peso molecular (uma)            | 372   |
| Valor espectroscópico           | Asignación  |
| <b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>     | <b>ESPÉCTRO 6</b>                                       |
| 2967                            | -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> -                   |
| 1733                            | <u>C=O</u> de CH <sub>3</sub> COO- en C-3               |
| 1702                            | <u>C=O</u> en C-20                                      |
| 1374                            | -CH <sub>3</sub>  |
| 1249                            | <u>C-O</u> de CH <sub>3</sub> COO- en C-3               |
| 1039                            | <u>C-O</u> de CH <sub>3</sub> COO- en C-3               |
| 857                             | C-O-C de epóxido en C-16 y C-17                         |
| <b>RMN <sup>1</sup>H (ppm)</b>  | <b>ESPÉCTRO 7</b>                                       |
| 1.03 (s, 3H)                    | -CH <sub>3</sub> en C-18                                |
| 1.04 (s, 3H)                    | -CH <sub>3</sub> en C-19                                |
| 2.03 (s, 6H)                    | -CH <sub>3</sub> en C-21 y CH <sub>3</sub> -COO- en C-3 |
| 3.68 (s, 1H)                    | H base del epóxido en C-16                              |
| 4.59 (m, 1H)                    | H base de CH <sub>3</sub> -COO- en C-3                  |
| 5.36 (d, 1H)                    | C=CH en C-6   |

#### 4.4 Síntesis del derivado (IV): 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено.

En un matraz bola de 50 mL se disolvió 1g (2.6 mmol) del producto III en 6 mL de tolueno. Bajo agitación constante se agregaron, 0.020g (1.13mmol) de APTS, 3.2 mL (53 mmol) de etilenglicol y 4 mL (45 mmol) de ortoformiato de trimetilo. La mezcla de reacción se

agitó durante 6 horas a temperatura ambiente y en condiciones anhidras, el curso de la reacción se determinó mediante cromatografía en capa fina. Al término de la reacción la mezcla se neutralizó con 0.097 g (1.18 mmol) de acetato de sodio y se vertió en un embudo de separación que contenía 20 mL de agua. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo (20 mL c/u). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro y se trató con sulfato de sodio anhidro. Por filtración se separó la sal del disolvente el cual se evaporó a sequedad por destilación a presión reducida en el rotavapor. El producto (IV) se recrystalizó de metanol. Rendimiento: 75% (0.84g, 2.01 mmol). El punto de fusión experimental reportado en la tabla 4 se comparó con el punto de fusión del estándar  $p_{f_{st}}$ : 192-194 °C<sup>12,26,27</sup>.

**Tabla 4. Propiedades físicas y espectroscópicas de 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendoxi-5-pregнено (IV).**

| Propiedad                      | Valor  |
|--------------------------------|--|
| Punto de fusión (°C)           | 192-194  |
| Fórmula molecular              | C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub> |
| Peso molecular (uma)           | 416  |
| <b>Valor espectroscópico</b>   | <b>Asignación</b>                              |
| <b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>    | <b>ESPÉCTRO 8</b>                              |
| 2941                           | -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> -          |
| 1719                           | <u>C=O</u> de CH <sub>3</sub> COO- en C-3      |
| 1465                           | - <u>CH<sub>2</sub></u> -                      |
| 1371                           | -CH <sub>3</sub>                               |
| 1248                           | <u>C-O</u> de CH <sub>3</sub> -COO- en C-3     |
| 1033                           | <u>C-O</u> de CH <sub>3</sub> -COO- en C-3     |
| <b>RNM <sup>1</sup>H (ppm)</b> | <b>ESPÉCTRO 9</b>                              |
| 0.99 (s, 3H)                   | CH <sub>3</sub> - en C-18                      |
| 1.04 (s, 3H)                   | CH <sub>3</sub> - en C-19                      |
| 1.44 (s, 3H)                   | CH <sub>3</sub> - en C-21                      |
| 2.03 (s, 1H)                   | CH <sub>3</sub> -COO- en C-3                   |

|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| 3.39 (s, 1H) | H base del epóxido en C-16          |
| 3.97 (m, 4H) | Dioxolano en C-20                   |
| 4.60 (m, 1H) | H base CH <sub>3</sub> -COO- en C-3 |
| 5.30 (d, 1H) | C=CH en C-6                         |

#### 4.5 Síntesis del derivado (V): 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -metil-5-pregneno.

En un matraz de 50 mL de dos bocas equipado con un refrigerante en posición de reflujo se colocaron 1.0 g (2.4 mmol) del producto IV, 0.4g (2.1mmol ) de complejo de yoduro de cobre como catalizador y 11 mL de una solución de bromuro de metilmagnesio 3.0 M en tetrahidrofurano . La mezcla se mantuvo a reflujo por 5 días, bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación constante. Después la mezcla se vertió lentamente en un embudo de separación que contenía 20 mL de una solución saturada de cloruro de amonio. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo (20 mL c/u). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro, se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó. El producto (V) se recristalizó de metanol. Rendimiento: 88.8% (0.80g, 2.42 mmol). El punto de fusión experimental reportado en la tabla 5 se comparó con el punto de fusión del estándar  $pf_{st}$ : 196-198 °C<sup>12,26,27</sup>.

**Tabla 5. Propiedades físicas y espectroscópicas de 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -metil-5-pregneno.**

| Propiedad                               | Valor  |
|---|--|
| Punto de fusión (°C)                    | 196-198  |
| Fórmula molecular                       | C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> |
| Peso molecular (uma)                    | 390  |
| Valor espectroscópico                   | Asignación                                     |
| IR (cm <sup>-1</sup> )      ESPÉCTRO 10 |  |
| 3450                                    | -OH en C-3 y C-17                              |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| 2935                           | -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> -       |
| 2897                           | -O-CH <sub>2</sub> - de etilendioxi en C-20 |
| 1453                           | -CH <sub>2</sub> -                          |
| 1376                           | -CH <sub>3</sub>                            |
| <b>RMN <sup>1</sup>H (ppm)</b> | <b>ESPÉCTRO 11</b>                          |
| 0.88 (s, 3H)                   | CH <sub>3</sub> - en C-18                   |
| 0.99 (s, 3H)                   | CH <sub>3</sub> - en C-19                   |
| 1.17 (d, 3H)                   | CH <sub>3</sub> - en C-16                   |
| 1.38 (s, 3H)                   | CH <sub>3</sub> - en C-21                   |
| 2.23(s, 1H)                    | H de -OH en C-17                            |
| 3.70 (s, 1H)                   | H de -OH en C-3                             |
| 3.95 (m, 4H)                   | Dioxolano en C-20                           |
| 5.40 (d, 1H)                   | C=CH en C-6                                 |

#### 4.6 Síntesis del derivado (VI) 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -metil -5-pregnen-20 -ona.

Se preparó en un matraz bola de 50 mL de una boca, una solución del producto V 1g (2.6 mmol) en 40 mL de acetona. Se agregó con agitación 0.5g (2.9 mmol) de ácido p-toluensulfónico. La mezcla se dejó con agitación magnética constante durante dos horas a temperatura ambiente, siguiendo el curso de la reacción por cromatografía en capa fina. Transcurrido el tiempo de reacción se destiló la acetona hasta un volumen mínimo o el cual se vertió a un vaso de precipitados que contenía agua destilada. Por filtración al vacío se separó un sólido blanco (VI), el cual se lavó con agua hasta pH neutro. El producto se secó a temperatura ambiente y después se recristalizó de metanol. Rendimiento: 90% (0.81g, 1.98 mmol). El punto de fusión experimental reportado en la tabla 6 se comparó con el punto de fusión del estándar  $pf_{st}$ : 225-226 °C<sup>26,27</sup>.

**Tabla 6. Propiedades físicas y espectroscópicas de 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -metil -5-pregnen-20 -ona.**

| Propiedad                       | Valor  |
|---------------------------------|--|
| Punto de fusión ( $^{\circ}$ C) | 225-227  |
| Fórmula molecular               | C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> |
| Peso molecular (uma)            | 346  |
| <b>Valor espectroscópico</b>    | <b>Asignación</b>                              |
| <b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>     | <b>ESPÉCTRO 12</b>                             |
| 3400                            | - <u>O-H</u> en C-17                           |
| 3342                            | -OH en C-3                                     |
| 2935                            | -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> -          |
| 1690                            | <u>CO</u> de cetona en C-20                    |
| 1455                            | -CH <sub>2</sub> -                             |
| 1378                            | -CH <sub>3</sub>                               |
| 1052                            | <u>CO</u> en C-3                               |
| <b>RMN <sup>1</sup>H (ppm)</b>  | <b>ESPÉCTRO 13</b>                             |
| 0.80 (s, 3H)                    | - <u>CH</u> <sub>3</sub> en C-18               |
| 0.97 (d, 3H)                    | - <u>CH</u> <sub>3</sub> en C-16               |
| 1.21 (s, 3H)                    | - <u>CH</u> <sub>3</sub> en C-19               |
| 2.10 (s, 3H)                    | - <u>CH</u> <sub>3</sub> en C-21               |
| 3.42 (s, 1H)                    | -OH en C-3                                     |
| 3.50 (m, 1H)                    | Base de -OH en C-3                             |
| 3.90 (s, 1H)                    | - OH en C-17                                   |
| 5.30 (d, 1H)                    | C= <u>CH</u> vinílico en C-6                   |

#### 4.7 Síntesis del derivado (VII): 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3, 20-diona.

En un matraz de dos bocas equipado con un embudo de adición y un refrigerante en posición de reflujo se colocaron 1g (2.9 mmol) del producto VI, 3g (40 mmol) de carbonato de litio, 2g (23 mmol) de bromuro de litio y 14 mL de dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó hasta disolución completa. A través del embudo se adicionó lentamente una solución de bromo (0.93 g, 0.30 mL, 5.82 mmol) en 6.0 mL de dioxano. La mezcla resultante se agitó durante 3.30 horas a una temperatura entre 75-79 °C, siguiendo el curso de reacción mediante cromatografía en capa fina. Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró y las sales precipitadas se lavaron con dimetilformamida. Al filtrado se le agregaron 100 mL de una solución de bisulfito de sodio (0.5 g) y bicarbonato de sodio (0.5 g) en 100 mL de agua. Se obtuvo un precipitado amarillo que se separó por filtración a vacío. El producto (VII) se recrystalizó con mezcla Hexano-Acetato de etilo (80:20). Rendimiento: 70% (0.70g, 1.73 mmol). El punto de fusión experimental reportado en la tabla 7 se comparó con el punto de fusión del estándar  $p_{\text{st}}$ : 206-208 °C<sup>27,28</sup>.

**Tabla 7. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3, 20-diona.**

| Propiedad  | Valor   |
|--|---|
| Punto de fusión (°C)   | 206-208   |
| Fórmula molecular  | C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>              |
| Peso molecular (uma)   | 342   |
| <b>Valor espectroscópico</b>                                 | <b>Asignación</b>   |
| <b>UV (nm)                      ESPÉCTRO 14</b>              |   |
| $\lambda_{\text{max}}$ 284.02                                | <u>CO</u> $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ insaturado en C-3 |
| <b>IR (cm<sup>-1</sup>)                      ESPÉCTRO 15</b> |   |
| 3500   | <u>-O-H</u> en C-17   |
| 2937   | -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> -                       |
| 1666   | <u>CO</u> de cetona en C-20                                 |

|                                |                            |
|--------------------------------|----------------------------|
| 1617                           | C=CH vinílico en C-4 y C-6 |
| 1452                           | -CH <sub>2</sub>           |
| 1344                           | -CH <sub>3</sub>           |
| <b>RMN <sup>1</sup>H (ppm)</b> | <b>ESPÉCTRO 16</b>         |
| 1.04 (d, 3H)                   | -CH <sub>3</sub> en C-18   |
| 1.16 (s, 3H)                   | -CH <sub>3</sub> en C-19   |
| 1.23 (t, 3H)                   | -CH <sub>3</sub> β en C-16 |
| 2.30 (d, 3H)                   | -CH <sub>3</sub> en C-21   |
| 5.71 (s, 1H)                   | C=CH en C-4                |
| 6.16 (s, 2H)                   | C=CH en C-6 y C-7          |

#### 4.8 Síntesis del derivado (VIII): 17α-ciclopentilacetiloxi-16β-metil-4,6-pregnadien-3,20-diona.

En un matraz bola de 25 mL se mezclaron 1.1 mL ( 1.28 g, 8.7 mmol) de ácido ciclopentil acético, 1.2 mL (2.1 g, 8.7 mmol) de anhídrido trifluoroacético y 0.2 g (1.04 mmol) de APTS como catalizador. La mezcla se agitó por dos horas a temperatura ambiente. Después se agregó 1g (28.2 mmol) del producto VII. La mezcla de reacción se agitó por dos horas a temperatura ambiente y en condiciones anhidras, siguiendo su curso mediante cromatografía en capa fina. Al término de este tiempo la mezcla de reacción se neutralizó con una disolución saturada de bicarbonato de sodio. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo . La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro. Se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó. El producto (VIII) se purificó por cromatografía en capa fina con un sistema de elución Hexano-Acetato de etilo (80:20). Rendimiento: 64% (0.85g, 1.74 mmol). No existe punto de fusión reportado ni espectroscopias por ser un producto nuevo<sup>27</sup>.

Tabla 8. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona.

| Propiedad  | Valor   |
|--|---|
| Punto de fusión ( $^{\circ}\text{C}$ )                   | 182-183   |
| Fórmula molecular  | $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_4$                      |
| Peso molecular (uma)                                     | 452   |
| <b>Valor espectroscópico</b>                             | <b>Asignación</b>   |
| <b>UV (nm)      ESPÉCTRO 17</b>                          |   |
| $\lambda_{\text{max}}$ 283                               | CO $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ insaturado en C-3        |
| <b>IR (<math>\text{cm}^{-1}</math>)      ESPÉCTRO 18</b> |   |
| 2948   | <u>CH<sub>3</sub></u> y <u>CH<sub>2</sub></u>               |
| 1724   | - <u>COO</u> del éster en C-17 y CO de cetona en C-20       |
| 1663   | <u>CO</u> $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ insaturada en C-3 |
| 1617   | <u>C=C</u> dieno conjugado en C-4 y C-6                     |
| 1416   | <u>CH<sub>3</sub></u> unido a cetona de C-21                |
| 1454   | <u>CH<sub>2</sub></u> - insaturados                         |
| 1378   | <u>CO</u> del éster del ácido arílico                       |
| 1266   | <u>C-O</u> del éster  |
| <b>RMN <sup>1</sup>H (ppm)      ESPÉCTRO 19</b>          |   |
| 6.1 (s, 2H)  | C= <u>CH</u> en C-6 y C-7                                   |
| 5.7 (s, 1H)  | C= <u>CH</u> en C-4   |
| 2.4 (d, 2H)  | <u>CH<sub>2</sub></u> adyacente al carbonilo del éster      |
| 2.0 (s, 3H)  | - <u>CH<sub>3</sub></u> en C-21                             |
| 1.4 (d, 3H)  | - <u>CH<sub>3</sub></u> en C-16 $\beta$                     |
| 1.1 (s, 3H)  | - <u>CH<sub>3</sub></u> en C-19                             |
| 0.8 (s, 3H)  | - <u>CH<sub>3</sub></u> en C-18                             |
| <b>RMN <sup>13</sup>C (ppm)      ESPÉCTRO 20</b>         |   |

|   |  |
|---|--|
| 15  | $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ de C-16   |
| 16  | $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ de C-18   |
| 20  | $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ de C-19   |
| 28  | $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ de C-21   |
| 25  | $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ de C-11   |
| 47  | $\underline{\text{C}}$ base de C-16  |
| 35  | $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ adyacente al carbonilo del éster                |
| 95  | $\underline{\text{C}}$ de C-17 base del éster                                    |
| 124   | $\underline{\text{C}}=\text{CH}$ en C-4  |
| 128   | $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$ en C-6                                  |
| 140   | $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}$ en C-7                                  |
| 163   | $\underline{\text{C}}=\text{CH}$ en C-5  |
| 173   | $\underline{\text{C}}\text{O}$ del éster en C-17                                 |
| 199   | $\underline{\text{C}}\text{O}$ $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ insaturada en C-3 |
| 204   | $\underline{\text{C}}\text{O}$ en C-20   |
| <b>EMIE (m/z)</b>                               | <b>ESPÉCTRO 22</b>   |
| 452   | $\text{M}^+$   |
| 409   | $\text{M} - (\text{CH}_3\text{CO})^+$  |
| 342   | $\text{M} - (\text{ciclopentil-CH}_2\text{-CO})^+$                               |
| 324   | $\text{M} - (\text{COO-CH}_2\text{-ciclopentil})^+$                              |
| 299 (100% de Absorbancia relativa)<br>pico base | $409 - (\text{ciclopentil-CH}_2\text{-CO})^+$                                    |
| 282   | $299 - (\text{OH})^+$  |
| 267   | $282 - (\text{CH}_3)^+$  |
| 111   | $(\text{CO-CH}_2\text{-ciclopentil})^+$  |
| 83  | $111 - (\text{CO})^+$  |
| 43  | $(\text{CO-CH}_3)^+$   |

#### 4.9 Síntesis del derivado (IX): 17 $\beta$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\alpha$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona.

En un matraz bola de 100 mL se agregó 1g (2.21 mmol) de compuesto IX, se disolvió en 85 mL de dioxano y se agregó 2.21g de DDQ. La reacción se dejó a reflujo con agitación magnética constante durante 48h. Terminado el tiempo de reacción se filtró el contenido del matraz bola al vacío y se lavó con cloroformo. El filtrado se vació en un vaso de precipitados que contenía una solución saturada de bicarbonato de sodio y se puso en agitación magnética, La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se secó con sulfato de sodio anhidro. Se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó. El producto (IX) se purificó por cromatografía en capa fina con un sistema de elución Hexano-Acetato de etilo (80:20). Rendimiento: 70% (0.85g, 1.74 mmol). No existe punto de fusión reportado ni espectroscopia por ser un producto nuevo.

**Tabla 9. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona.**

| Propiedad   | Valor   |
|---|---|
| Punto de fusión ( $^{\circ}$ C)                         | 163-164   |
| Fórmula molecular                                       | C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>    |
| Peso molecular (uma)                                    | 450   |
| Valor espectroscópico                                   | Asignación  |
| UV (nm)                      ESPÉCTRO 23                |   |
| $\lambda_{\text{max}}$ 222                              | CO $\alpha,\beta$ conjugada en C-3                |
| $\lambda_{\text{max}}$ 255                              | Sistema 1,4,3-diona                               |
| $\lambda_{\text{max}}$ 299                              | CO $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturado en C-3 |
| IR (cm <sup>-1</sup> )                      ESPÉCTRO 24 |   |
| 2950  | <u>CH</u> <sub>3</sub> y <u>CH</u> <sub>2</sub>   |
| 1724  | <u>-COO</u> del éster en C-17 y CO de             |

|                                 |                    |  |
|---------------------------------|--------------------|--|
|                                 |                    | cetona en C-20   |
| 1657                            |                    | <u>CO</u> insaturada en C-1, C-4 y C-6                   |
| 1617                            |                    | <u>C=C</u> trieno conjugado en C-1, C-4 y C-6            |
| 1416                            |                    | <u>CH<sub>3</sub></u> unido a cetona de C-21             |
| 1454                            |                    | <u>CH<sub>2</sub></u> insaturados                        |
| 1378                            |                    | <u>CO</u> del éster del ácido arílico                    |
| 1266                            |                    | <u>C-O</u> del éster                                     |
| <b>RMN <sup>1</sup>H (ppm)</b>  | <b>ESPECTRO 25</b> |  |
| 7.1 (s, 1H)                     |                    | C= <u>CH</u> en C-4                                      |
| 6.3 (d, 2H)                     |                    | C= <u>CH</u> en C1-C2                                    |
| 5.3 (d, 2H)                     |                    | C= <u>CH</u> en C-7                                      |
| 6.1(d,2H)                       |                    | C= <u>CH</u> en C6                                       |
| 2.4 (d, 2H)                     |                    | <u>CH<sub>2</sub></u> ciclopentil de la cadena del éster |
| 2.0 (s,3H)                      |                    | - <u>CH<sub>3</sub></u> en C-21                          |
| 1.4 (d, 3 H)                    |                    | - <u>CH<sub>3</sub></u> en C-16β                         |
| 1.1 (s, 3H)                     |                    | - <u>CH<sub>3</sub></u> en C-19                          |
| 0.8 (s, 3H)                     |                    | - <u>CH<sub>3</sub></u> en C-18                          |
| <b>RMN <sup>13</sup>C (ppm)</b> | <b>ESPECTRO 26</b> |  |
| 15                              |                    | <u>CH<sub>3</sub></u> de C-16                            |
| 19.8                            |                    | <u>CH<sub>3</sub></u> de C-19                            |
| 20                              |                    | <u>CH<sub>2</sub></u> adyacente al carbonilo del éster   |
| 25                              |                    | <u>CH<sub>2</sub></u> de C-11                            |
| 28                              |                    | <u>CH<sub>3</sub></u> de C-21                            |
| 124                             |                    | <u>C=CH</u> en C-4                                       |
| 128                             |                    | <u>C=CH</u> en C-2 y C-6                                 |
| 138                             |                    | <u>C=CH</u> en C-7                                       |
| 152                             |                    | <u>C=CH</u> en C-1                                       |
| 152                             |                    | <u>C=CH</u> en C-5                                       |
| 173                             |                    | <u>CO</u> en C-3 conjugada con C-1-C-4 y C-6.            |

|   |   |
|---|---|
| 186   | $\underline{\text{C}}\text{O}$ del éster en C-17      |
| 204   | $\underline{\text{C}}\text{O}$ en C-20                |
| <b>EMIE (m/z)</b>                               | <b>ESPÉCTRO 28</b>                                    |
| 450   | $\text{M}^+$  |
| 407   | $\text{M} - (\text{CH}_3\text{CO})^+$                 |
| 340   | $\text{M} - (\text{ciclopentil-CH}_2\text{-CO})^+$    |
| 322   | $\text{M} - (\text{COO-CH}_2 - \text{ciclopentil})^+$ |
| 297 (100% de Absorbancia relativa)<br>pico base | 409 - (ciclopentil-CH <sub>2</sub> -CO) <sup>+</sup>  |
| 280   | 299 - (OH) <sup>+</sup>                               |
| 265   | 282 - (CH <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>                 |
| 111   | (CO-CH <sub>2</sub> - ciclopentil) <sup>+</sup>       |
| 83  | 111- (CO) <sup>+</sup>                                |
| 43  | (CO-CH <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>                    |

## **ETAPA II. PARTE BIOLÓGICA: Evaluación de la actividad antiandrogénica.**

Para realizar la evaluación del efecto antiandrogénico *in vivo* del producto VIII y el producto final XI, se emplearon dos bioensayos:

- Efecto antiandrogénico sobre vesícula seminal (ensayo *in vivo*).
- Análisis de la velocidad de formación de T a DHT en vesículas seminales (ensayo *in vitro*).

En los experimentos fueron empleados como material biológico hámsters machos de la cepa Syriam Golden con un peso promedio de 150-200g, gonadoctemozados 15 días antes del estudio y mantenidos a una temperatura controlada de 22°C.

#### 4.10 Efecto antiandrogénico sobre vesícula seminal (ensayo *in vivo*).

Debido a que la enzima  $5\alpha$ -reductasa presenta dos isoformas (I y II), este método se fundamenta en que la isoenzima tipo II tiene un efecto más profundo sobre los tejidos que expresan esta isoenzima tales como la próstata, los testículos y las vesícula seminal. De esta manera, los compuestos que tienen la capacidad de inhibir dicha isoenzima reducirán el peso de la vesícula seminal.

Se utilizaron grupos de cuatro animales para cada tratamiento, estos fueron gonadectomizados (castrados) 15 días antes del ensayo, manteniéndolos a una temperatura controlada de  $22^{\circ}\text{C}$  y en periodos de luz oscuridad de 12 h. A cada animal de los diversos grupos, le fue administrado por vía subcutánea 200  $\mu\text{g}$  de testosterona y 200  $\mu\text{g}$  de cada uno de los esteroides a evaluar, disueltos en 0.5 mL de aceite sésamo como vehículo, en periodos de 24 horas durante 3 días. Como control se utilizó un grupo de animales al cual se le administró solamente vehículo. A un segundo grupo de animales se les aplicó Finasteride más testosterona, a otro se le administró únicamente testosterona disuelta en el vehículo. Posteriormente al tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante la anestesia con éter y se realizó la disección de las vesículas seminales para ser pesadas<sup>24,25</sup>.

La simbología utilizada en párrafos posteriores se referirá a:

C: control.

F: Finasteride.

VIII:  $17\alpha$ -ciclopentilacetoxi- $16\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona.

IX:  $17\alpha$ -ciclopentilacetoxi- $16\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona.

Tabla 10. Efecto del esteroide sobre el peso de la vesícula seminal.

| GRUPO | TRATAMIENTO | PESO DE LA VESÍCULA SEMINAL (mg) |
|-------|-------------|----------------------------------|
| C     | Vehículo    | 109.7                            |
| II    | T           | 141.7                            |
| III   | T + F       | 120.0                            |
| IV    | T + VIII    | 118.0                            |
| V     | T + IX      | 135.0                            |

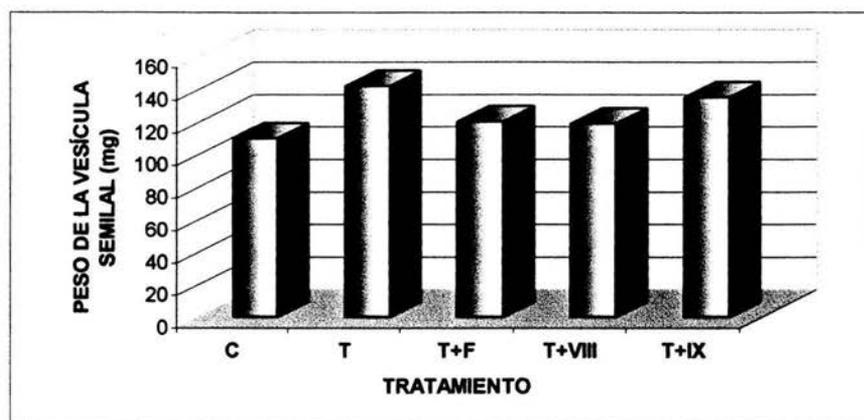


Figura 12. Efecto de T, F, VIII y IX sobre el peso de la vesícula seminal.

#### 4.11. Análisis de la velocidad de formación de DHT en vesículas seminales (ensayo *in vitro*).

Por otra parte se realizó un estudio metabólico *in vitro* con las vesículas seminales para conocer el efecto del esteroide en la velocidad de formación de T a DHT<sup>9,12,16</sup>. En este

bioensayo los esteroides a analizar se incubaron con homogenados de vesículas seminales (pH= 6, con buffer de fosfatos), testosterona tritiada  $^3\text{[H]T}$  y  $\text{NADPH}^+$  a  $37^\circ\text{C}$  por 1h. El control fue la incubación esteroide ni testosterona. La incubación terminó por adición de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y el esteroide tritiado se extrajo con el mismo disolvente. El contenido se determinó por el método de Bradford<sup>29</sup>. La purificación de los productos tritiados se realizó por cromatografía en capa fina, se midió la radioactividad y se expresó en fmol de DHT/g proteína/h.

**Tabla 11. Efecto del esteroide sobre la velocidad de formación de T a DHT en vesículas seminales.**

| GRUPO | TRATAMIENTO        | VEL. DE FORMACIÓN DE DHT<br>(fmol/ mg proteína/ h) |
|-------|--------------------|--|
| C     | Sin esteroide ni T | 24.08  |
| I     | T                  | 18.84  |
| II    | T + F              | 12.89  |
| III   | T + VIII           | 7.25   |
| IV    | T + IX             | 11.56  |

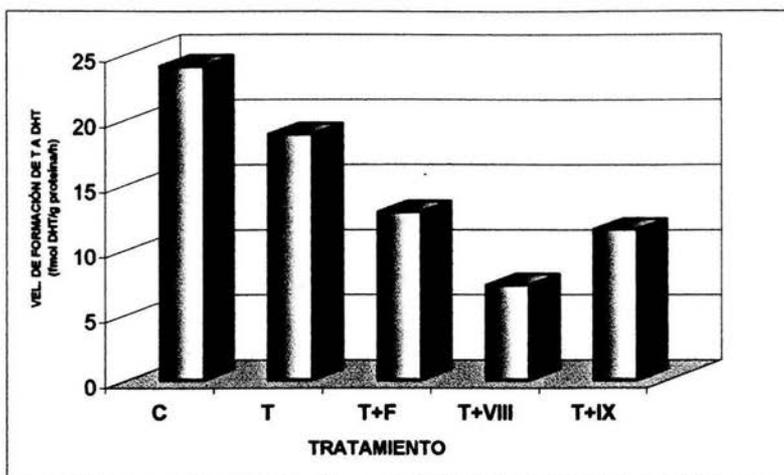


Figura 13. Efecto de T, F, VIII y IX en la conversión de T a DHT.

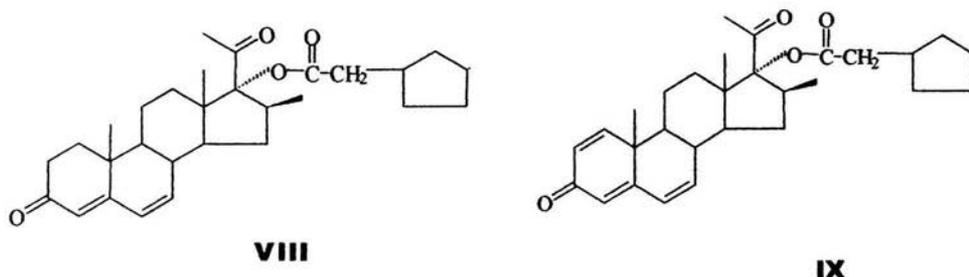
# **CAPÍTULO 5.**

# **DISCUSIÓN DE RESULTADOS.**

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

## 5.1 PARTE QUÍMICA: Síntesis y caracterización.

Para el desarrollo de este trabajo se planteó la secuencia de síntesis presentada en la figura 11 (ver página 35), la cual permitió obtener los compuestos finales (VIII y IX) con las características estructurales requeridas.



Los compuestos que en este capítulo se van a mencionar, se van a referir a los mencionados en la ruta general de síntesis (ver página 35).

Para la síntesis del nuevo compuesto fue empleado como materia prima el acetato de 16-dehidropregnenolona (I) por su costo accesible, disponibilidad comercial y la presencia de las funciones químicas necesarias para obtener la transformación en ocho pasos los compuestos finales.

En primer término se caracterizó a la materia prima por sus propiedades físicas y espectroscópicas<sup>30</sup>. El análisis por UV (espectro 1) mostró la existencia del cromóforo correspondiente a la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada en C-20 ( $\lambda_{\text{max}} = 238 \text{ nm}$ ).

Mediante espectroscopía de IR (espectro 2) se observó la presencia de las bandas en  $1661$  y  $1729 \text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada en C-20 y al carbonilo del acetoxi en C-3 respectivamente.

De acuerdo al espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 3) se observaron cuatro señales simples en 0.92, 1.05, 2.03 y 2.26 ppm, cada señal integra para tres hidrógenos, asignados a los grupos metilos C-18, C-19, C-21 y el metilo del grupo acetoxi en C-3. Se observó un multiplete en 4.60 ppm asignado al protón base del grupo acetoxi en C-3. En la zona de protones vinílicos se presentó un doblete en 5.40 ppm y una señal en 6.7 ppm que integraron cada una para un protón en C-6 y C-16, respectivamente.

El primer paso de la síntesis implicó la epoxidación de la doble ligadura en C16-C17. Se utilizó peróxido de hidrógeno al 30% en un medio básico para promover la adición nucleofílica (adición de tipo Michael) del anión hidroperóxido sobre la ligadura en C-16 viéndose favorecida por la conjugación con la cetona en C-20. El compuesto obtenido (II) se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas.

En el espectro de IR (espectro 4) de este compuesto se observó una banda en  $855\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al epóxido en C16-C17 así como una banda en  $1691\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo de la cetona en C-20. La banda en  $3355\text{ cm}^{-1}$  se asignó al hidroxilo en C-3. En  $1053\text{ cm}^{-1}$  se observó una banda que correspondió al enlace C-O de alcohol secundario en C-3. Se observó la desaparición de la señal en  $1661.90\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 5) mostró la señal en 3.20 ppm que integró para un protón base del epóxido en C-16 y la desaparición de la señal en 6.7 ppm correspondiente al protón vinílico en C-16. Se observó una señal simple en 3.68 ppm correspondiente al grupo hidroxilo en C-3. También se registraron tres señales simples que integraron, cada una, para tres hidrógenos en 1.02, 1.05 y 2.03 ppm que correspondieron a los metilos C-18, C-19 y C-21, respectivamente.

Como siguiente paso en la síntesis fue la reacción de acetilación del alcohol en C-3 ya que su presencia impediría la descomposición del reactivo organometálico (bromuro de metil magnesio), el cual sería utilizado para la subsecuente inserción del grupo metilo en C-

16. Para realizar la introducción del grupo acetoxi en C-3, se empleó la técnica de acetilación convencional en la cual se emplea una mezcla de anhídrido acético y piridina dando lugar a la especie electrófila acetilpiridinio que es el agente acetilante. El derivado acetoxi (III), se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas. Los resultados se compararon con los reportados en la literatura<sup>26</sup>.

En el espectro de IR (espectro 6) se observaron dos bandas, una en  $1733\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo del éster en C-3 y otra banda en  $1702\text{ cm}^{-1}$  asignada al carbonilo en C-20. Las bandas en  $1249$  y  $1039\text{ cm}^{-1}$  se asignaron a las vibraciones C-O-C características del grupo acetoxi en C-3. La ausencia de la señal en  $3355\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al alcohol, confirmó la acetilación en C-3.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 7), presentó dos señales en 1.03 y 1.04 ppm, que integraron para tres protones cada una y corresponden a los metilos angulares C-18 y C-19 respectivamente. En 2.03 ppm se observó una señal que integró para seis protones y correspondió al metilo en C-21 y al metilo del acetoxi en C-3. El protón base del anillo de oxirano se localizó en 3.68 ppm y el protón base del acetoxi en C-3 se observó a 4.59 ppm. Por último, se observó una señal doble de dobles en 5.36 ppm característico del protón vinílico en C-6.

En el paso siguiente, se llevó a cabo la protección del grupo carbonilo en C-20 mediante la formación de su cetal, puesto que es un centro susceptible al ataque del reactivo de Grignard (bromuro de metil magnesio el cual se utilizó para insertar el grupo metilo en C-16 orientación beta).

La formación del cetal, se llevó a cabo empleando etilenglicol, ortoformiato de trimetilo y ácido p-toluensulfónico como catalizador. El producto obtenido IV, se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

El análisis de IR (espectro 8) para este compuesto indicó la desaparición de la banda intensa en  $1702\text{ cm}^{-1}$  del carbonilo en C-20, confirmando así la transformación. También se apreció la banda intensa de  $1719\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo del acetoxi en C-3.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 9), se observaron cuatro señales a 0.99, 1.04, 1.44 y 2.03 ppm correspondientes a los metilos C-18, C-19, metilo en C-21 y metilo del acetoxi en C-3 respectivamente. En 3.39 ppm se ubicó el protón base del epóxido en C-16. La señal múltiple, que integró para cuatro protones en 3.97 ppm confirmó la formación del grupo dioxolano en C-20. La señal múltiple en 4.60 ppm se asignó al protón base del grupo acetoxi en C-3 y la señal doble que integra para un protón en 5.30 ppm se asignó al protón vinílico en C-6.

Con el objetivo de introducir un grupo  $\beta$ -metilo en el C-16 y simultáneamente generar un hidroxilo con configuración  $\alpha$  en el C-17, el paso siguiente de la síntesis fue la apertura del anillo de oxirano de **IV**, mediante una reacción de sustitución nucleofílica bimolecula ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ). Se empleó el bromuro de metil magnesio 3.0 M en THF (reactivo de Grignard) y complejo de yoduro de cobre como catalizador. La mezcla de reacción se mantuvo bajo atmósfera de nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), con el propósito de evitar la descomposición del reactivo de Grignard, el cual con oxígeno atmosférico forma alcoholes y peróxidos vía radicales libres. Una vez terminada la reacción, se neutralizó con solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para regenerar los grupos hidroxilo en C-3 y C-17. El producto obtenido (**V**) se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas<sup>22,26</sup>.

El espectro de IR (espectro 10) confirmó la hidrólisis del acetilo en C-3 por el reactivo organometálico y la apertura del epóxido en C16-C17, al detectar la presencia de la banda intensa correspondiente al alcohol libre en C-17 y C-3 a  $3450\text{ cm}^{-1}$ . Las señales intensas en  $2935$  y  $2897\text{ cm}^{-1}$  indican la presencia de metilos y metilenos.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **V** (espectro 11) presenta dos singuletes en 0.88 y 0.99 ppm cada uno integra para tres protones correspondientes a los metilos angulares en C-18 y 19 respectivamente; un doblete en 1.17 que integra para tres protones, asignados al metilo adicionado en C-16 $\beta$ , el doblete resulta del acoplamiento de este metilo con el protón en C-16. El singulete en 1.38ppm integra para tres protones y corresponde al metilo en C-21. En 2.23 ppm se aprecia un singulete que integra para un protón y se asigna al protón del hidroxilo en C-17. El multiplete en 3.50 ppm integra para un protón y corresponde al protón base del alcohol en C-3. El singulete que aparece en 3.7 ppm que integra para un protón pertenece al protón del alcohol en C-3. En 3.95 se aprecia un multiplete que integra para cuatro protones y pertenece a los metilenos del grupo etilendioxo en C-20. Por último, en la zona de protones vinílicos se observa un doblete en 5.35 ppm que integra para un protón y pertenece al protón vinílico en C-6.

En la siguiente etapa se regeneró el grupo carbonilo que se protegió en C-20 mediante hidrólisis ácida del grupo dioxolano. Esto se llevó a temperatura ambiente en acetona adicionando APTS, con lo cual se promovió la transacetilación de **V**, quedando regenerado el grupo carbonilo en C-20. El compuesto **VI** se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas<sup>26</sup>.

El espectro de IR del compuesto **VI** (espectro 12) mostró una banda intensa en 1690  $\text{cm}^{-1}$  que se asignó al grupo carbonilo en C-20, lo cual comprueba la regeneración del grupo carbonilo. Las señales en 3400 3342  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los hidroxilos en C-17 y C-3 respectivamente. En 2928  $\text{cm}^{-1}$  se observa una banda intensa que corresponde a metilos y metilenos. La señal en 1053  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la unión C-O en C-3.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 13) se verificó la ausencia del multiplete en 3.95 ppm que pertenecía a los metilos del grupo dioxolano. En 0.8 ppm se observa un singulete que integra para tres protones correspondientes al metilo en C-18. En 0.97 ppm aparece un doblete que integra para tres protones y corresponde al metilo en C-16. También se observa

un singulete en 1.2 ppm que integra para tres protones y corresponde al metilo en C-19. En 2.1 ppm se presenta un singulete que integra para tres protones pertenecientes al metilo en C-21. El singulete en 3.42 ppm integra para un protón y corresponde al protón del hidroxilo en C-3. El multiplete en 3.5 ppm integra para un protón y se asignó al protón base del alcohol en C-3. En 3.9 ppm aparece un singulete que integra para un protón que pertenece al protón del grupo alcohol en C-17. Finalmente el doblete en 5.3 que integra para un protón se asignó al protón vinílico en C-6.

La formación del sistema 4,6-dien-3-ona para la obtención del compuesto VII se realizó conforme al método reportado por Shapiro<sup>28</sup> el cual permitió en una sola etapa, la oxidación del alcohol en C-3 y la formación de las dobles ligaduras en C-4 y C-6. La reacción involucra una bromación-deshidrobromación, al emplear bromo como agente oxidante y carbonato de litio como base para sustraer el protón en C-7. El producto VII se caracterizó por sus propiedades espectroscópicas y físicas.

La presencia del cromóforo 4,6-pregnadien-3-ona se confirmó en el espectro de ultravioleta (espectro 14) con la presencia de un máximo de absorción en 282.29 nm correspondiente al sistema 4,6-dien-3-ona, con lo cual se afirma la oxidación de VI.

En el espectro de IR del compuesto VII (espectro 15) se observaron dos bandas en 1618 y 1585  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al sistema 4,6-dien-3-ona. Se observan también dos señales en la zona de carbonilos, una de ellas en 1666 y la otra en 1706  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden al carbonilo  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$  insaturado en C-3 y al carbonilo de cetona en C-20 respectivamente. También se observa una señal en el área de alcoholes en 3500 asignada al alcohol terciario en C-17.

El análisis por RMN  $^1\text{H}$  (espectro 16) mostró señales evidentes del compuesto esperado, se observan dos singuletes en 0.95 y 1.16 ppm que integran para tres protones

cada uno y fueron asignados a los metilos C-18 y C-19 respectivamente. En 1.03 ppm se aprecia un doblete que integra para tres protones y corresponde al metilo en C-16. El singulete que aparece en 2.30 ppm integra para tres protones y corresponde al metilo en C-21. En la zona de protones vinílicos se registró un doblete en 5.4 ppm e integra para un protón y corresponde al protón en C-6. En 5.71 ppm que integra para un protón y corresponde al protón en C-4. Por último el singulete que integra para un protón que aparece en 6.16 ppm corresponde al protón en C-7.

La penúltima etapa de la síntesis consistió en la esterificación del alcohol en C-17 para obtener el compuesto VIII. La reacción se llevó a cabo empleando ácido ciclopentilacético, anhídrido trifluoroacético y ácido p-toluensulfónico como catalizador<sup>27</sup>. En la primera etapa de la reacción se formó el anhídrido mixto ciclopentilacetiloil-trifluoroacético que reaccionó con el alcohol en C-17 del esteroide, originando un éster nuevo no reportado en la literatura: **17 $\beta$ -ciclopentilacetiloiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII)**. Este compuesto se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas

El cromóforo 4,6-dien-3-ona se determinó por espectroscopía de UV (espectro 17), en donde se observó un máximo de absorción en 282.10 nm.

El espectro de IR (espectro 18) corroboró la esterificación del hidroxilo  $\alpha$  en C-17 debido a la desaparición de la banda de alargamiento en  $3500\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al alcohol libre, por otra parte se observó una banda nueva en  $1724\text{ cm}^{-1}$  asignada al carbonilo del éster ciclopentilacético y al carbonilo de cetona en C-17. La señal característica del grupo 4,6-pregnadien-3-ona se observó en  $1663\text{ cm}^{-1}$ . Con las bandas en 1617 se confirma la presencia de dieno conjugado.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 19) se corrobora la presencia del éster ya que además de la señales de los protones de los metilos C-18, C-19, C-16 y C21 (0.8, 1.1, 1.4 y

2.0 ppm respectivamente), aparece una señal en 2.4 ppm que corresponde al metileno adyacente al carbonilo del éster. Las señales restantes que producen los grupos funcionales presentes en el esteroide permanecen constantes.

En el análisis por RMN  $^{13}\text{C}$  normal y DEPT (espectros 20 y 21) para VIII también se corroboró la esterificación del alcohol  $\alpha$  en C-17, puesto que en la región de los carbonilos además de las señales en 199 y 204 ppm correspondientes a los carbonilos en C-3 y C-20, también se observó otra en 173 ppm la cual se asignó al carbonilo del éster ciclopentilacético. La señal para C-17, que es base de un metilo y el éster, se vio en 95 ppm. Las señales para el sistema de carbonos diénicos (C-4, C-5, C-6 y C-7) continuaron apareciendo en la zona de carbonos vinílicos. Además se puede apreciar una señal en 35 ppm que corresponde al metileno adyacente al carbonilo del éster.

En EMIE (espectro 22) se observó un ion molecular en 452 m/z que confirma el peso molecular de VIII. A partir de ésta señal y por la pérdida de 43 unidades m/z correspondientes a la entidad (CO-CH<sub>3</sub>) se originó el pico en 409 m/z. La pérdida de 111 unidades m/z (CO-CH<sub>2</sub>-ciclopentil) dio lugar al pico en 299 m/z y corresponde al pico base. La subsecuente pérdida de 17 unidades (OH) originó el pico en 282 m/z. La siguiente pérdida de 15 unidades m/z (-CH<sub>3</sub>) dio lugar al pico 267 m/z. Se observó también la presencia del ion CO-CH<sub>2</sub>-ciclopentil en 111 m/z.

La última etapa de la síntesis consistió en la formación del sistema 1,4,6 pregnatrien a partir del compuesto VIII, esto se logró a través de una deshidrogenación con DDQ<sup>31</sup>. El trien derivado (IX), se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

El cromóforo 1,4,6-trien-3-ona se determinó por espectroscopía de UV (espectro 23), en donde se observó un máximo de absorción en 299 nm. Las otras señales de 155 y 222 corresponden a los sistemas 1,4-dien-3-ona y a la cetona  $\alpha$ - $\beta$  conjugada.

En el espectro de IR (espectro 24) se puede corroborar la presencia del éster en la molécula. También se puede ver la señal del sistema trien conjugado en  $1657\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 25) se observó un cambio en la zona de protones vinílicos, debido a que se agregó una señal. En 7.1ppm se asignó al protón vinílico en C-4, en 6.3 ppm una señal doble para cada protón vinílico en C-1 y C-2, en 5.3 y 6.13 ppm se vieron señales dobles para cada protón vinílico en C-6 y C-7 respectivamente.

En el análisis por RMN  $^{13}\text{C}$  normal y DEPT (espectros 26 y 27) para IX también se observó un cambio en la zona de insaturaciones (CH) ya que se agregaron dos señales en 128 ppm correspondientes a C-2 y en 153 ppm correspondientes a C-1, las otras insaturaciones se conservan en 124, 162, 128 y 138 ppm asignadas a C-4, C-5, C-6 y C-7 respectivamente.

En EMIE (espectro 28) se observó un ión molecular en 452 m/z que confirma el peso molecular de IX. A partir de ésta señal y por la pérdida de 43 unidades m/z correspondientes a la entidad (CO-CH<sub>3</sub>) se originó el pico en 409 m/z. La pérdida de 111 unidades m/z (CO-CH<sub>2</sub>-ciclopentil) dio lugar al pico en 297 m/z que corresponde al pico base. La subsecuente pérdida de 17 unidades (OH) originó el pico en 280 m/z. La siguiente pérdida de 15 unidades m/z (-CH<sub>3</sub>) dio lugar al pico 265 m/z. Se observó también la presencia del ión CO-CH<sub>2</sub>-ciclopentil en 111 m/z. En los picos presentes en este espectro se puede observar que todos difieren en dos unidades con respecto al espectro 22 debido que este compuesto se originó por deshidrogenación de dos hidrógenos del compuesto VIII.

Las características físicas y espectroscópicas de los compuestos I al VII se compararon con los reportados en la literatura y se comprobó que los resultados sí corresponden con los reportados.

## 5.2 PARTE BIOLÓGICA.

### 5.2.1 Efecto del esteroide sobre el peso de las vesículas seminales.

Los resultados obtenidos, mostrados en las tablas 10 y la figura 12, indicaron que cuando los hámsters gonadoctemizados son sometidos al tratamiento con T, ésta realiza su función androgénica aumentando el peso de las vesículas seminales. Cuando se evaluaron los compuestos VIII, IX y F, se observó que el F efectivamente disminuye el peso de la vesícula seminal; el compuesto VIII disminuye el peso de la vesícula de manera semejante a F y el compuesto IX disminuye muy poco el peso de la vesícula, incluso en menor proporción que F.

### 5.2.2 Efecto del esteroide sobre la velocidad de formación de T a DHT.

En los resultados obtenidos en la tabla 11 y figura 13 se puede observar que el F en efecto inhibe la formación de T a DHT y comparando a los compuestos VIII y IX con éste, se puede ver que el compuesto VIII tiene una actividad considerablemente mayor que F, ya que la velocidad de conversión *in vitro* de T a DHT es menor. El compuesto IX presenta una actividad de conversión de T a DHT muy semejante al F.

# **CAPÍTULO 6.**

# **CONCLUSIONES.**

## 6. CONCLUSIONES.

- En este trabajo se realizó la síntesis y evaluación farmacológica de dos compuestos nuevos derivados de la progesterona:  $17\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi- $16\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona y  $17\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi- $16\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona.
- Se obtuvieron dos compuestos puros, derivados de la progesterona con las siguientes características estructurales: un grupo metilo  $\beta$ -orientado en C-16, así como la presencia de un grupo voluminoso (éster) en C- $17\alpha$  orientado y el sistema conjugado 4,6-dien-3-ona y 1,4,6-trien-3-ona respectivamente.
- La síntesis de los compuestos antes mencionados no ha sido reportada anteriormente por lo cual se purificó y caracterizó mediante sus propiedades físicas (p.f., apariencia) y datos espectroscópicos (UV, IR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y EMIE).
- El compuesto VIII sí tiene una actividad antiandrogénica sobre la isoenzima  $5\alpha$ -reductasa tipo II muy semejante a F, por el contrario el compuesto IX tiene una actividad antiandrogénica menor que F.
- De la prueba *in vitro* se concluye que los compuestos VIII y IX sí inhiben a la enzima  $5\alpha$ -reductasa principalmente el compuesto VIII.

# **CAPÍTULO 7.**

# **BIBLIOGRAFÍA.**

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Tortora G., Anagnostakos N., "Principios de Anatomía y Fisiología", Editorial Harla. 3ª Edición. México, D.F., (1984).
2. Cesorsimo R., Carr D., Therapy Update: Am. J. Health-Syst Pharm., **53**, 381,(1996).
3. Hoocker, C.W. Reproduction in the male. In Ruch, T.C. and Patton, HD. Physiology and Biophysics. 19<sup>th</sup> De. W.B. Saunders Co., Philadelphia. Pag. 1205. (1965).
4. Brueggemeier R.W., "Male sex hormones analogs and antagonists" in Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, John Wiley Inc., 5ª Ed. USA, (1996). Capítulo 42.
5. Drugs of Today. **31**, 537-544, (1995).
6. Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., Valencia N., Chimica Oggi/Chemistry today. **15**, 67-69, (1997),.
7. Litter M. Farmacología experimental y clínica. 6ª edición. Editorial El Ateneo. Argentina. pp 1218-1233 (1980)
8. Shulster D., Burstein s. and Cooke B. A., Molecular endocrinology of Steroid Hormones, Wiley, London (1976).
9. Martínez, A., 17 $\alpha$ -hidróxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona como un intermediario en la síntesis de andrógenos. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química de la UNAM (1997)
10. Tayler V., " Pharmacognosy", Editorial Lea & Febiger 8a Edición. Philadelphia, USA, Capítulo 7 (1981).
11. Scott J., Engel L. Ville en CA.: Mechanism of Action of Steroid Hormones. Pregnamon Press N.Y. pag 20 (1961).
12. Cabeza M., Gutierrez E., Miranda R., Hueze I., Breatoeff E., Flores G. y Ramírez E. Steroids. **64**: 413-421, (1999).
13. Catalona,WJ., and Scout,WW. Carcinoma of the prostate in Walsh, P.c, et al. (eds).Campbell's Urology, 5th edition. Saunders Co. Philadelphia, pp 1463, (1986).
14. Ramzi s. Cotran, Vinay Kumar y Stanley L Robbins.: Patología estructural y Funcional. 4ª. Edición, **11**, Editorial Interamericana Mc Graw Hill. Madrid. Pp. 1173-1176. (1990).

15. Holt D., Levy M., *J. Med. Chem.*, **33**: 943, (1990).
16. Labrie F., Sugimoto Y., *Endocrinology*, **131**: 1571, (1992).
17. Isaacs J., *Drugs of today*, **29**: 335, (1993).
18. Shankar M., Li X., Leplante S., *J. Med. Chem.*, **38**: 1456, (1995).
19. Medline Plus.2001. The Prostate Cancer; [on line] Disponible en <http://medlineplus.adam.com/ency/article/000380.htm>
20. Jepsen J., Bruskewitz R., *Drugs of today*, **34**: 353, (1998).
21. Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., Calderón D. y Hernández E. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **28**: 13-19 Y 24-29, (1997).
22. Bratoeff E., Rubio M., Ramírez E., Flores G., García J. y Ramírez G. *Chemistry Today*. November/december, p.33-35, (1998).
23. Bratoeff E., Herrera H., Ramírez E., Solórzano K., Murillo E., Quiroz A. y Cabeza M. *Chemical Pharmaceutical. Bulletin.* **48** [9], 1249-1255, (2000).
24. Cabeza M., Quiroz A., Heuse I., Bratoeff E., Herrera H., Ramírez E., Murillo E. y *Proc. West. Pharmacological Soc.* **43**: 1-2, (2000).
25. Cabeza M., Heuse I., Bratoeff E., Ramírez E. y Martínez R. *Chemical Pharmaceutical. Bulletin.* **49**: 525-530, (2001).
26. Valencia N., Síntesis de derivados del pregnano con un grupo fenilo en configuración  $\beta$  en C-16 como antiandrógenos potenciales para el tratamiento del cáncer de próstata. Tesis de Maestría en la Facultad de Química, UNAM (1997).
27. Ramírez E. Síntesis de 6-Halo-16 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -valeriloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona como antiandrógenos. Tesis de maestría en la Facultad de Química, UNAM (1998).
28. Shapiro E. L., Weber L., Harris H. *J. Med. Chem.*, **15**: 716-720, (1972).
29. Bradford M., *Ann. Biochem.* **72** : 248, (1976).
30. Pretsch E., Clerc T., Seibl J. and Simon W. *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds.*, Springer-Verlag. Second Edition. USA (1989).
31. Shapiro, E. et al. *J. Med. Pharm. Chem.* **5**:975, (1962)..

# **CAPÍTULO 8.**

# **ANEXO EXPERIMENTAL.**

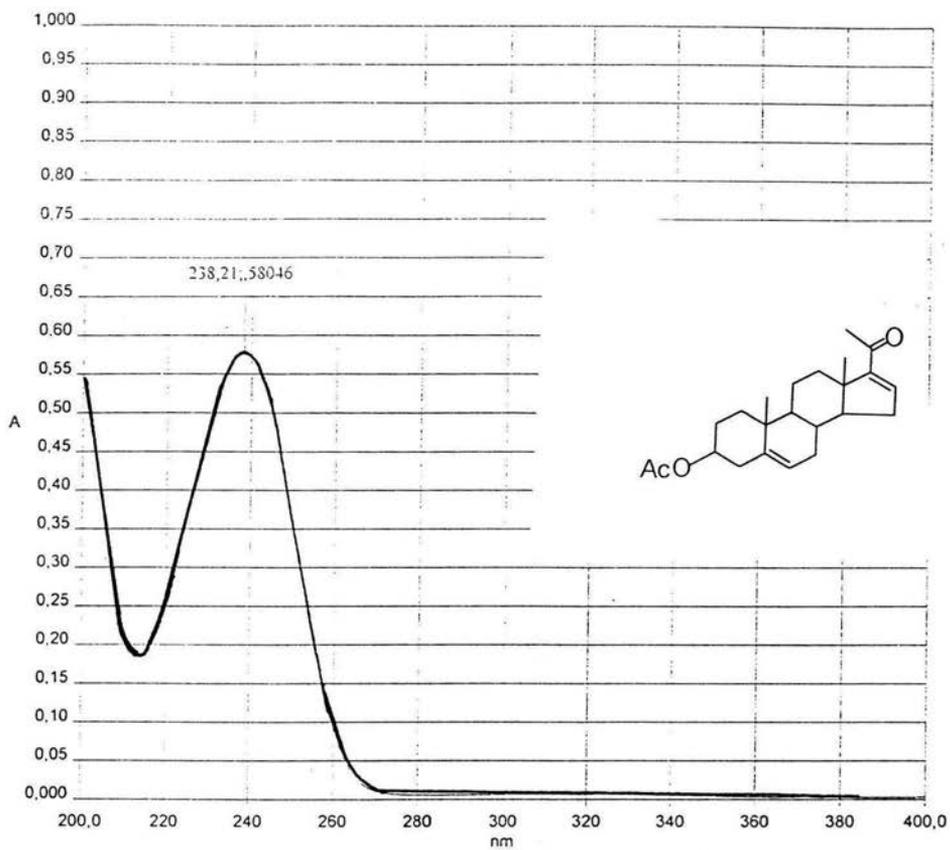
## 8. ANEXO EXPERIMENTAL

## LISTA DE ESPECTROS.

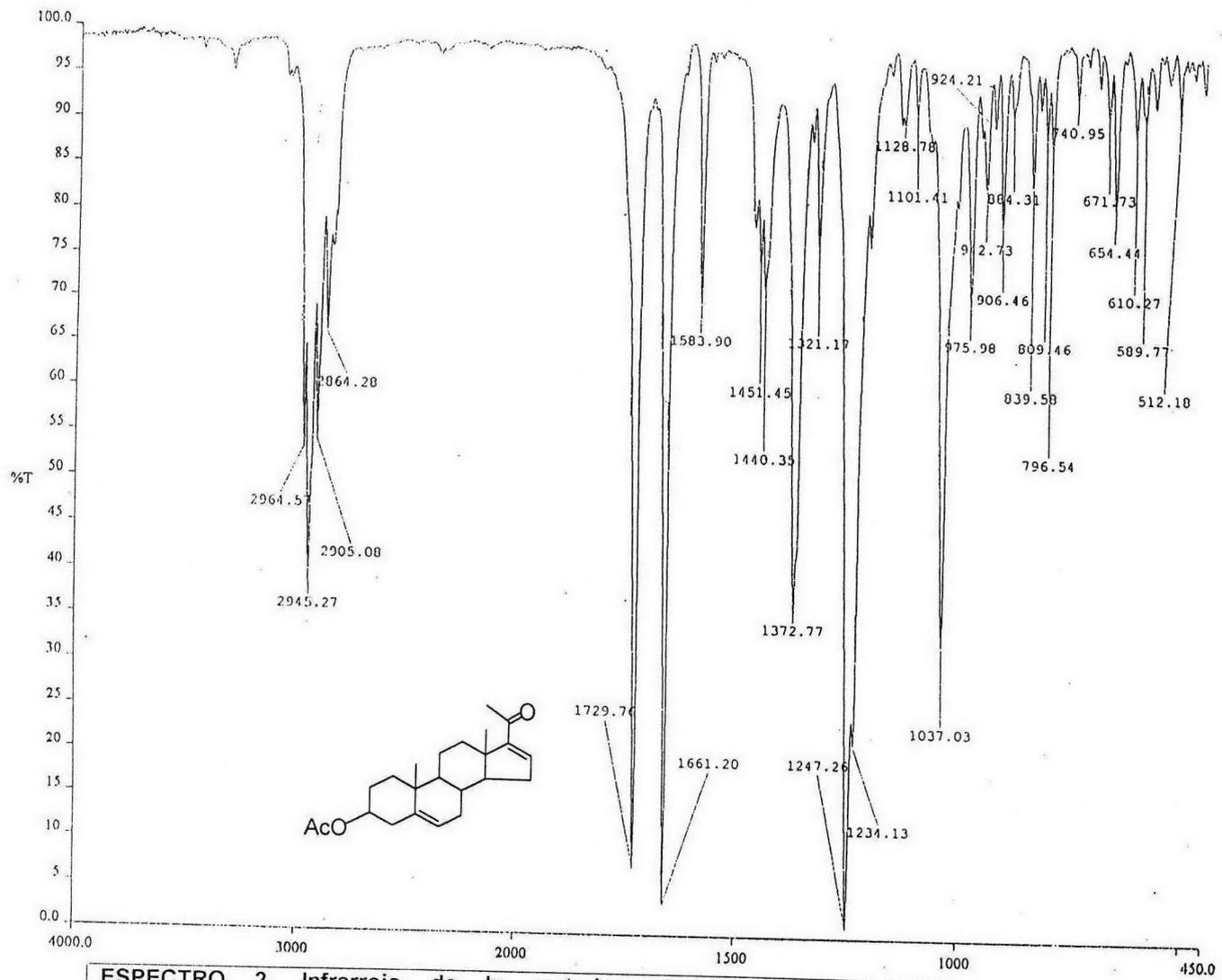
| Espectro | Contenido   |
|----------|---|
| 1        | Ultravioleta de la materia prima: Acetato de 16-dehidropregnenolona (I).  |
| 2        | Infrarrojo de la materia prima: Acetato de 16-dehidropregnenolona (I).  |
| 3        | Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ de la materia prima: Acetato de 16-dehidropregnenolona (I).   |
| 4        | Infrarrojo del compuesto 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).  |
| 5        | Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ del compuesto 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).             |
| 6        | Infrarrojo del compuesto 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (III).   |
| 7        | Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ del compuesto 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (III).            |
| 8        | Infrarrojo del compuesto 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV).                                   |
| 9        | Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ del compuesto 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV).    |
| 10       | Infrarrojo del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -metil-5-pregнено (V).                                   |
| 11       | Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -metil-5-pregнено (V).    |
| 12       | Infrarrojo del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -metil -5-pregnen-20 -ona (VI).   |
| 13       | Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -metil -5-pregnen-20 -ona (VI).          |
| 14       | Ultravioleta del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3, 20-diona (VII).   |
| 15       | Infrarrojo del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3, 20-diona (VII).   |
| 16       | Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3, 20-diona (VII).              |
| 17       | Ultravioleta del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII).                              |
| 18       | Infrarrojo del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII).                                |
| 19       | Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII). |
| 20       | RMN $^{13}\text{C}$ normal del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII).                |

|    |   |   |
|----|---|---|
| 21 | DEPT del compuesto                                      | 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII).  |
| 22 | EMIE del compuesto                                      | 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII).  |
| 23 | Ultravioleta del compuesto                              | 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX). |
| 24 | Infrarrojo del compuesto                                | 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX). |
| 25 | Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ del compuesto | 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX). |
| 26 | RMN $^{13}\text{C}$ normal del compuesto                | 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX). |
| 27 | DEPT del compuesto                                      | 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX). |
| 28 | EMIE del compuesto                                      | 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX). |

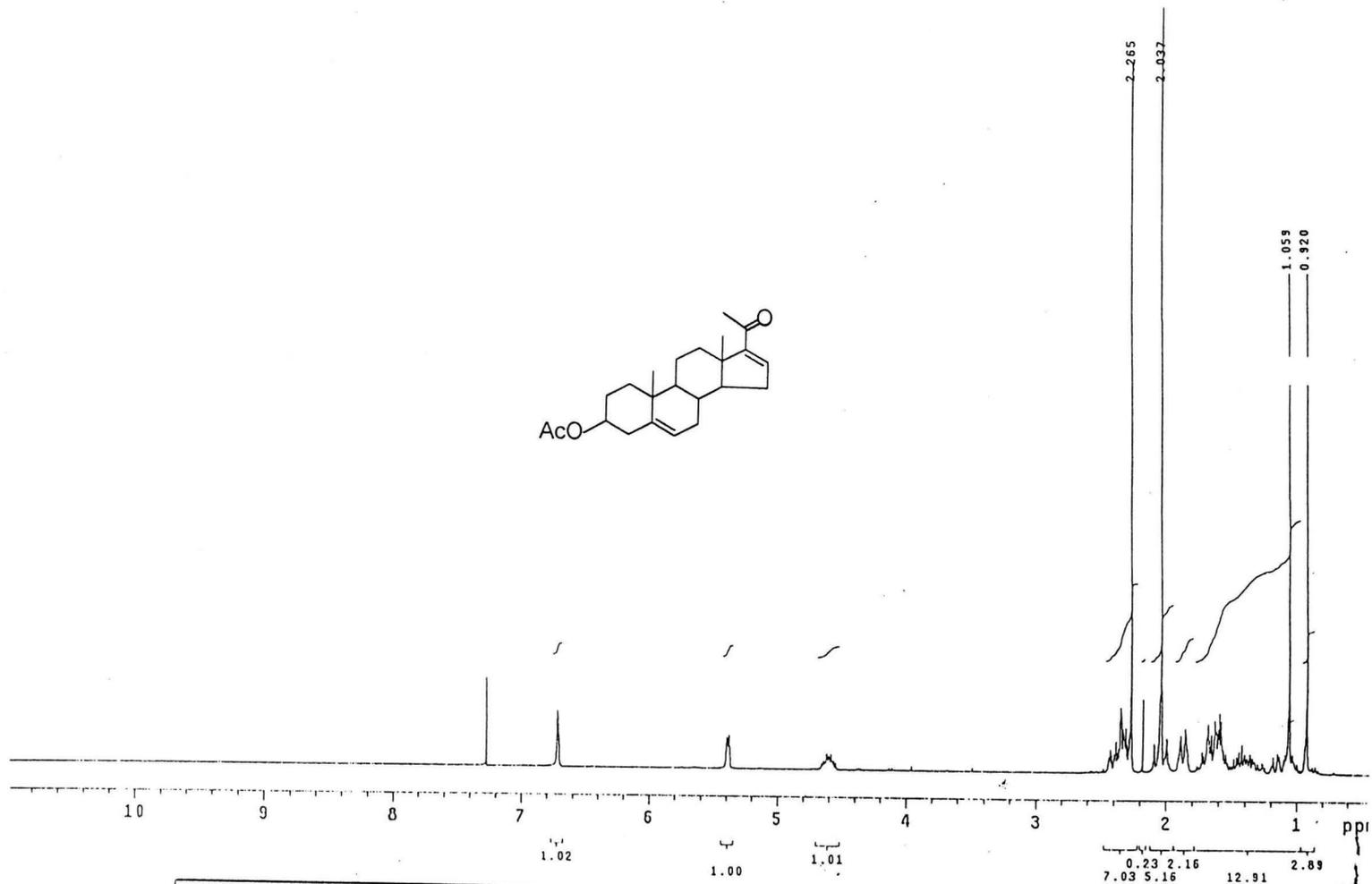
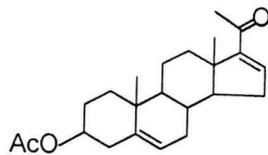
# ESPÉCTROS.



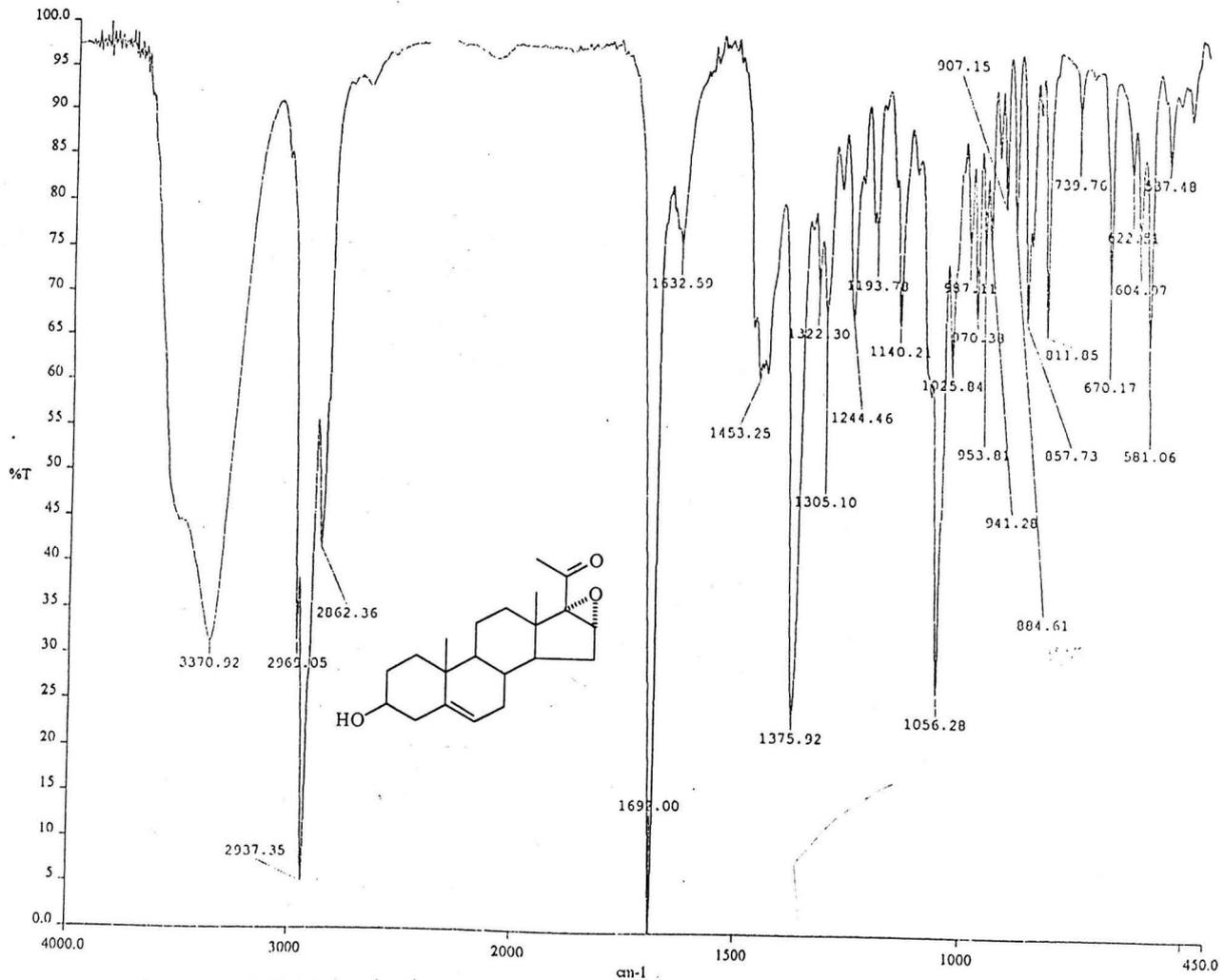
ESPECTRO 1. Ultravioleta de la materia prima: Acetato de 16-deihidropregnenolona (I).



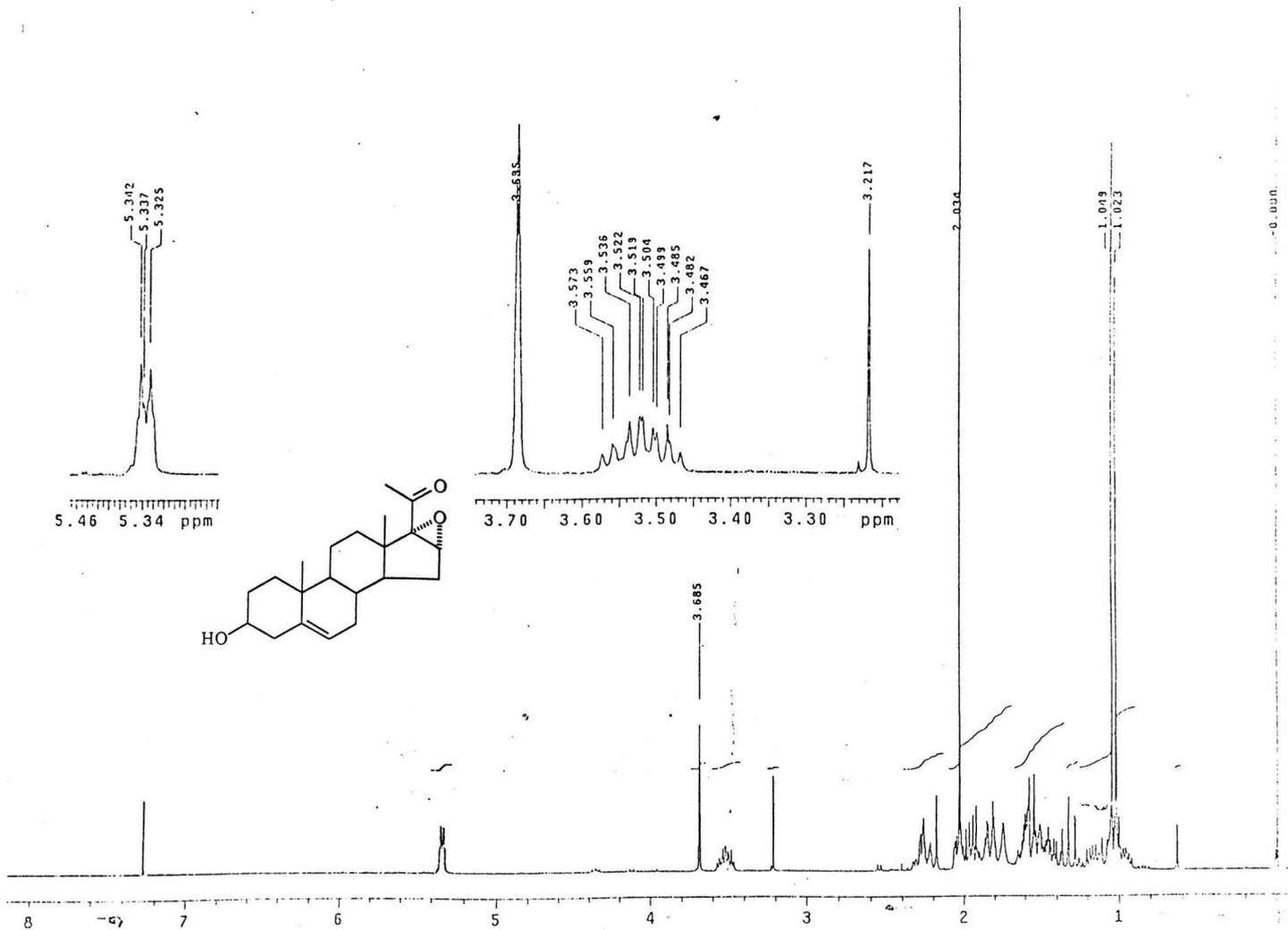
**ESPECTRO 2. Infrarrojo de la materia prima: Acetato de 16-dehidropregnenolona (I).**



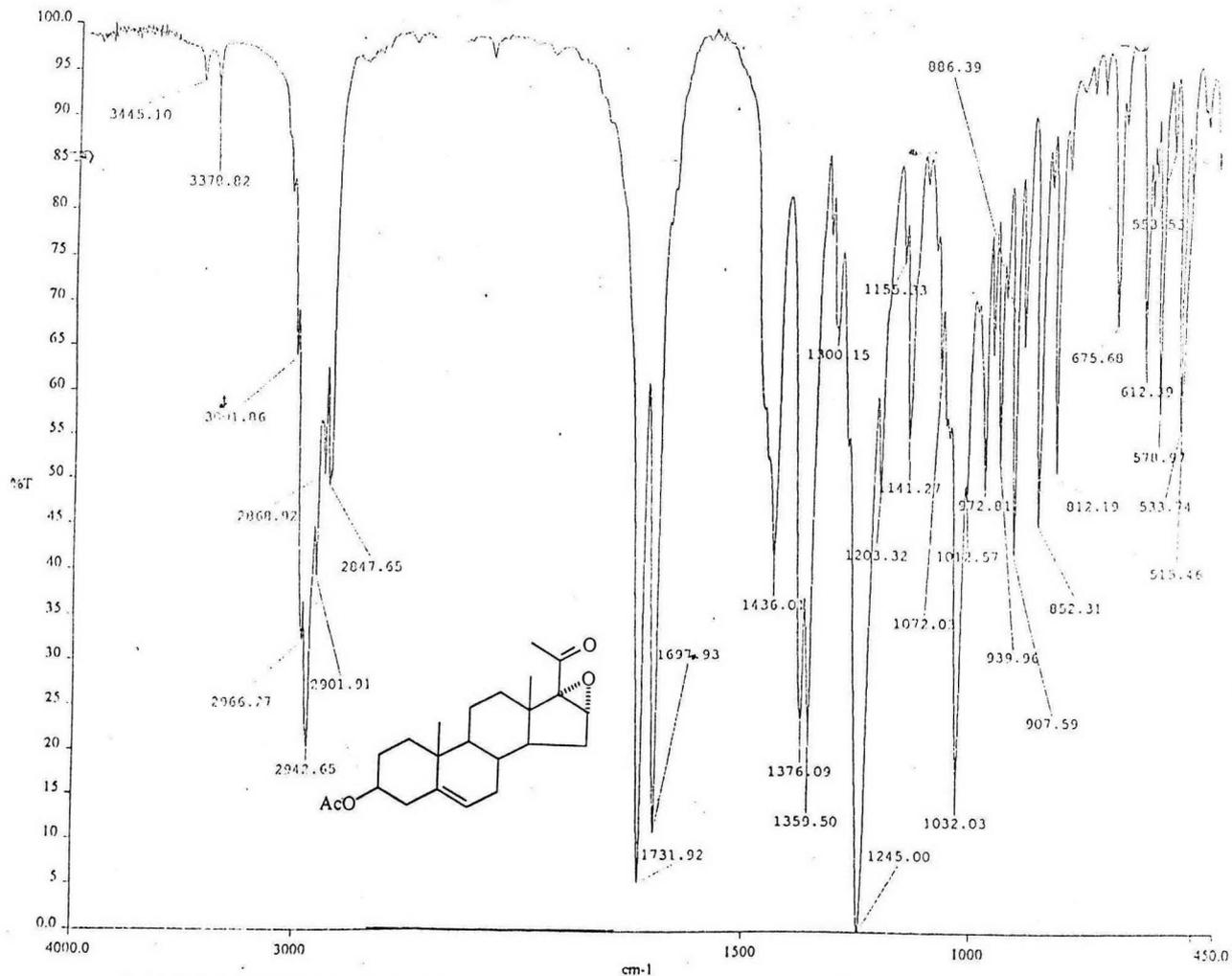
ESPECTRO 3. Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  de la materia prima: Acetato de 16-dehidropregnenolona (I).



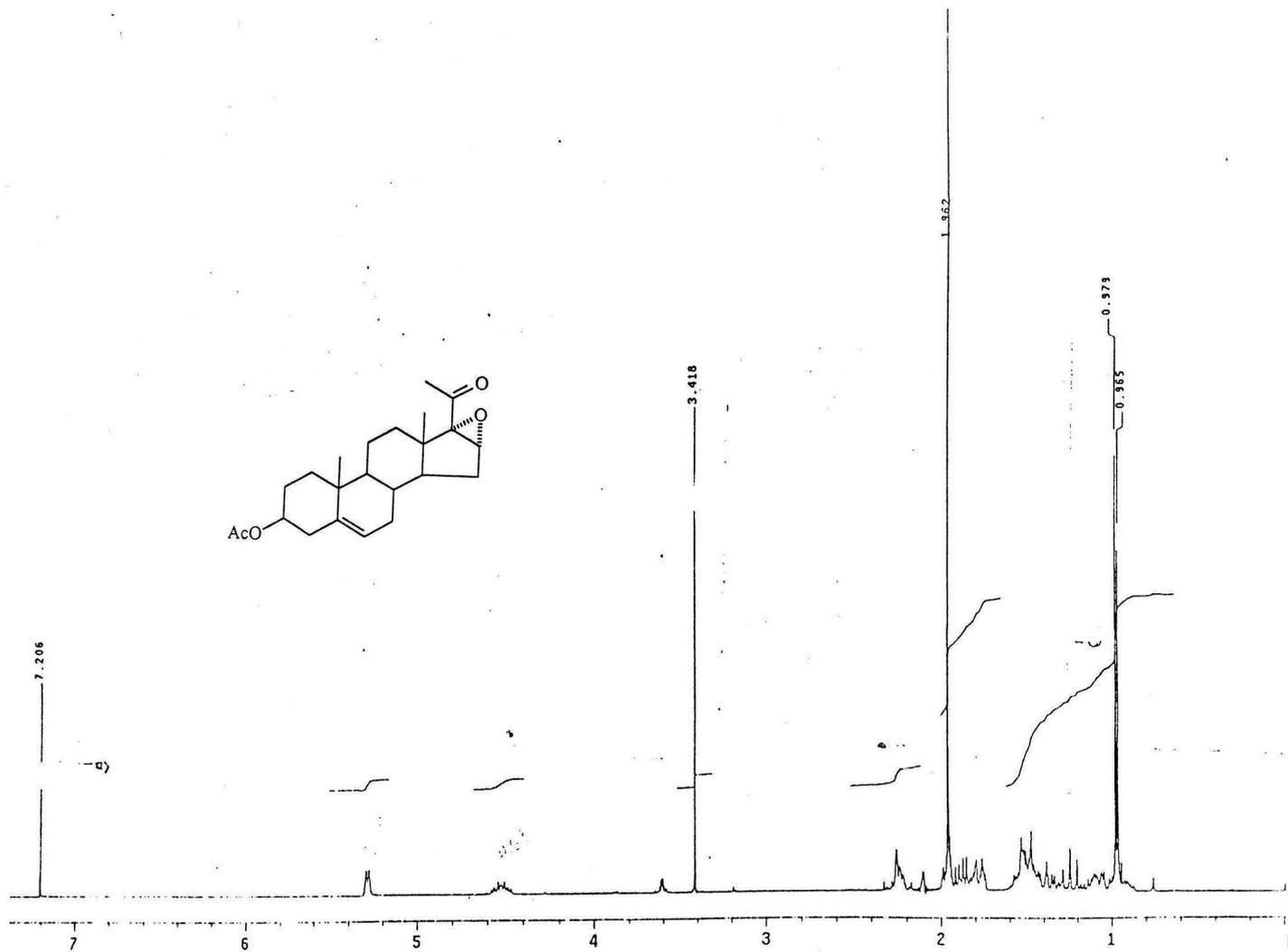
ESPECTRO 4. Infrarrojo del compuesto 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).



ESPECTRO 5. Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  del compuesto 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).

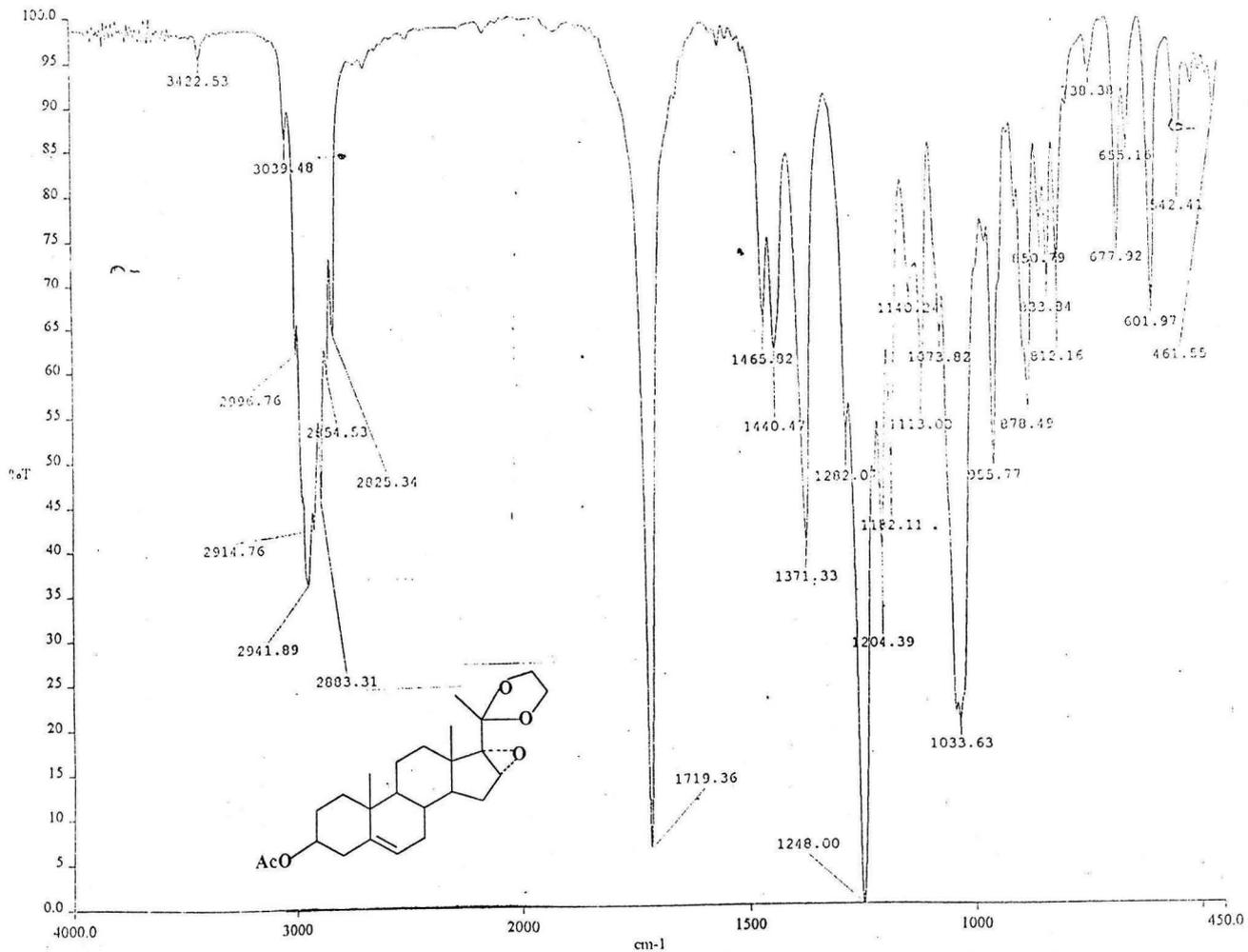


ESPECTRO 6. Infrarrojo del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (III).

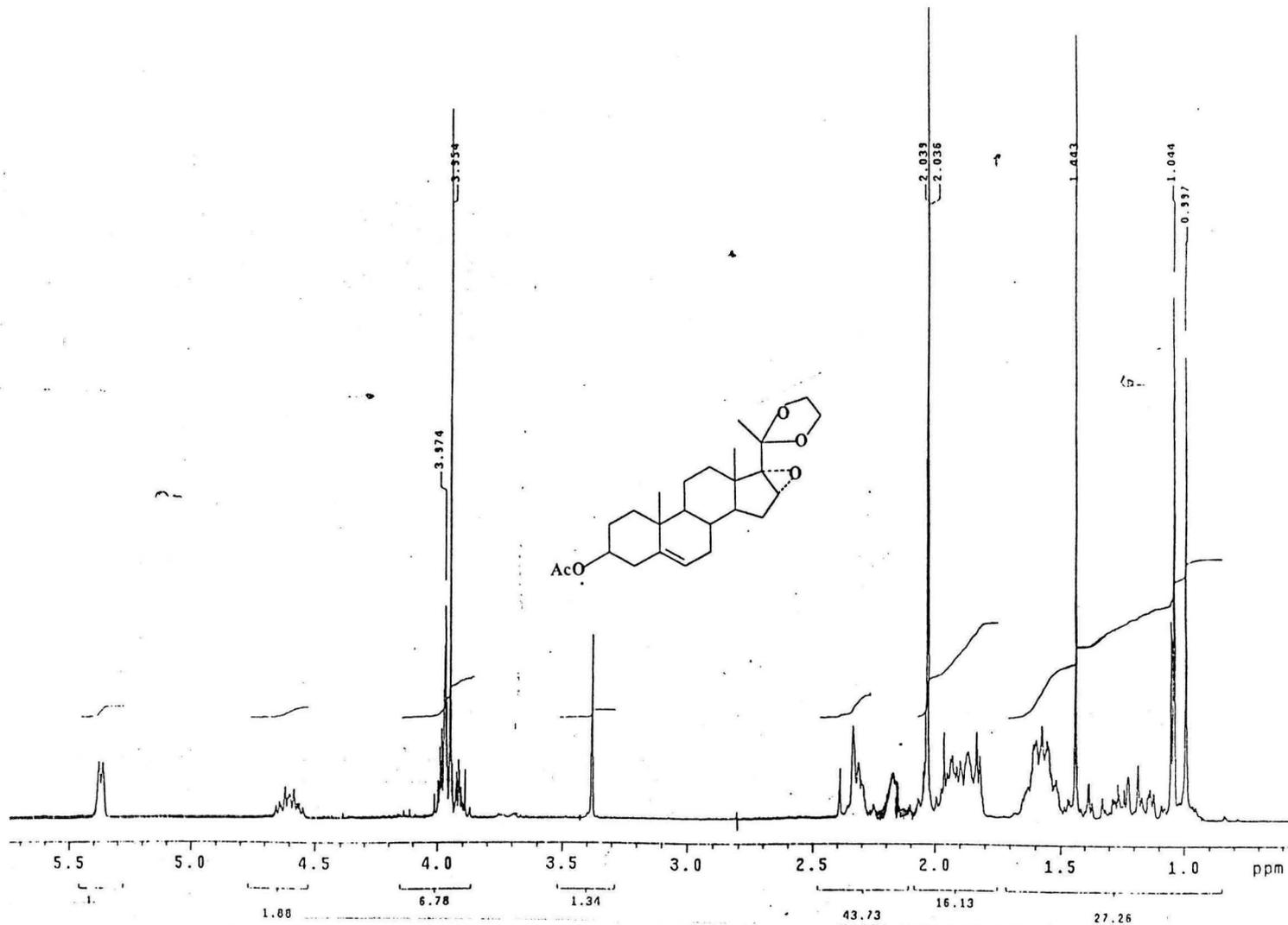


ESPECTRO 7. Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup>H del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-5-pregnon-20-ona (III).

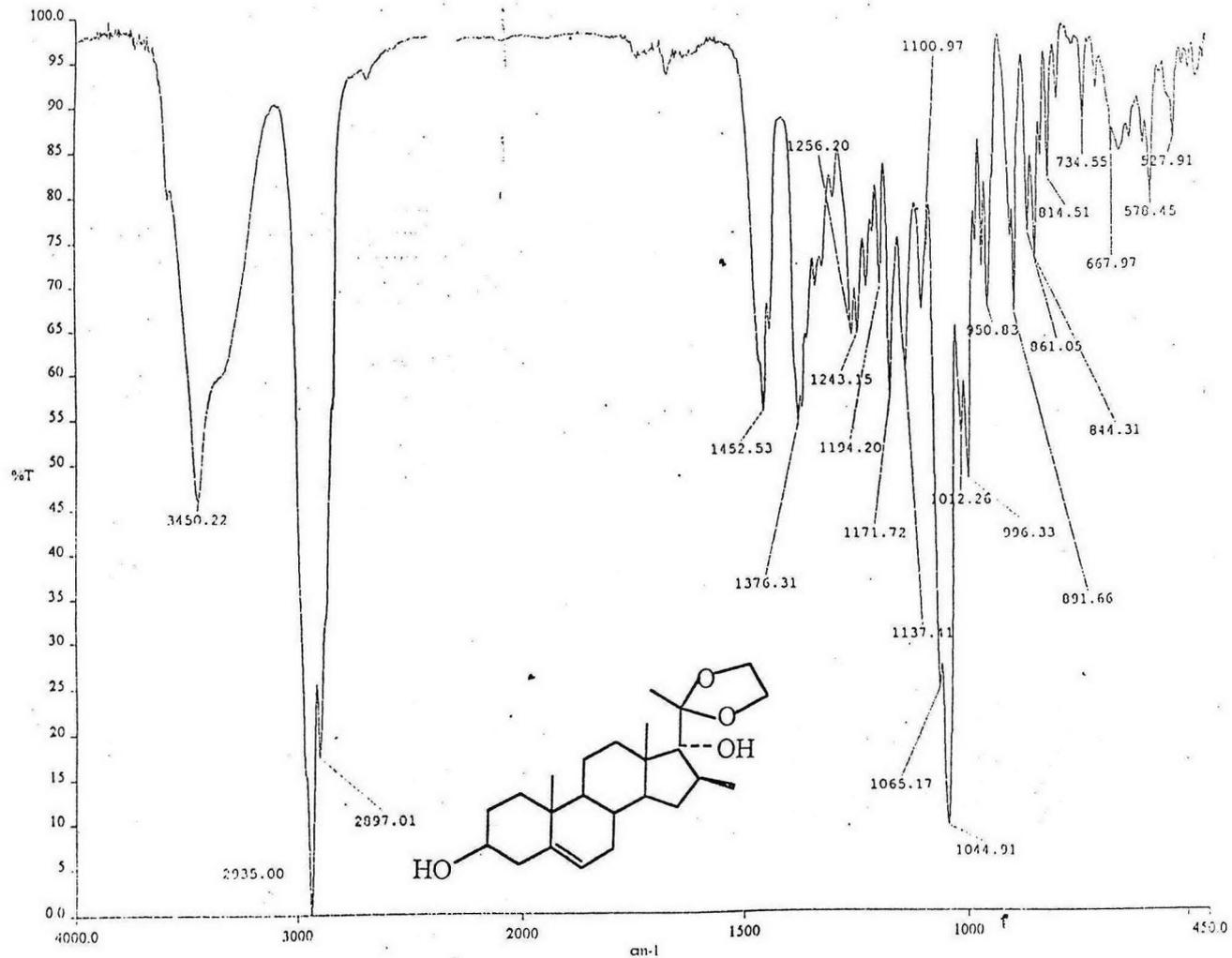
44.70



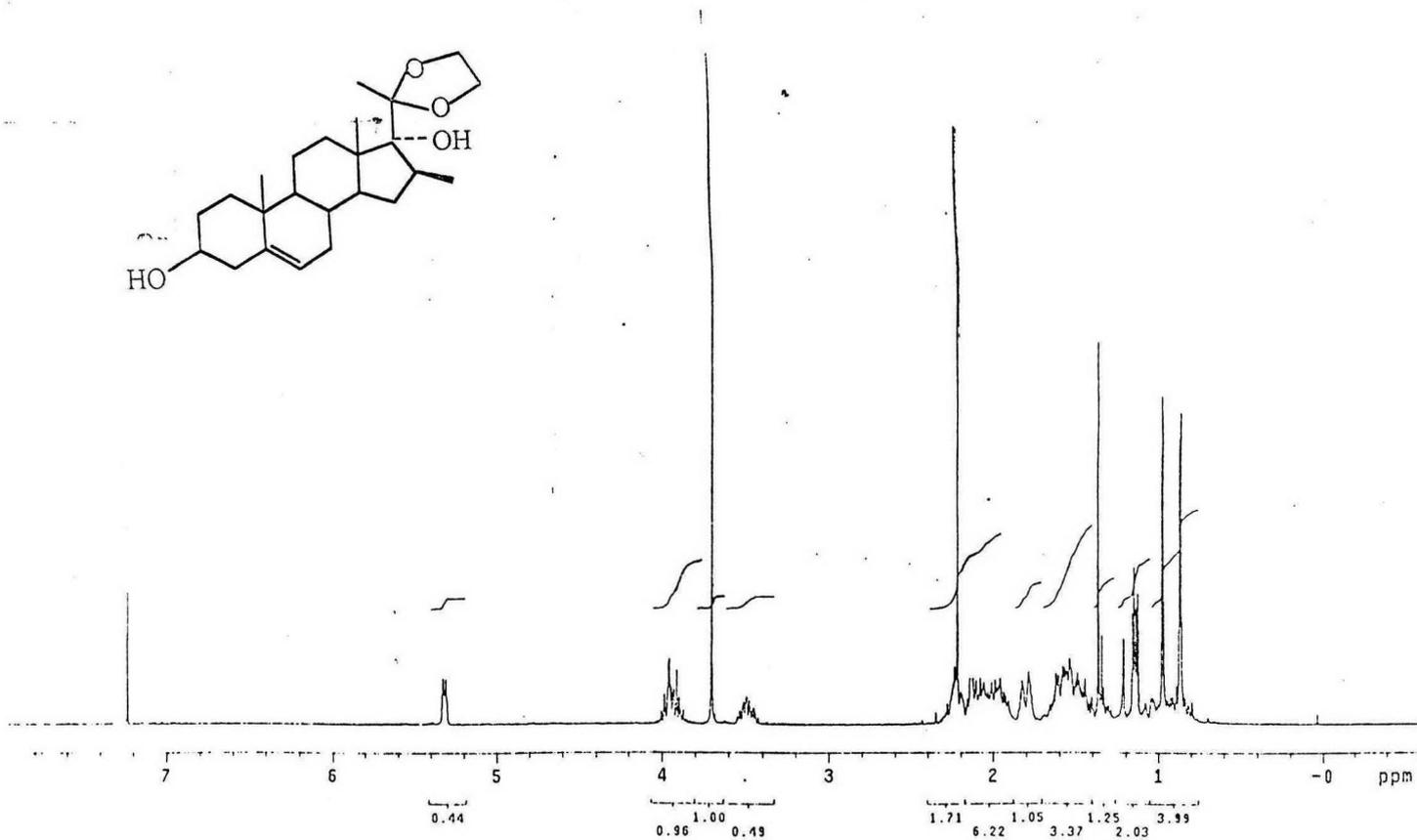
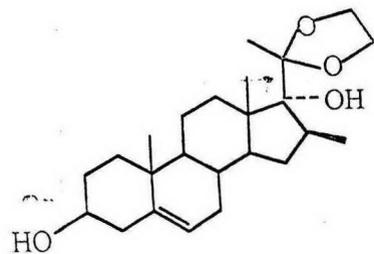
**ESPECTRO 8. Infrarrojo del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-20-etilendioxi-5-pregneno (IV).**



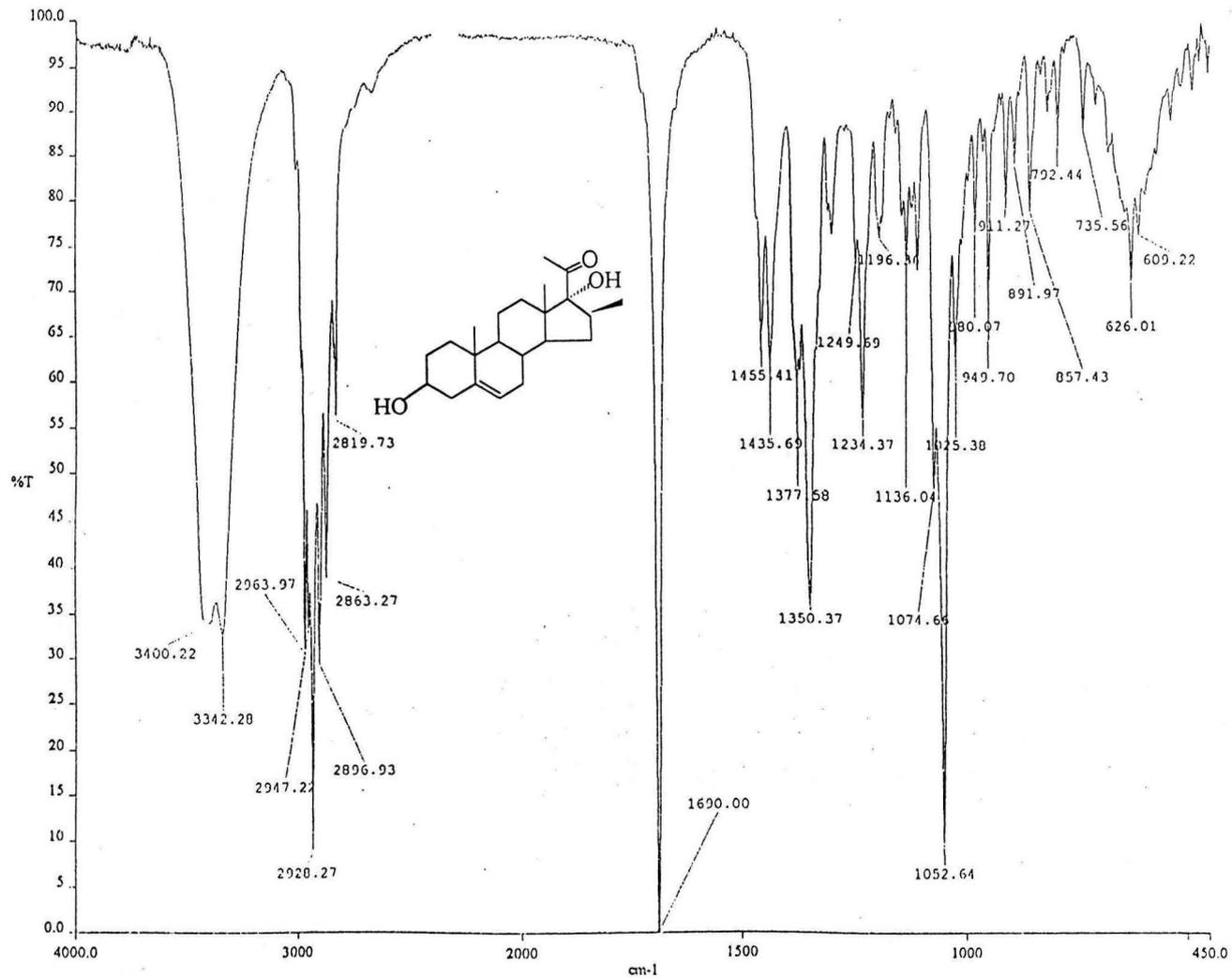
ESPECTRO 9. Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup>H del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-20-etilendioxi-5-pregnen-20-one (IV).



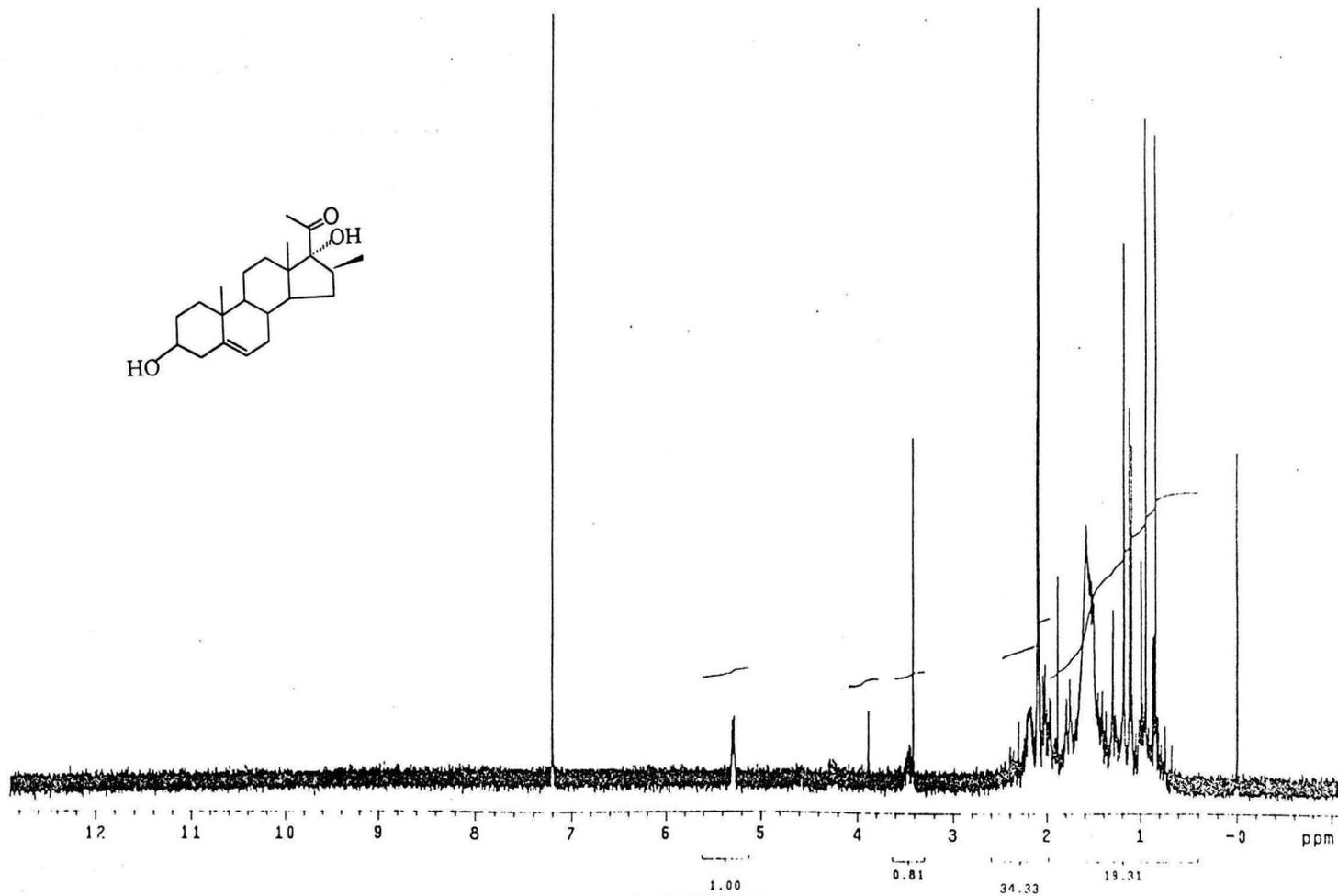
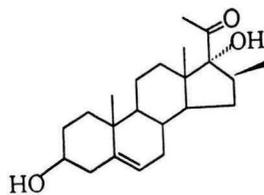
ESPECTRO 10. Infrarrojo del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-20-etilendioxi-16β-metil-5-pregнено (V).



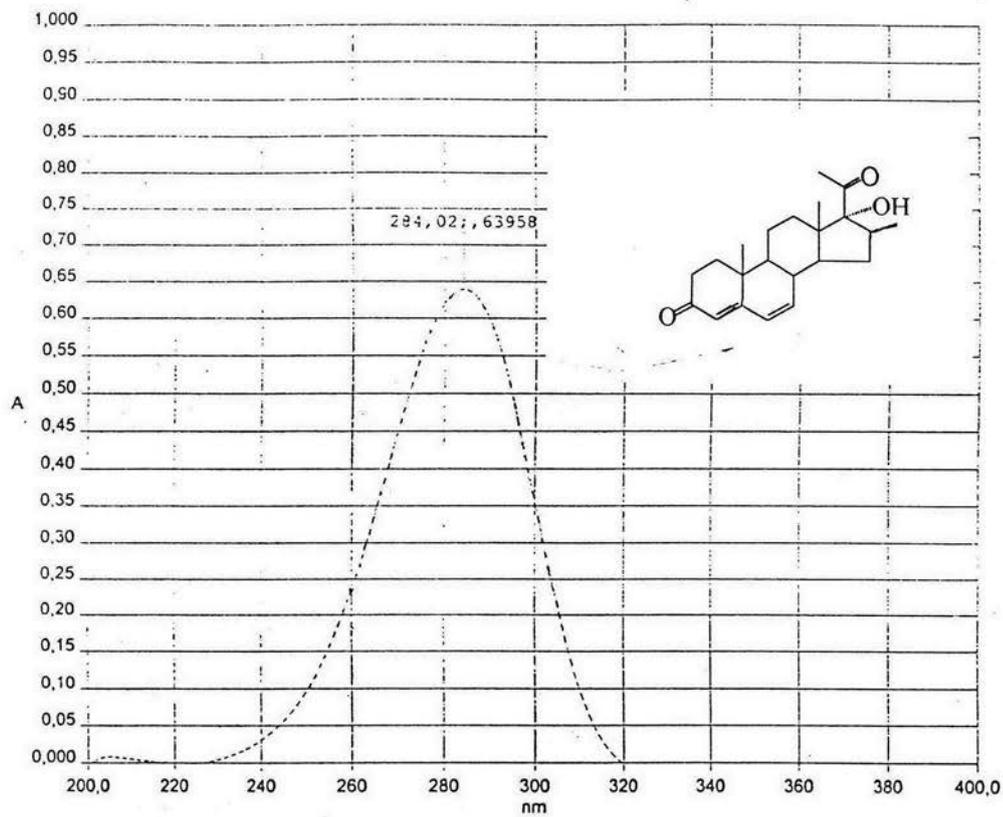
ESPECTRO 11. Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  del compuesto  $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi-20-etil-dicxi-16 $\beta$ -metil-5-pregнено (V).



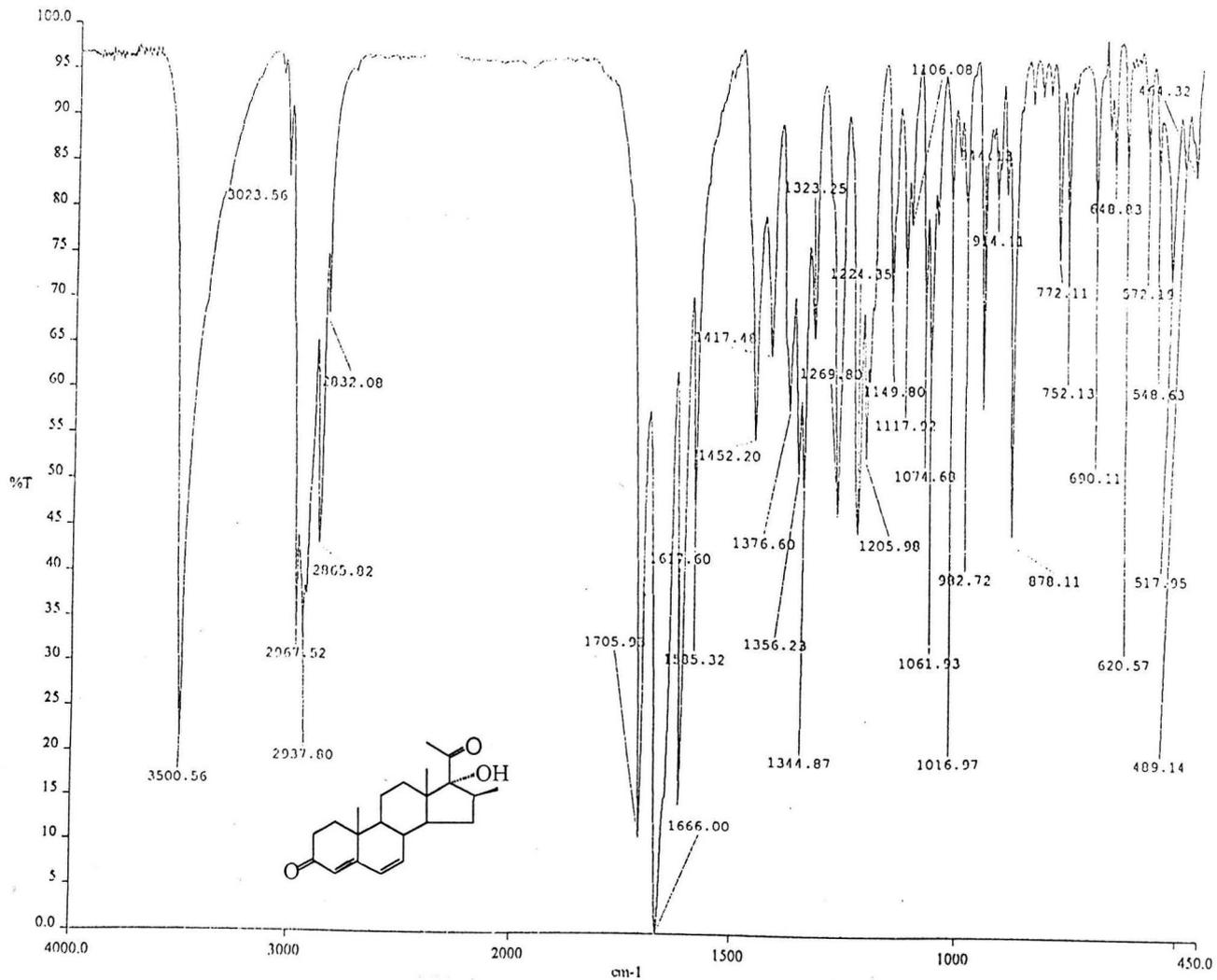
ESPECTRO 12. Infrarrojo del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-5-pregnen-2α-ona (VI).



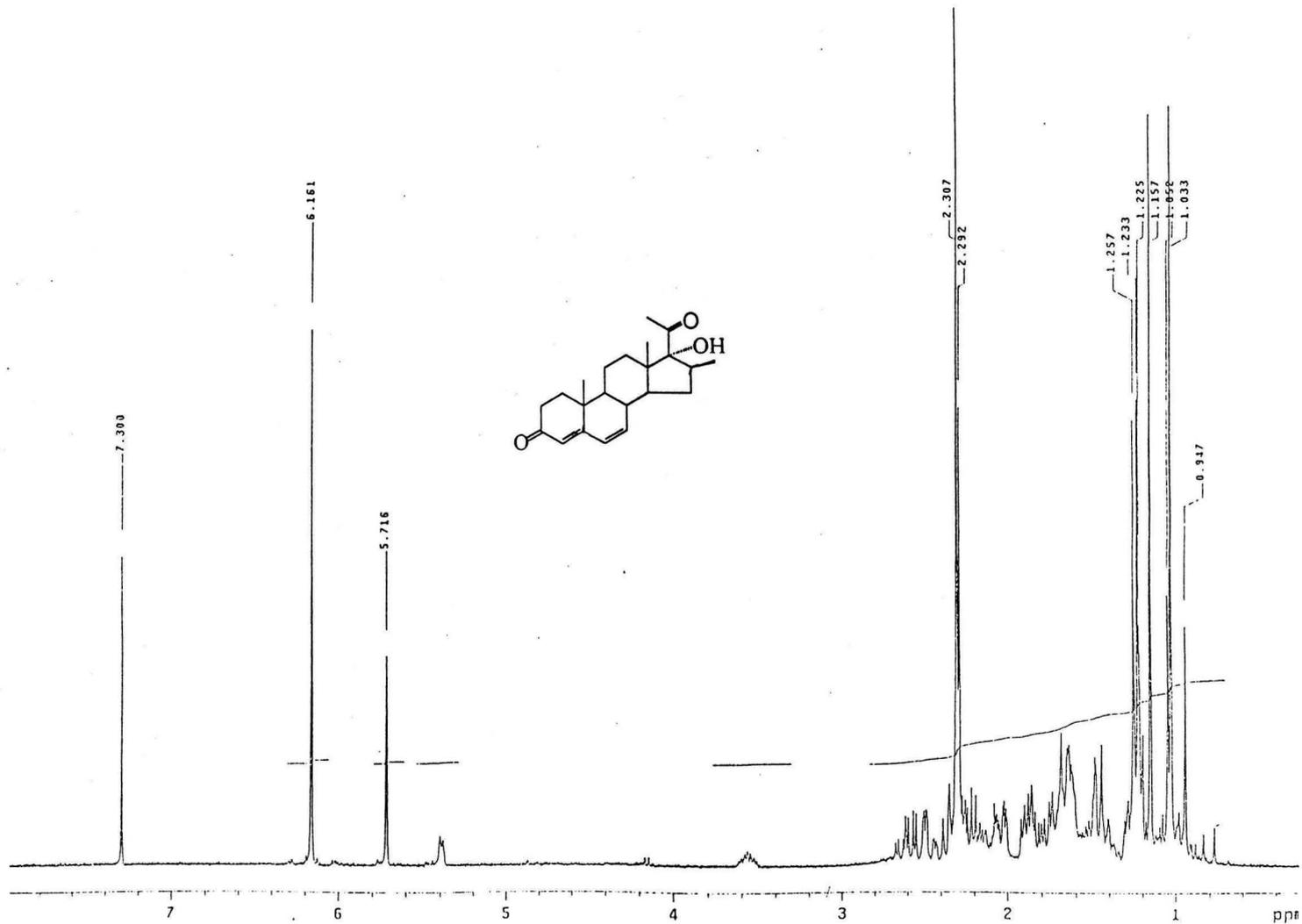
ESPECTRO 13. Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\alpha$ -metil-5-pregnen-20-ona (VI).



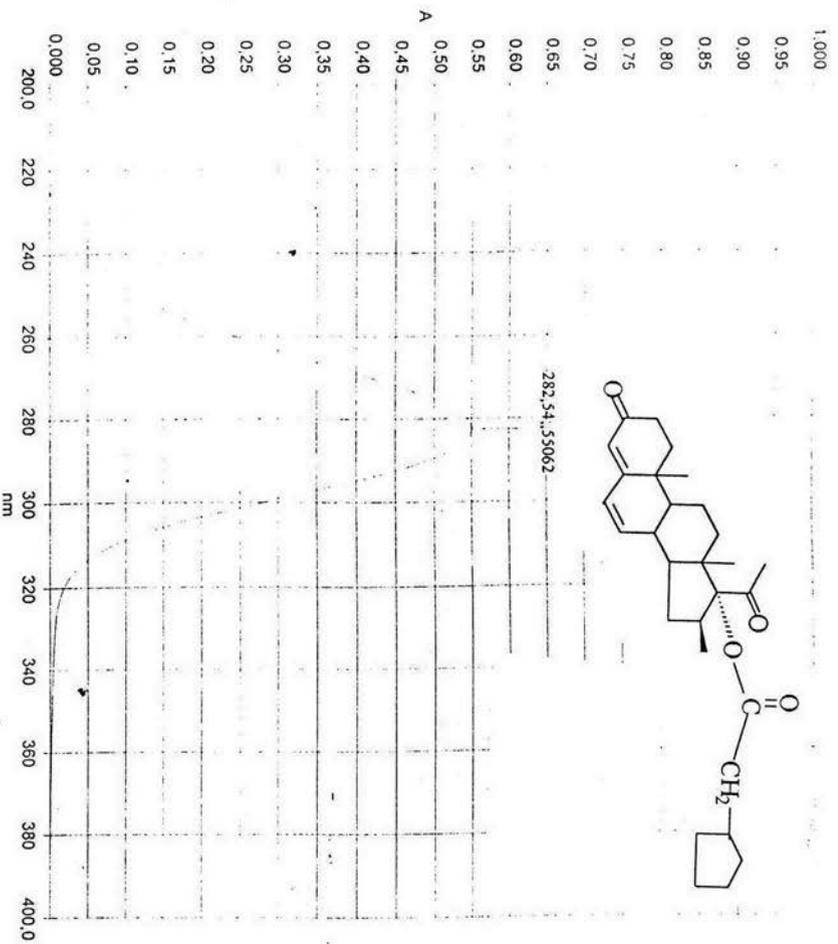
ESPECTRO 14. Ultravioleta del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3, 20-diona (VII).



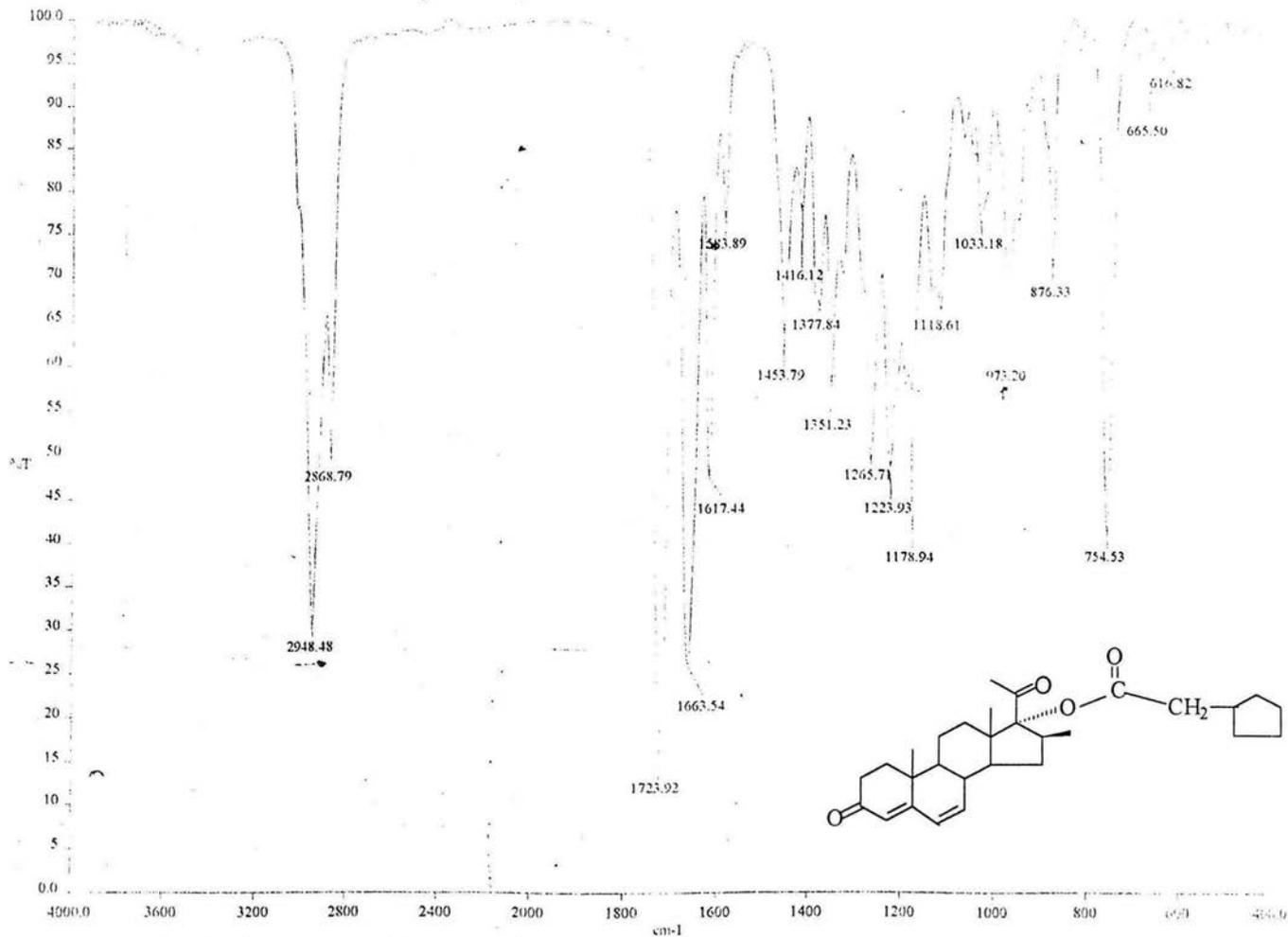
**ESPECTRO 15. Infrarrojo del compuesto 17 $\alpha$ -hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VII).**



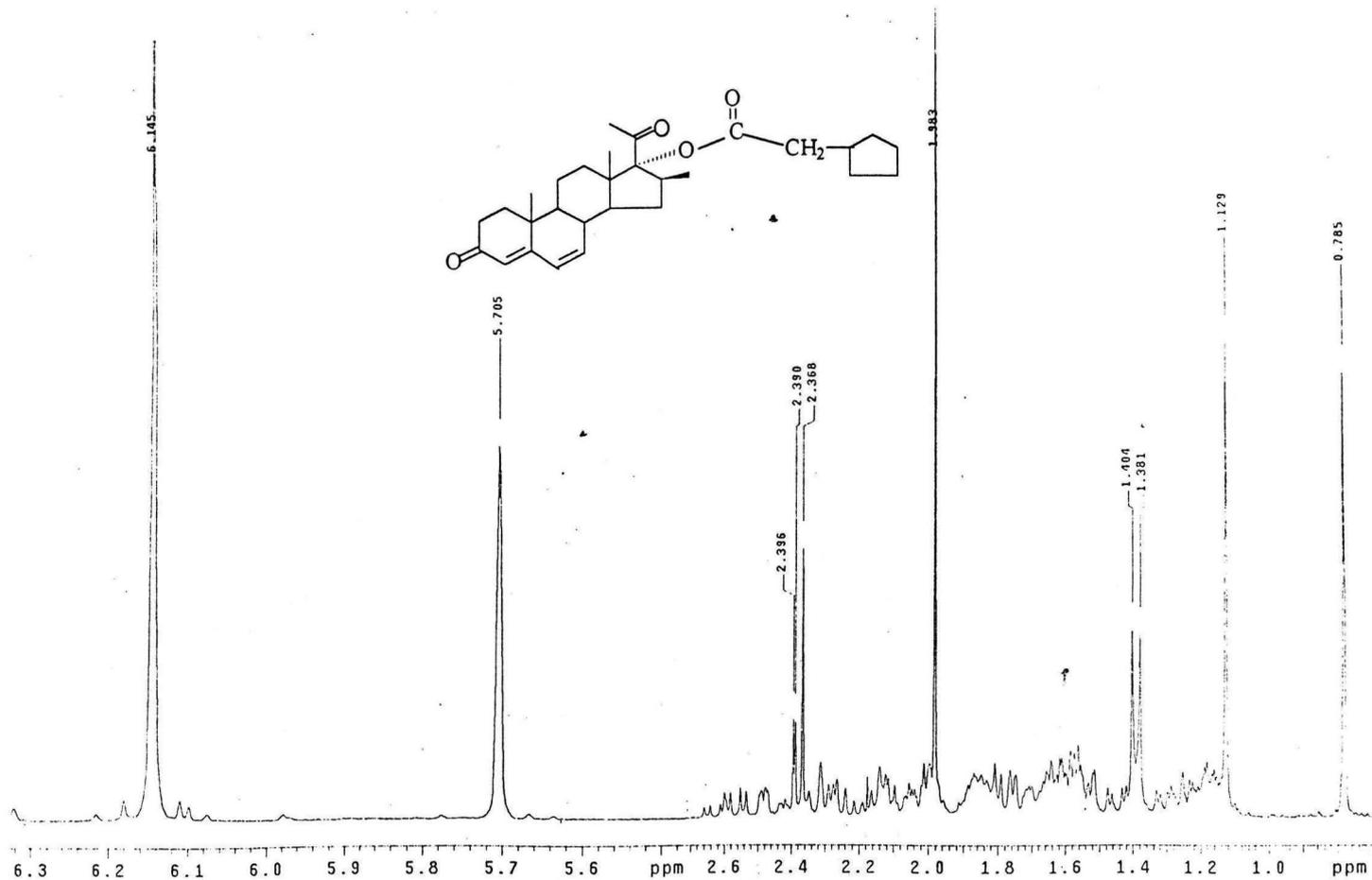
ESPECTRO 16. Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup>H del compuesto 17α-hidroxi-16β-metil-4,6-pregnadien-3, 20-diona (VII).



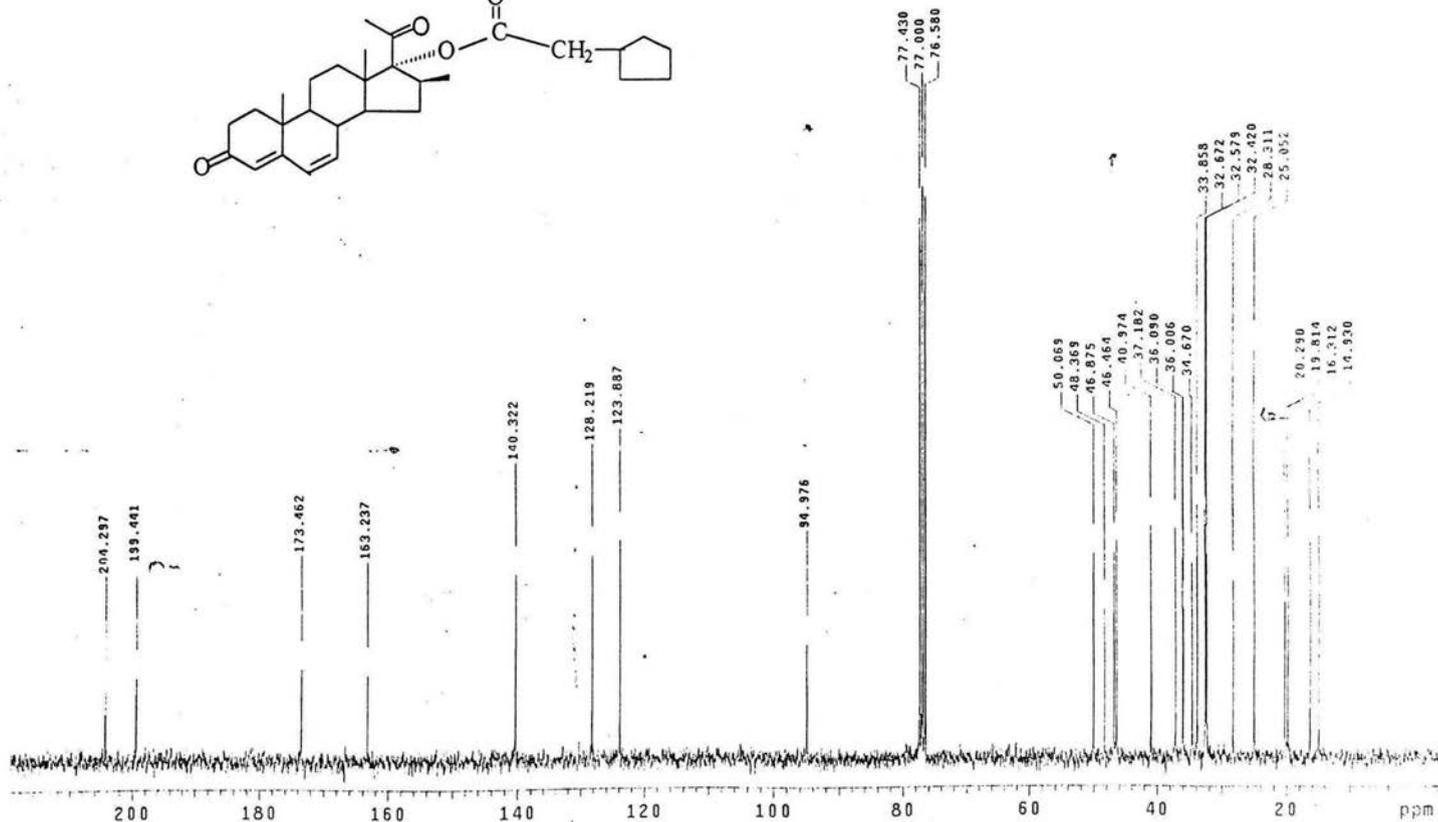
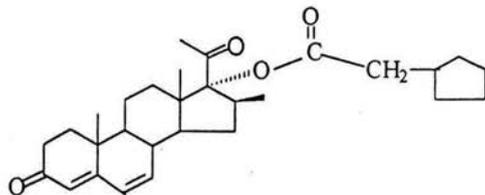
**ESPECTRO 17.** Ultravioleta del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII).



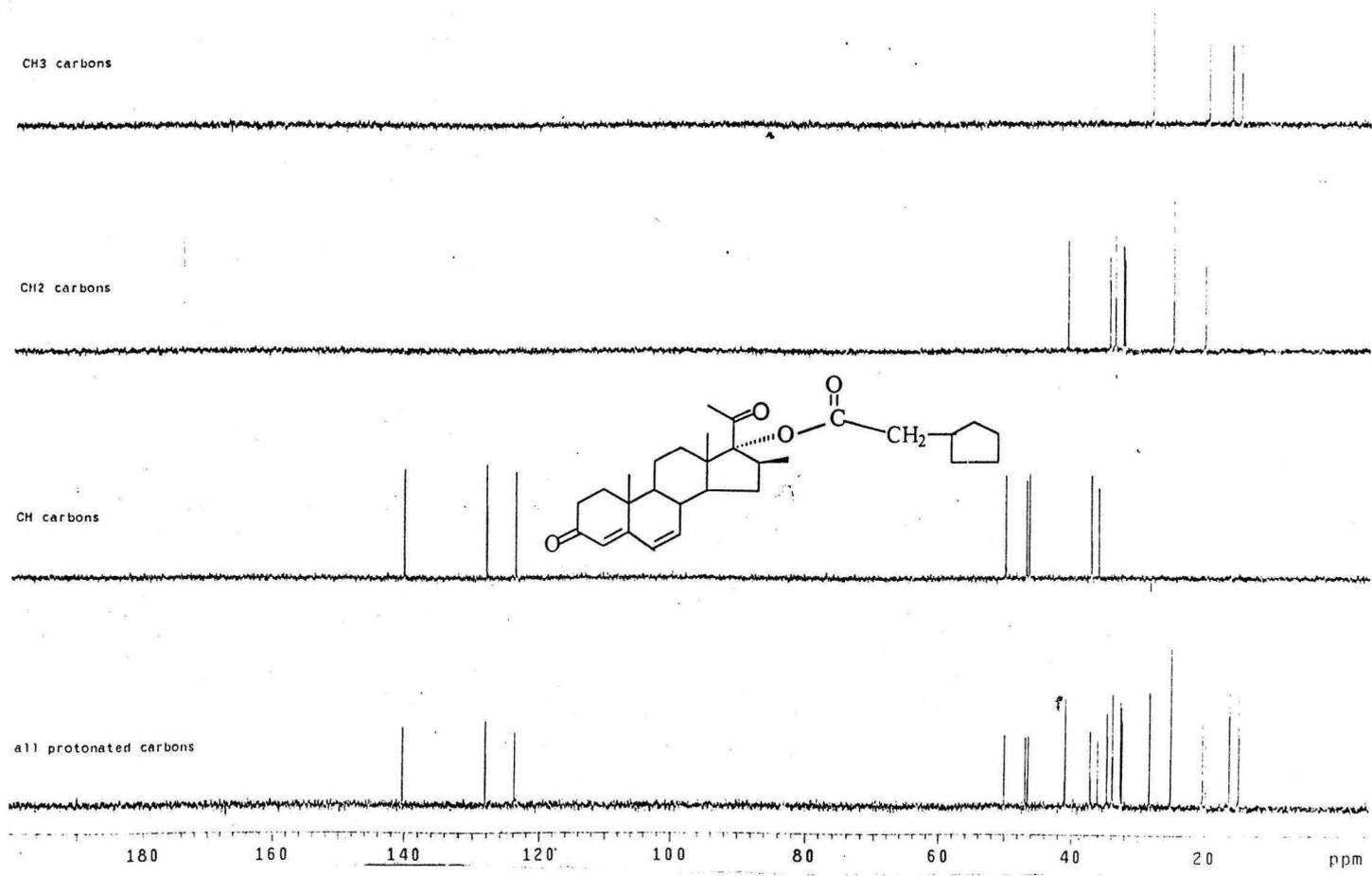
**ESPECTRO 18. Infrarrojo del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII).**



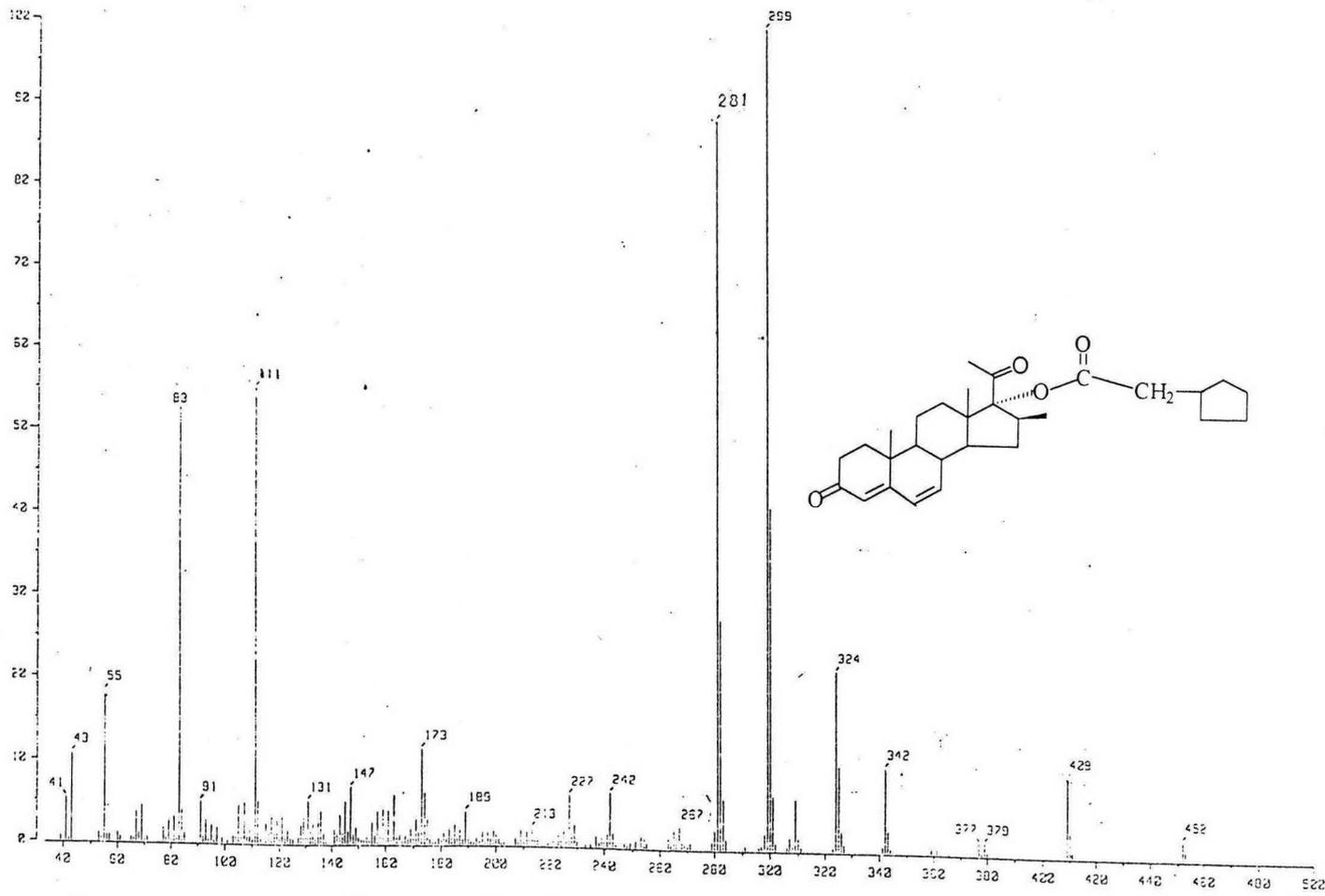
ESPECTRO 19. Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup>H del compuesto 17α-ciclopentilacetoi-16β-metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII).



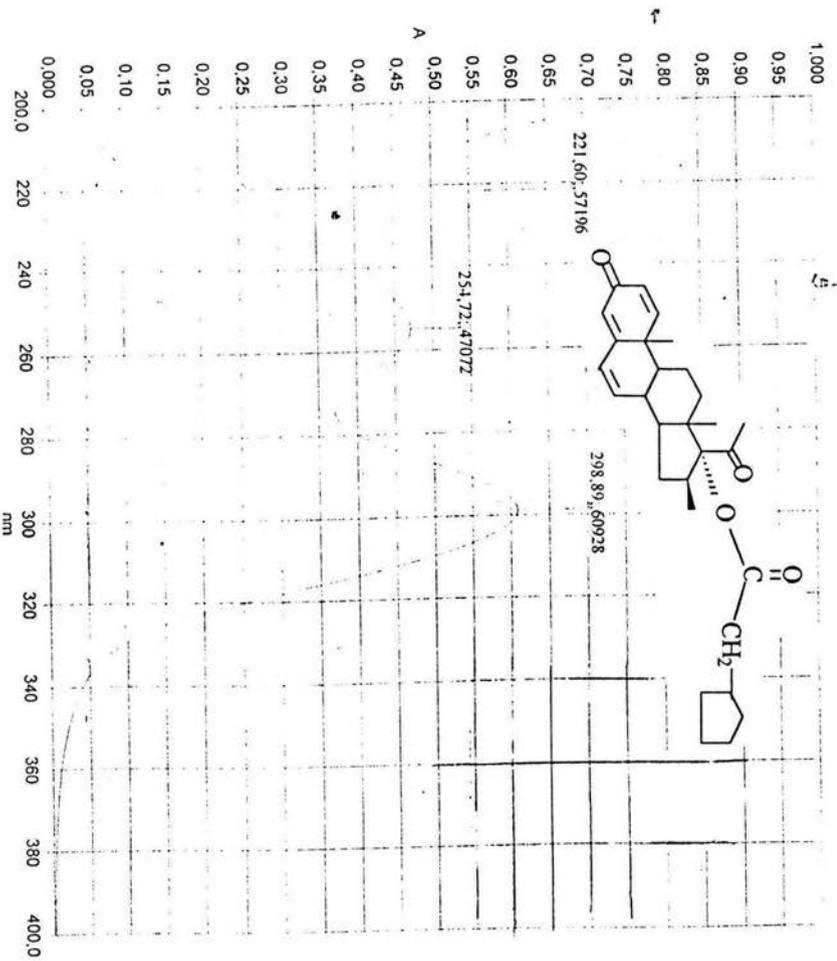
ESPECTRO 20. RMN  $^{13}\text{C}$  normal del compuesto  $17\alpha$ -ciclopentilacetiloxi- $16\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII).



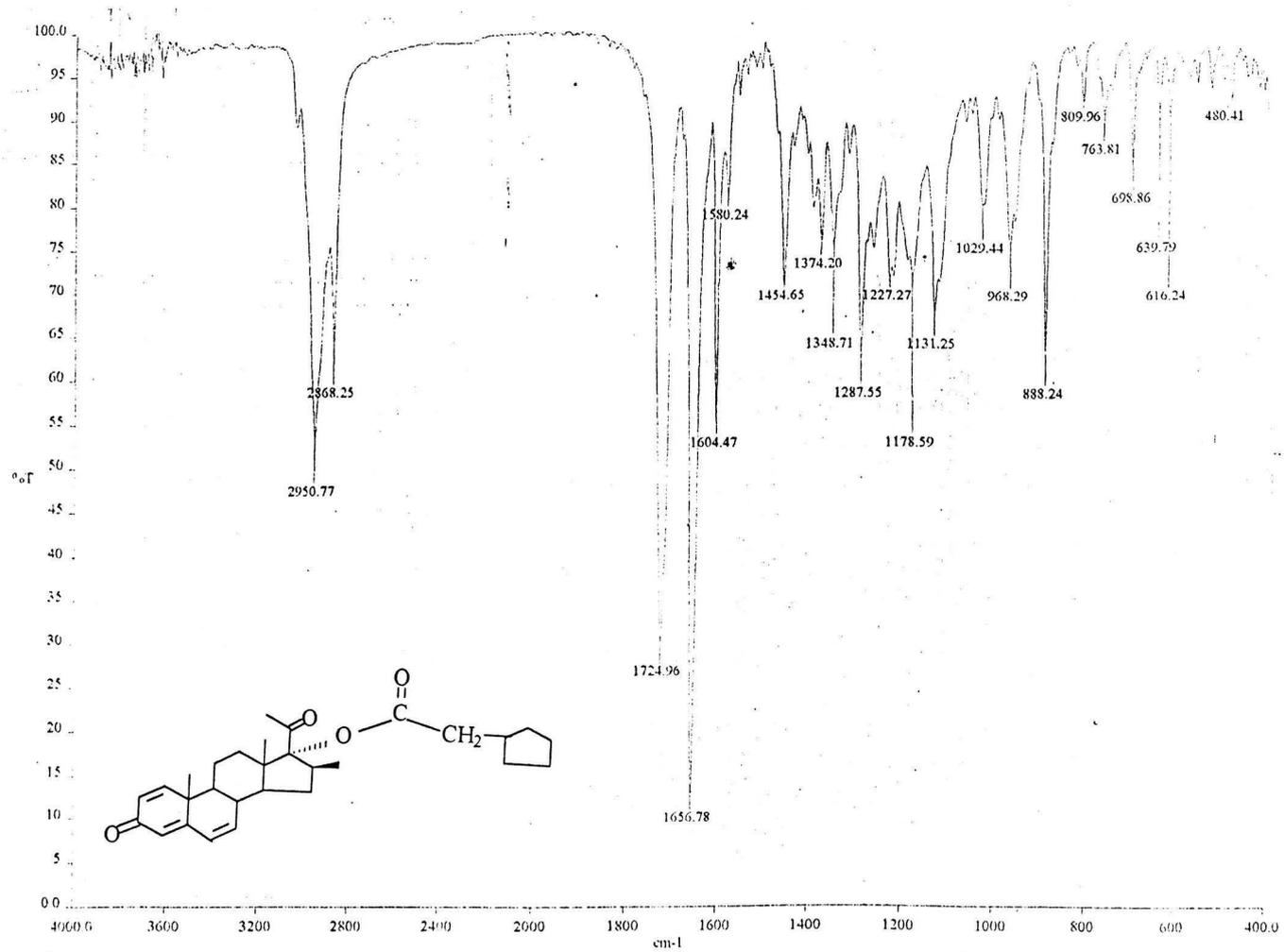
ESPECTRO 21. DEPT del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII).



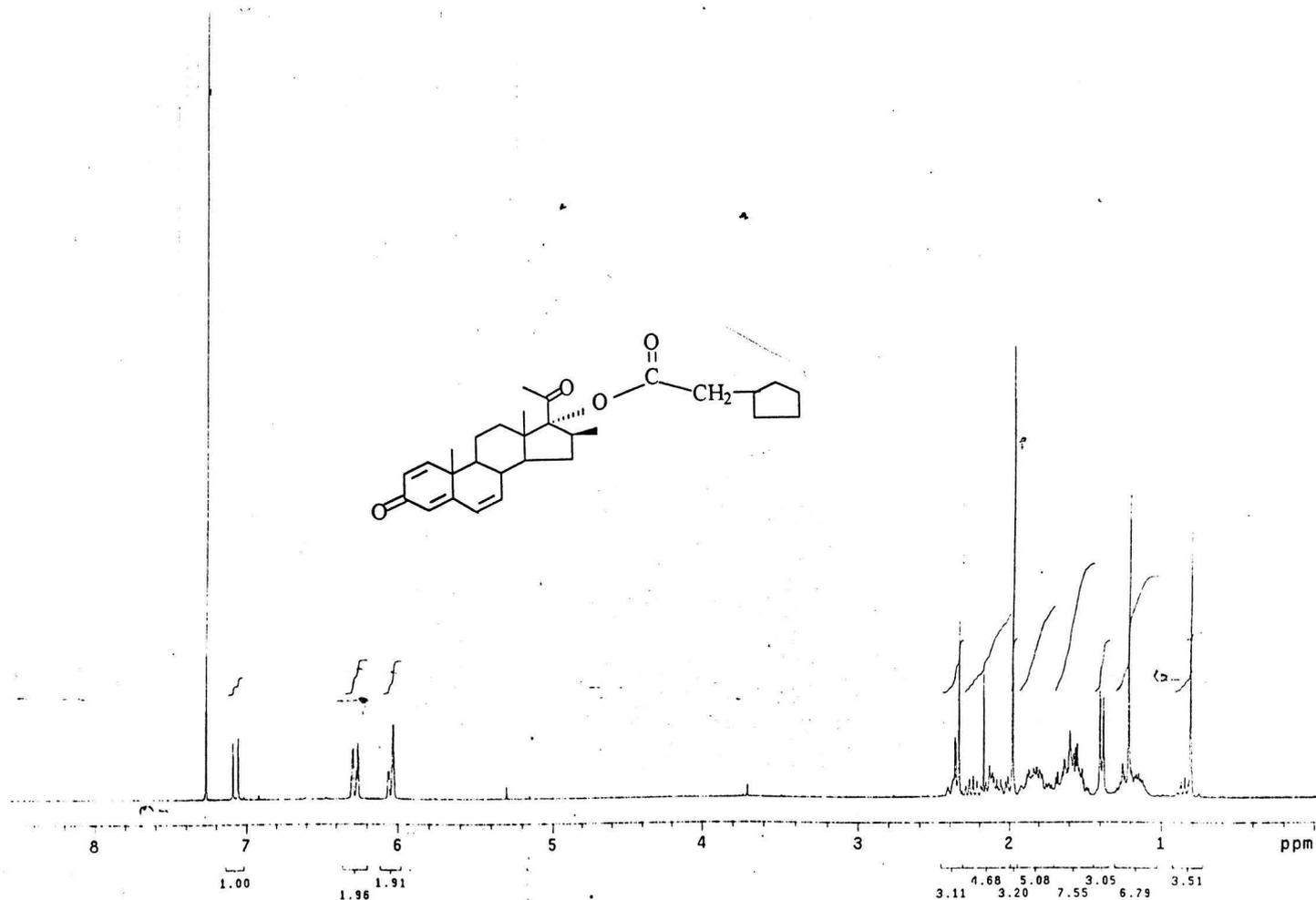
ESPECTRO 22. EMIE del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoi-oxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (VIII).



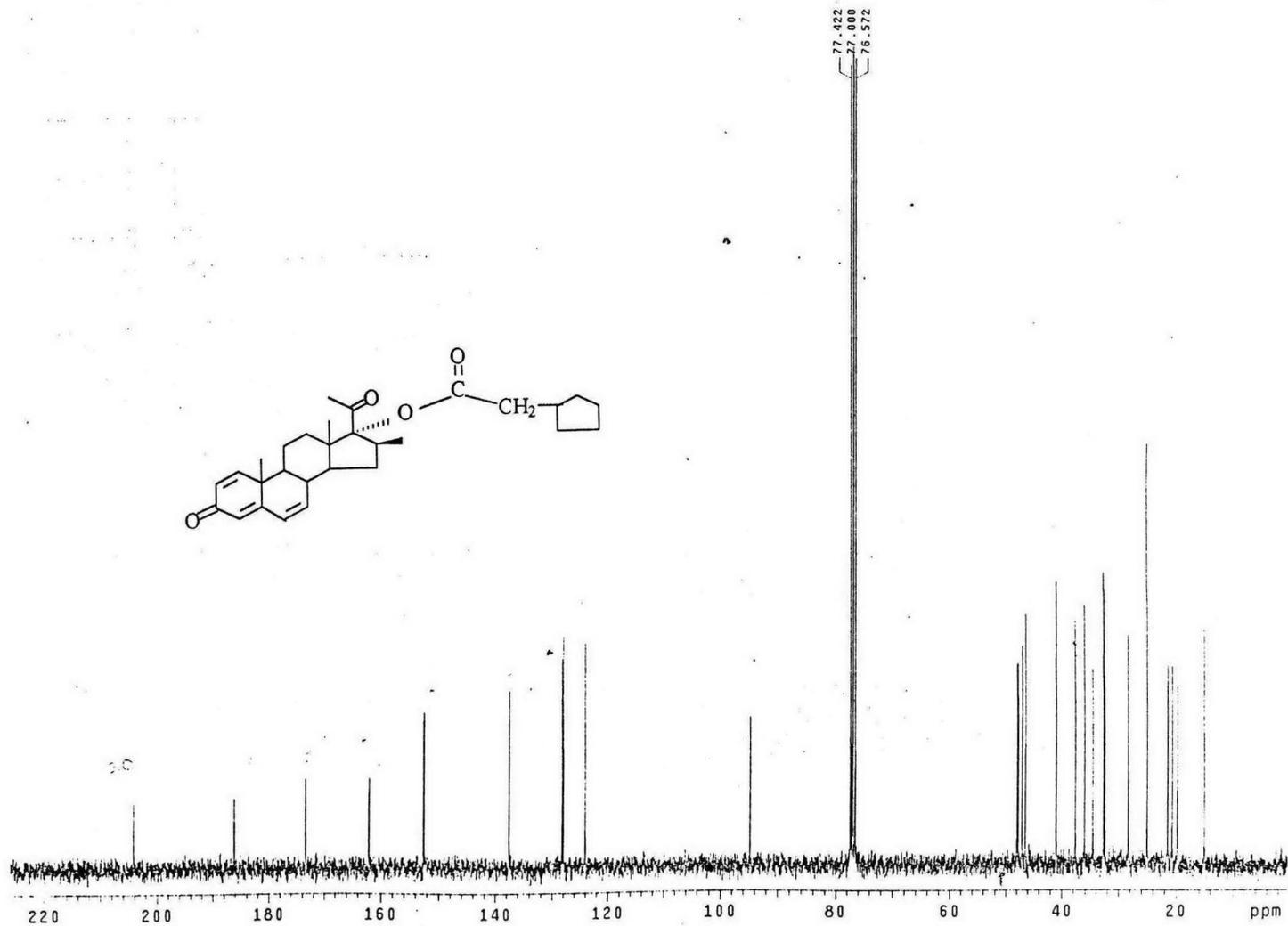
**ESPECTRO 23. Ultravioleta del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoxiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX).**



**ESPECTRO 24. Infrarrojo del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX).**

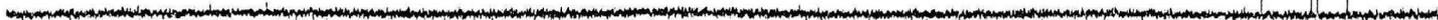


ESPECTRO 25. Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup>H del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX).



ESPECTRO 26. RMN  $^{13}\text{C}$  normal del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX).

CH3 carbons



CH2 carbons



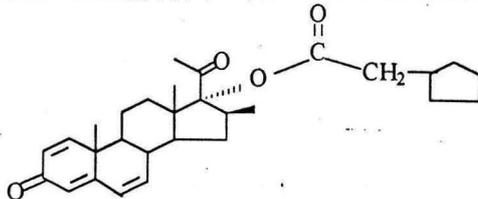
CH carbons



all protonated carbons

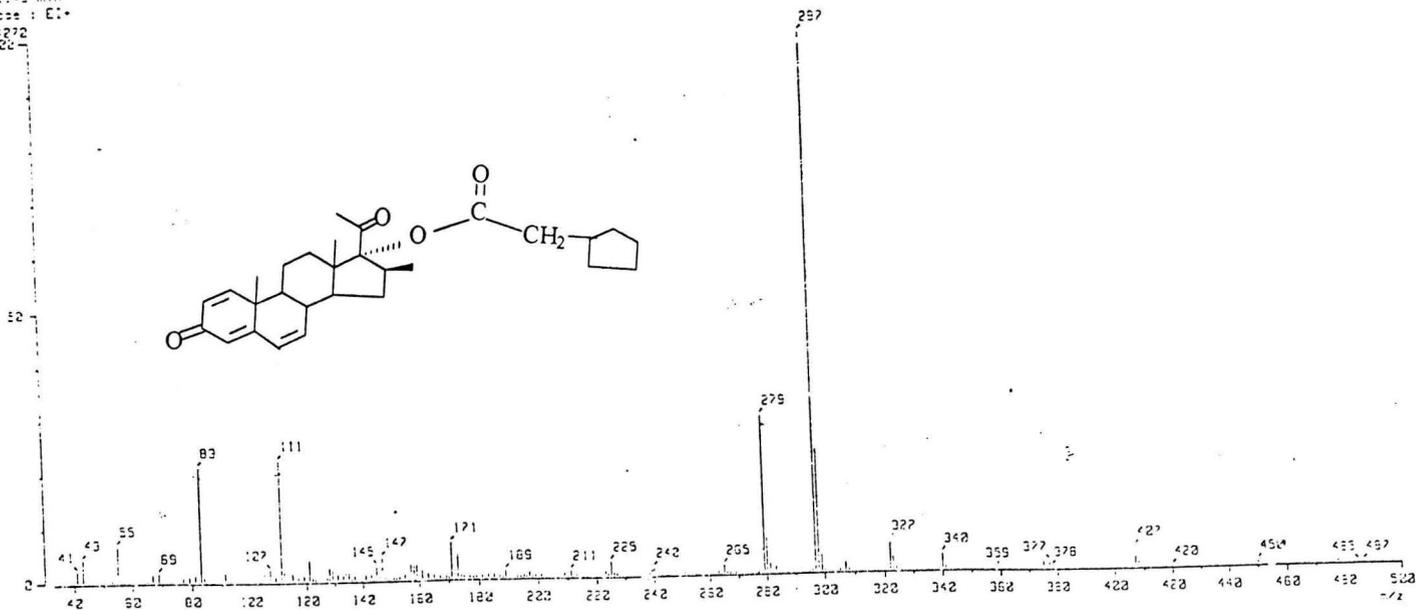


200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm



ESPECTRO 27. DEPT del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX).

( Mass Spectrum )  
RT : 1.43 min  
Ion Mass : E1+



ESPECTRO 28. EMIE del compuesto 17 $\alpha$ -ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (IX).

**ARTÍCULO.**

Con este trabajo de tesis, colaboré en la publicación del artículo: "5 $\alpha$ -reductase inhibitory and antiandrogenic activities of novel steroids in hamster seminal vesicles" en la revista Chemical Pharmaceutical Bulletin (2002) 50 [11]:1447-1452.

## 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitory and Antiandrogenic Activities of Novel Steroids in Hamster Seminal Vesicles

Marisa CABEZA,<sup>b</sup> Eugene BRATOFF,<sup>\*a</sup> Eugenio FLORES,<sup>a</sup> Elena RAMIREZ,<sup>a</sup> Jorge CALLEROS,<sup>a</sup> Diana MONTES,<sup>a</sup> Alexandra QUIROZ,<sup>b</sup> and Ivonne HEUZE<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry, UNAM, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico D. F., Mexico; and

<sup>b</sup>Departments of Biological Systems and Animal Production, Metropolitan University-Xochimilco, Mexico D. F.

Received June 20, 2002; accepted August 12, 2002

The pharmacological activity of several 16-bromosubstituted trienediones 4 and 5, 16-methyl substituted dienediones 6 and 7 and the 16-methyl substituted trienedione 8 was determined on gonadectomized hamster seminal vesicles by measuring the *in vitro* conversion of testosterone (T) to dihydrotestosterone (DHT) as 5 $\alpha$ -reductase inhibitors and also the ability of these steroids to bind to the androgen receptor. Steroids 6 and 7 when injected together with T decreased the weight of the seminal vesicles thus showing an antiandrogenic effect. Compounds 5 and 6 reduced substantially the conversion of T to DHT and therefore can be considered good inhibitors for the enzyme 5 $\alpha$ -reductase; however both steroids failed to form a complex with the androgen receptor. On the other hand compound 7 which showed a very small inhibitory activity for the enzyme 5 $\alpha$ -reductase, exhibited a very high affinity for the androgen receptor and thus can be considered an effective antiandrogen. This compound also reduced substantially the weight of the seminal vesicles. Steroids 4 and 8 did not reduce the weight of the seminal vesicles and exhibited a low affinity for the androgen receptor; 8 showed a weak 5 $\alpha$ -reductase inhibitory activity, whereas 4 exhibited a weak androgenic effect.

**Key words** seminal vesicle; 5 $\alpha$ -reduction; 5 $\alpha$ -reductase; androgen receptor; T to DHT conversion; C-16 substituent

Steroid 5 $\alpha$ -reductase (EC 1-3-99-5) is a NADPH dependent enzyme which converts testosterone (T) 1 into dihydrotestosterone (DHT) 2.<sup>1</sup> This enzyme is located in the androgen-dependent tissue such as prostate, seminal vesicles, epididymis and the skin. It is believed that DHT plays a role in pathological conditions such as benign prostatic hyperplasia (BHP), prostatic cancer, acne, female hirsutism and male pattern baldness.<sup>2</sup>

The essential role of 5 $\alpha$ -reductase in prostate growth has been determined by the discovery of 5 $\alpha$ -reductase deficiency in male pseudohermaphroditism patients who had atrophic prostate glands despite normal testosterone level.<sup>3,4</sup> DHT is the most active agonist for the androgen receptor<sup>5</sup> although T also mediates the androgenic action in the tissues. Various steroidal compounds have been developed as 5 $\alpha$ -reductase inhibitors for the medical therapy of BHP.<sup>5</sup> Finasteride 3<sup>6</sup> (Fig. 1) a 4-aza steroid is the most extensively studied class of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors.<sup>7</sup> This compound is the first approved 5 $\alpha$ -reductase inhibitor in the U.S.A. for the treatment of BHP. This drug has approximately a 100-fold greater affinity for type 2—5 $\alpha$ -reductase than for type 1. In humans finasteride decreases prostatic DHT level and reduces prostate size, while T tissue concentration remains constant.<sup>8</sup>

In this study, we determined the antiandrogenic activity of five new steroidal compounds: 4—8 in gonadectomized hamster seminal vesicles.

Seminal vesicles are male accessory glands that are androgen-dependent. These organs are capable of reducing T to DHT in both intact and gonadectomized animals and have also been used for evaluation of steroidal and non steroidal compounds as antiandrogens.<sup>9,10</sup>

**Chemistry** Several years ago we synthesized several new 17 $\alpha$ -acyloxy-16 $\beta$ -methyl substituted pregnadiene-3,20-dione derivatives.<sup>15,16</sup> Some of these compounds showed a high inhibitory effect for the enzyme 5 $\alpha$ -reductase as well as high affinity for the androgen receptor. On the

basis of these results and in order to expand the scope of this study, recently we synthesized several new 17 $\alpha$ -acyloxy-16 $\beta$ -substituted (methyl, bromine) pregnadiene-3,20-diones and pregnatriene-3,20-triones (4—8) which are described in this paper.

**Synthesis of Steroids 4—8** Compounds 4—8 (Fig. 1) were prepared from the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate (Fig. 2). Epoxidation of the double bond at C-16 with hydrogen peroxide and sodium hydroxide afforded the epoxy derivative 9. The bromohydrin 10 was obtained when the intermediate 9 was treated with hydrobromic acid (32%) in dioxane for 6 h. When compound 10 was allowed to reflux with dichloro-dicyanobenzoquinone (DDQ) in dioxane for 4 d, the trienedione 4 was obtained. Esterification of the hydroxyl group in 4 with trifluoroacetic anhydride, *p*-toluenesulfonic acid and cyclopentanecarboxylic acid yielded the desired ester 5.

Compounds 6—8 (Fig. 1) were prepared from the epoxy derivative 9 (Fig. 3). Acetylation of 9 in the usual manner yielded the acetoxy compound 11. The protection of the carbonyl group in 11 was effected with ethylene glycol, trimethyl orthoformate and *p*-toluenesulfonic acid (PTSA). The resulting dioxolane derivative 12 was allowed to reflux with methylmagnesium chloride in tetrahydrofuran (THF); this reaction afforded the 16-methyl substituted dioxolane derivative 13. Hydrolysis of the dioxolane ring in 13 to recover the carbonyl moiety was carried out with PTSA in acetone thus forming the carbonyl derivative 14. The oxidation of the hydroxyl group at C-3 in 14 was effected with lithium carbonate, lithium bromide and bromine in *N,N*-dimethylformamide (DMF). This reaction afforded the 4,6-diene-3,20-dione moiety 15. Esterification of the hydroxyl group in 15 with trifluoroacetic anhydride, cyclopentylacetic acid and PTSA yielded the desired ester 6. When alcohol 15 was treated in the same manner with cyclopentane carboxylic acid, the corresponding cyclopentanecarboxylate ester 7 was

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: eugene@servidor.unam.mx

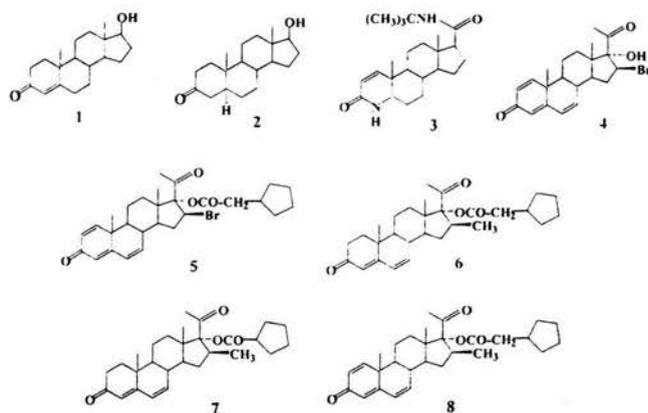


Fig. 1. Steroid Structures

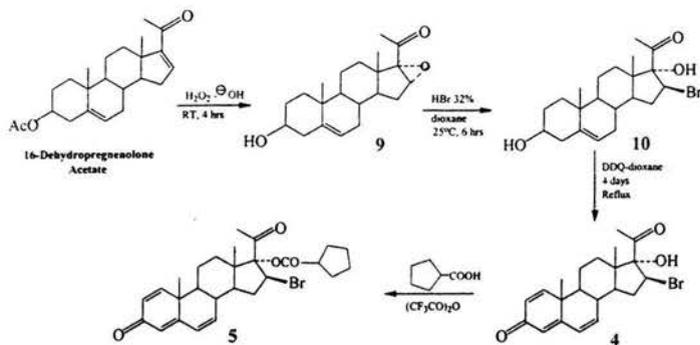


Fig. 2. Synthesis of New Steroids

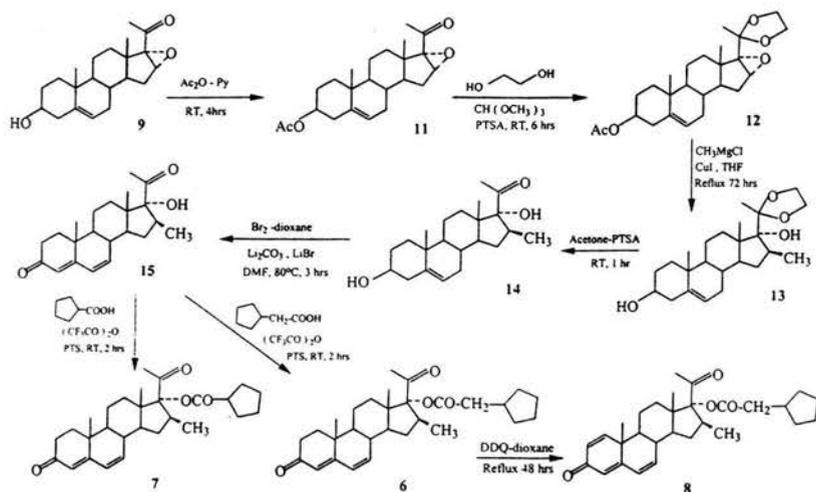


Fig. 3. Synthesis of New Steroids

obtained.

Treatment of 6 with 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ) in dioxane afforded the trienedione compound 8.

**Biological Activity** The biological activity of steroids 4 to 8 were determined in gonadectomized male hamsters divided in several groups. The animals in the control group were injected with the vehicle (sesame oil); in the other groups they were treated with T,<sup>11)</sup> a combination of T with finasteride or T with the new steroids. After 6 d of treatment, the animals were anesthetized with ether and sacrificed. The seminal vesicles were removed weighed, homogenized and used for the *in vitro* experiments.

**Seminal Vesicles** After castration the weight of the seminal vesicles of the male hamsters significantly decreased ( $p < 0.05$ ) as compared to that of the normal glands. Treatment with vehicle alone (control) did not change this condition whereas subcutaneous injections of 200  $\mu\text{g}$  of 1 for 6 d significantly increased ( $p < 0.05$ ) the weight of the seminal vesicles in castrated male hamsters (141.7 mg) (Table 1). When 1 and finasteride 3 were injected together, the weight of the seminal vesicles decreased (120 mg). The injection of steroids 6 and 7 together with T decreased the weight of the seminal vesicles as compared to the T treated hamsters thus suggesting an inhibitory effect on 5 $\alpha$ -reductase enzyme type 2. The most effective compounds showing the highest inhibitory effect for 5 $\alpha$ -reductase enzyme were steroids 6 and 7 having the lowest value of the weight of the seminal vesicles, 118 and 115 mg respectively.

**In Vitro Metabolism of T to DHT** Since the weight of the seminal vesicles depends on the 5 $\alpha$ -reduced androgens,<sup>1,12,13)</sup> it was important to determine the effect of the new steroids 4–8 on the conversion of 1 to 2 *in vitro* metabolism of [<sup>3</sup>H]T to [<sup>3</sup>H]DHT in seminal vesicles homogenates of castrated male hamsters at pH of 6 in the presence of NADPH. The extracts from castrated male hamster seminal vesicles were subjected to TLC analysis. The zone corresponding to DHT (2) standard (*R<sub>f</sub>* value of 0.33) of each experimental chromatogram was eluted and the radioactivity determined. The results (Fig. 4) obtained from two separate experiments performed in duplicate demonstrated a lower [<sup>3</sup>H]T to [<sup>3</sup>H]DHT conversion in the T with finasteride treated animals than testosterone alone thus indicating that finasteride 3 is a good inhibitor for the conversion of T to DHT at pH of 6. Figure 4 also shows the effect of the new steroids 4–8 on the rate of DHT formation expressed as fmoles of DHT/mg of protein/h. The four compounds (5–8) produced a much lower concentration of DHT as compared to testosterone. On the other hand, compounds 5, 6 and 8 exhibited a lower DHT conversion than finasteride 3 thus showing a high 5 $\alpha$ -reductase inhibitory effect. Steroid 4 gave a higher *in vitro* conversion of 1 to 2 ( $p < 0.05$ ) than the other steroids thus showing a weak androgenic effect.

Compound 7 which is structurally very similar to steroid 6 (one carbon atom less) showed a higher *in vitro* conversion of 1 to 2 ( $p < 0.05$ ) than steroids 3, 5, 6 and 8 however it still can be considered a 5 $\alpha$ -reductase inhibitor due to the lower production of DHT as compared to testosterone.

**Scatchard Analysis of Receptor Androgen Binding** When cytosol aliquots (2.64 mg protein) obtained from gonadectomized male hamster seminal vesicles homogenates

Table 1

| Treatment (mg) | Weight of seminal vesicles (mg) |
|----------------|---------------------------------|
| Control        | 109.7 $\pm$ 15                  |
| Testosterone   | 141.7 $\pm$ 10                  |
| T+3            | 120.0 $\pm$ 05                  |
| T+4            | 130.0 $\pm$ 10                  |
| T+5            | 150.0 $\pm$ 13                  |
| T+6            | 118.0 $\pm$ 08                  |
| T+7            | 115.0 $\pm$ 05                  |
| T+8            | 135.0 $\pm$ 10                  |

The weight of seminal vesicles were measured from animals that received sc treatment of C-16 substituted steroids.

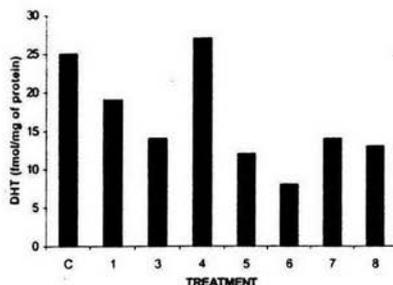


Fig. 4. Effect of New Steroids on *in Vitro* Conversion of [<sup>3</sup>H]T to [<sup>3</sup>H]DHT in Castrated Male Hamsters Flank Organs

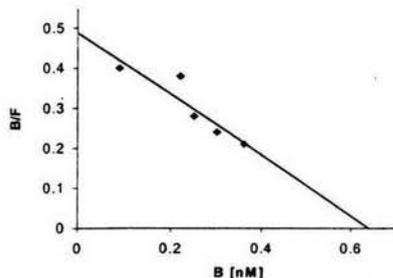


Fig. 5. Scatchard Plot of Receptor Androgen Binding

were incubated with increasing concentrations of [<sup>3</sup>H]DHT, a typical saturation curve was obtained. The levels of the non-specific bound hormone increase progressively with the rise of radiolabeled compound concentration. Data were analyzed according to the Scatchard plot method.<sup>14)</sup> A linear relationship indicates the presence of only one single class of high affinity and low capacity of binding sites with  $K_d$  and  $B_{max}$  values of 1.26 and 0.615 nM, respectively, for this tissue (Fig. 5).

**Competition Analysis of Synthesized Steroids for Androgen Receptors (ARs)** The effect of increasing concentrations of nonradioactive synthetic steroids upon [<sup>3</sup>H]DHT binding to androgen receptors from male hamster seminal vesicles in two different experiments are presented in Fig. 6. The  $K_i$  values for the synthesized steroids showed the follow-

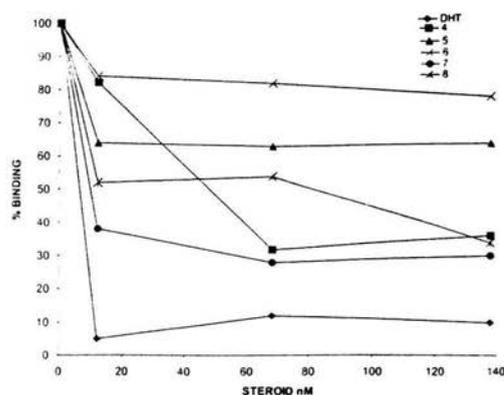


Fig. 6. Inhibition Constants ( $K_i$ ) of Different Steroids

ing order of affinity to ARs: DHT>7>4>8 with values of 8.29, 11.79, 45.38 and 73.04 respectively. Compounds 5 and 6 did not show any affinity for the androgen receptors.

## Discussion

This study reports the  $5\alpha$ -reductase inhibitory activity and the antiandrogenic effect of novel 16-bromo substituted trienediones 4, 5, the 16 $\beta$  methyl substituted dienediones 6, 7 and the trieneone 8 (Fig. 1). Compound 4 (Fig. 4) did not decrease the weight of the seminal vesicles and did not inhibit the conversion of T to DHT (it has a weak androgenic effect) however it competed for the ARs ( $K_i$  45.38 nM). On the other hand, steroids 5, 6 and 8 showed a  $5\alpha$ -reductase inhibitory effect slightly higher than the commercially available finasteride 3 presently used for the treatment of benign prostatic hyperplasia however compounds 5 and 8 did not decrease the weight of the seminal vesicles compounds 5 and 6 did not show any affinity for the androgen receptor as indicated previously, however they strongly inhibited the enzyme  $5\alpha$ -reductase. Steroid 8 showed a slight affinity for the ARs, a moderate  $5\alpha$ -reductase inhibitory activity and did not decrease the weight of the seminal vesicles. Compound 7 which has a low inhibitory activity for the conversion of T to DHT and is structurally similar to 6 binds with a high affinity to the ARs and reduces the weight of the seminal vesicles, thus showing high antiandrogenic and also an inhibitory effect for the enzyme  $5\alpha$ -reductase.

In addition, we demonstrated that radio-inert DHT in increasing concentrations, inhibited the binding of [ $^3$ H]DHT to the ARs present in cytosolic fraction as shown by the  $K_i$  value of 8.29 nM (Fig. 6). Furthermore, some radio-inert synthetic steroids (4, 8, 7) also inhibited the binding of [ $^3$ H]DHT to the cytosolic ARs, as indicated by the respective  $K_i$  values. In contrast steroids 5 and 6 did not have any inhibitory effect on cytosolic ARs, as shown in Fig. 5.

## Experimental

**Chemical and Radioactive Material** Solvents were laboratory grade or better. Melting points were determined on a Fisher Johns melting point apparatus and are uncorrected.  $^1$ H- and  $^{13}$ C-NMR were taken on Varian Gemini 200 and VRX-300 respectively. Chemical shifts are given in ppm relative to that of Me $_4$ Si ( $\delta=0$ ) in CDCl $_3$ . The abbreviations of signal patterns are as

follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet. Mass spectra were obtained with a HP5985-B spectrometer. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 200s spectrometer. (1, 2, 4, 5, 6, 7- $^3$ H) Testosterone [ $^3$ H]T, specific activity: 95 Ci/mmol and (1, 2, 4, 5, 6, 7- $^3$ H) dihydrotestosterone [ $^3$ H]DHT, specific activity 110 Ci/mmol, were provided by New England Nuclear Corp. (Boston, MA, U.S.A.). Radionert T and 5-DHT were supplied by Steraloids (Wilton, NH, U.S.A.). Sigma Chemical Co. (ST. Louis, MO, U.S.A.) supplied NADPH $^+$ , glucose-6-phosphate and glucose-6-phosphate dehydrogenase. The finasteride was obtained by extraction from Proscar (Merck, Sharp & Dohme).

**Synthesis of the Steroidal Compounds** The synthesis of the intermediates 9, 11–15 (Fig. 3) is given in refs. 15 and 16. The preparation of the new compounds 4, 5, 10, 6–8 is briefly described below.

**16 $\beta$ -Bromo-17 $\alpha$ -hydroxypregna-1,4,6-triene-3,20-dione 4** A solution of steroid 10 (1 g, 2.43 mmol) and DDQ (1 g, 13.22 mmol) in dioxane (50 ml) was allowed to reflux for 3 d. Upon cooling, the precipitated 2,3-dichloro-5,6-dicyanoanthraquinone was filtered off. To the filtrate was added 3% aqueous sodium hydroxide solution (100 ml) and chloroform (100 ml); the mixture was stirred for 5 min. The organic phase was separated, washed 3 times with 3% aqueous sodium hydroxide solution and water. It was dried over anhydrous sodium sulfate and the solvent was removed in vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography. Hexane-ethyl acetate (6:4) eluted 404 mg, 0.99 mmol (41% of the pure product 4, mp 195–196°C. UV (nm) 219, 255, 298 ( $\epsilon=15000, 12800, 17950$  respectively). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3378, 1715, 1646, 1600.  $^1$ H-NMR (CDCl $_3$ )  $\delta$ : 1.2 (3H, s), 1.4 (3H, s), 2.4 (3H, s), 3.6 (1H, s), 6.0 (1H, d,  $J=2$  Hz), 6.3 (1H, d,  $J=2$  Hz), 6.5 (1H, d,  $J=2$  Hz), 6.7 (1H, d,  $J=3$  Hz), 7.0 (1H, d,  $J=3$  Hz).  $^{13}$ C-NMR (CDCl $_3$ )  $\delta$ : 15.8 (C-18), 20.7 (C-19), 28.6 (C-21), 128.0 (C-6), 162.2 (C-5), 186.4 (C-3), 205.4 (C-20). MS ( $m/z$ ) 404 ( $M^+$ ).

**16 $\beta$ -Bromo-17 $\alpha$ -cyclopentylacetoxy-1,4,6-pregnatriene-3,20-dione 5** A solution containing steroid 4 (1 g, 2.47 mmol), PTSA (100 mg), trifluoroacetic anhydride (2 ml, 9.53 mmol) and cyclopentylacetic acid (0.8 ml, 4.99 mmol) was stirred for 2 h at room temperature (nitrogen atmosphere). The reaction mixture was neutralized with an aqueous sodium bicarbonate solution to a pH of 7 and diluted with chloroform (10 ml). The organic phase was separated, washed with water and dried over anhydrous sodium sulfate; the solvent was eliminated in vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography. Hexane-ethyl acetate (8:2) eluted 369 mg, 0.74 mmol (30% of the pure product 5, mp 134–136°C. UV (nm) 217, 253, 291 ( $\epsilon=14600, 12400, 17500$  respectively). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 1731, 1710, 1656, 1603.  $^1$ H-NMR (CDCl $_3$ )  $\delta$ : 1.1 (3H, s), 1.3 (3H, s), 2.1 (3H, s), 5.8 (1H, d,  $J=2$  Hz), 6.3 (1H, d,  $J=2$  Hz), 6.5 (1H, d,  $J=2$  Hz), 6.8 (1H, d,  $J=3$  Hz), 7.1 (1H, d,  $J=3$  Hz).  $^{13}$ C-NMR (CDCl $_3$ )  $\delta$ : 15.5 (C-18), 20.2 (C-19), 33.3 (C-21), 128.2 (C-6), 161.8 (C-5), 175.4 (ester carbonyl), 186.1 (C-3), 199.5 (C-20), MS ( $m/z$ ) 500 ( $M^+$ ).

**16 $\beta$ -Bromo-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihydroxypregna-5-ene-20-one 10** A solution containing steroid 9 (1 g, 3.03 mmol) and hydrobromic acid (5.8 ml) in dioxane (12.2 ml) was stirred for 6 h at room temperature. The reaction mixture was poured into a beaker containing 30 ml of water. The resulting precipitate was filtered off and washed with water. The crude product was recrystallized from ethyl acetate-hexane; yield 0.72 g, 1.77 mmol (58% of the pure product 10, mp 196–198°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3375, 1700, 1048.  $^1$ H-NMR (CDCl $_3$ )  $\delta$ : 1.0 (3H, s), 1.2 (3H, s), 2.4 (3H, s), 3.5 (1H, m), 4.0 (1H, d,  $J=2$  Hz), 5.3 (1H, d,  $J=2$  Hz).  $^{13}$ C-NMR (CDCl $_3$ )  $\delta$ : 16.2 (C-18), 19.3 (C-19), 28.2 (C-21), 71.6 (C-3), 140.8 (C-5), 120.9 (C-6), 51.7 (C-16), 206.4 (C-20). MS ( $m/z$ ) 410 ( $M^+$ ).

**17 $\alpha$ -Cyclopentylacetoxy-16 $\beta$ -methylpregna-4,6-diene-3,20-dione 6** A solution containing steroid 15 (1 g, 2.8 mmol), PTSA (200 mg), trifluoroacetic anhydride (0.2 g, 1.04 mmol) and cyclopentylacetic acid (1.2 ml, 8.7 mmol) was stirred for 2 h at room temperature (nitrogen atmosphere). The reaction mixture was neutralized with an aqueous sodium bicarbonate solution to pH of 7 and diluted with chloroform (10 ml). The organic phase was separated, washed with water and dried over sodium sulfate; the solvent was eliminated in vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography. Hexane-ethyl acetate (8:2) eluted 850 mg, 1.74 mmol (62% of pure product 6, mp 182–183°C. UV (nm) 283 ( $\epsilon=22900$ ). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 1724, 1710, 1666, 1625.  $^1$ H-NMR (CDCl $_3$ )  $\delta$ : 0.81 (3H, s), 1.1 (3H, s), 2.0 (3H, s), 1.4 (3H, d,  $J=2$  Hz), 5.7 (1H, s), 6.1 (2H, s).  $^{13}$ C-NMR (CDCl $_3$ )  $\delta$ : 15.4 (CH $_3$  at C-16), 16.5 (C-18), 20.0 (C-19), 28.0 (C-21), 124.0 (C-4), 128.0 (C-6), 173.0 (ester carbonyl), 199.0 (C-3), 204.0 (C-20). MS ( $m/z$ ) 452 ( $M^+$ ).

**17 $\alpha$ -Cyclopentylcarbonyloxy-16 $\beta$ -methylpregna-4,6-diene-3,20-dione 7** A solution containing steroid 15 (1 g, 2.21 mmol), PTSA (200 mg), trifluoroacetic anhydride (2 g, 1.04 mmol) and cyclopentanecarboxylic acid

(1.0 ml, 8.7 mmol) was stirred for 2 h at room temperature (nitrogen atmosphere). The reaction mixture was neutralized with an aqueous sodium bicarbonate solution to a pH of 7 and diluted with chloroform (10 ml). The organic phase was separated, washed with water and drier over anhydrous sodium sulfate; the solvent was eliminated in vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography. Hexane-ethyl acetate (8:2) eluted 674 mg, 1.54 mmol (69% of pure product 7, mp 160–165°C. UV (nm) 284 ( $\epsilon=23100$ ). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  1723, 1705, 1668, 1618.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.8 (3H, s), 1.1 (3H, s), 1.4 (3H, d,  $J=2$  Hz), 1.98 (3H, s), 5.8 (1H, s), 6.1 (2H, d,  $J=3$  Hz).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 16.0 (CH<sub>3</sub> at C-16), 17.0 (C-18), 19.0 (C-19), 29.0 (C-21), 122.0 (C-4), 130.0 (C-6), 179.0 (ester carbonyl), 195.0 (C-3), 206.0 (C-20). MS ( $m/z$ ) 438 ( $M^+$ ).

**17 $\alpha$ -Cyclopentylacetoxy-16 $\beta$ -methylpregna-1-4,6-triene-3,20-dione 8** A solution of steroid 6 (1 g, 2.21 mmol) and DDQ (2.21 g, 26.44 mmol) in dioxane (90 ml) was allowed to reflux for 2 d. Upon cooling, the precipitated 2,3-dichloro-5,6-dicyanohydroquinone was filtered off. To the filtrate was added 3% aqueous sodium hydroxide solution (100 ml) and chloroform (100 ml); the mixture was stirred for 5 min. The organic phase was separated, washed 3 times with 3% aqueous sodium hydroxide solution and water. It was dried over anhydrous sodium sulfate and the solvent was removed in vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography. Hexane-ethyl acetate (6:4) eluted 850 mg, 1.74 mmol (70% of pure product 8, mp 163–164°C. UV (nm) 222, 256, 299 ( $\epsilon=15200$ , 13000, 18000 respectively). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  1724, 1710, 1668, 1649.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.8 (3H, s), 1.1 (3H, s), 1.41H, (3H, d,  $J=2$  Hz), 2.0 (3H, s), 2.4 (2H, d,  $J=3$  Hz), 6.1 (1H, d,  $J=2$  Hz), 6.4 (1H, d,  $J=2$  Hz), 6.6 (1H, d,  $J=2$  Hz), 6.8 (1H, d,  $J=3$  Hz).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 15.0 (C-18), 19.8 (C-19), 28.0 (C-21), 130.0 (C-6), 164.0 (C-5), 173.0 (ester carbonyl), 186.0 (C-3), 204.0 (C-20). MS ( $m/z$ ) 450 ( $M^+$ ).

**Animal and Tissues** Adult male Syrian Golden hamsters (150–200 g) were obtained from the Metropolitan University-Xochimilco of Mexico. Gonadectomies were performed under light ether anesthesia 30 d before treatment. Animals were sacrificed by ether anesthesia. The seminal vesicles were immediately removed, blotted and weighed prior to their use. Tissues used in the metabolic experiment were homogenized with a tissue homogenizer (model 985-370; variable speed 5000–30000 rpm, Biospec Products, Inc.).

**Animal Treatment** The biological activity of steroids 4 to 8 (Fig. 1) were determined in gonadectomized male hamsters divided in several groups. Daily subcutaneous injections of 400  $\mu\text{g}$  of the steroids 4–8 (Fig. 1) dissolved in 200  $\mu\text{l}$  of sesame oil were administered for 6 d together with 200  $\mu\text{l}$  of T. Three groups of animals were kept as a control, one was injected with 200  $\mu\text{l}$  of sesame oil, the second with 200 mg of testosterone and the third with T together with finasteride for 6 d. After the treatment, the animals were sacrificed by ether anesthesia and the seminal vesicles were dissected and weighed.

**In Vitro Metabolic Studies with Seminal Vesicles** Homogenates from male hamster seminal vesicles (35.34 mg of protein) were prepared from intact adult male animals, using Krebs-Ringer phosphate buffer solution at pH of 6. Tissue preparations were incubated<sup>11</sup> in duplicate with 3.4  $\mu\text{Ci}$  of [ $^3\text{H}$ ]T (specific activity 95 Ci/mmol) in the presence of 0.5 mM NADPH<sup>+</sup> and 12.5 mM glucose-6-phosphate plus  $0.8 \times 10^{-6}$  g of glucose-6-phosphate dehydrogenase<sup>11</sup> and 8.7  $\mu\text{M}$  of finasteride or steroids 4–8 in a Dubnoff metabolic incubator at 37°C for 60 min in the presence of air. The final incubation volume was 3 ml. The same experiment was performed with each one of the new steroidal compounds. Incubation without tissues was used as a control. The incubation was terminated by addition of dichloromethane and the [ $^3\text{H}$ ] steroid was extracted (4 $\times$ ) using 10 ml of dichloromethane. The protein content of the homogenates was determined by Bradford's dye-binding method<sup>12</sup> using bovine serum albumin (BSA) as the standard. Isolation and purity assessment of radioactive DHT was carried out. The isolated compound was purified with steroid carriers (T and DHT) by a thin layer chromatographic system (chloroform:acetone=9:1). The steroid carriers were detected using phosphomolibdic acid reagent and an ultraviolet lamp (254 nm). Radioactivity was determined in a Packard Tri carb 2100 TR liquid scintillation Analyzer, using Ultima Gold (Packard Downers Grove, IL) as counting vehicle. The counting efficiency of [ $^3\text{H}$ ] was 67%. The losses of radioactivity during the procedure were calculated in agreement with the results obtained from the control experiment without tissue. The formation of DHT was calculated and expressed as fmol of DHT/mg protein/h.

**Cytosol Preparation for Androgen Receptor Competition Analysis** Tissue homogenization was performed as described above<sup>12</sup> using TEDAM 1:3:20 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 4°C, 1.5 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol, and 10 mM sodium molybdate containing 10% glycerol (v/v). The ho-

mogenate was centrifuged at 14000 $\times$ g for 1 h at 4°C in a SW 60 Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, California). Cytosol protein content was determined by Bradford's dye binding method<sup>12</sup> using bovine serum albumin (BSA) as the standard.

**Androgen Receptor Binding Assay** Assays were performed essentially as described by Cabeza *et al.*<sup>13</sup>

**Saturation Curves and Determination of the Binding Parameters** Binding sites were saturated in the presence of increasing concentrations (0.5–2.5) of [ $^3\text{H}$ ]DHT. Results were analyzed with Scatchard plots,<sup>14</sup> the calculation of affinity ( $K_d$ ) and the total number of sites ( $B_{max}$ ) were determined by linear regression.

Aliquots of 120  $\mu\text{l}$  of cytosol (2.64 mg of protein) were incubated (in duplicate) for 18–20 h at 4°C in tubes containing 0.5–2.5 nM [ $^3\text{H}$ ]DHT. Parallel sets of tubes containing identical concentrations of [ $^3\text{H}$ ]DHT plus 100-fold excess of radioinert DHT were also incubated. Dextran coated charcoal (800  $\mu\text{l}$ ) in TEDAM buffer was added and the mixture was incubated for 45 min at 4°C. The tubes were vortexed and immediately centrifuged at 800 $\times$ g for 10 min.

**Competition Analysis of Synthesized Steroids for ARs** The competition analysis of steroids 4–8 for the androgen receptors of castrated male hamster seminal vesicles was determined on 58 animals (150–200 g), selected at random and gonadectomized 30 d before the experiments. The animals were kept in a room with controlled temperature (22°C) and light-dark periods of 12 h. Food and water were provided *ad libitum*.

Androgen receptor competition studies were performed essentially as described by Cabeza *et al.*<sup>13</sup> and are briefly summarized below.

**Competition Studies** For competition experiments, tubes contained 1.26 nM [ $^3\text{H}$ ]DHT (specific activity 110 Ci/mmol) plus a range of increasing concentrations (50–500  $\mu\text{M}$ ) of the following unlabeled steroid hormones: 5- $\alpha$ -DHT, and 4–8 were prepared.

Aliquots 120  $\mu\text{l}$  of cytosol (2.64  $\mu\text{g}$  of protein) were added and incubated (in duplicate) for 18–20 h at 4°C in tubes mentioned above. Parallel sets of tubes containing identical concentrations of [ $^3\text{H}$ ]DHT plus a 100-fold excess of radio inert DHT were also incubated; 800  $\mu\text{l}$  of dextran-coated charcoal in TEDAM buffer was added and the mixture was incubated for 45 min at 4°C. The dextran was agitated during 30 min before the addition of charcoal to the mixture. The tubes were vortexed and incubated for 45 min at 4°C. After the tubes were centrifuged at 800 $\times$ g for 10 min; aliquot (200  $\mu\text{l}$ ) were subsequently submitted to radioactive counting. Specific binding was determined by subtracting the mean disintegration per minute (dpm) in the presence of excess unlabeled steroids from the mean dpm of corresponding tubes containing only [ $^3\text{H}$ ]DHT. Results were analyzed using one-way analysis of variance with EPISTAT software. The inhibition constant ( $K_i$ ) of each compound was calculated according to the procedures described by Cheng and Prusoff.<sup>15</sup>

**Acknowledgements** We gratefully acknowledge the financial support of DGAPA and CONACYT for the projects IN 200301 and G33450-M.

## References

- Bruchovski N, Wilson J. D., *J. Biol. Chem.*, **243**, 2012–2021 (1968).
- Metcalf W. B., Levy M. A., Holt D. A., *Trends Pharmacol. Sciences*, **10**, 491–495 (1989).
- Imperato-McGinley J., Guerrero L., Gautier T., Peterson R. E., *Science*, **27**, 1213–1215 (1974).
- Imperato-McGinley J., Peterson R. E., Leshin M., Griffin J. E., Cooper G., Draghi S., Berenyi M., Wilson J. D., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **50**, 15–22 (1980).
- Wilbert D. M., Griffin J. E., Wilson J. D., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **56**, 113–120 (1983).
- Weisser H., Tunn S., Debus M., Krieg M., *Steroids*, **59**, 616–620 (1994).
- Brooks J. R., Berman C., Primka R. L., Reynolds G. F., Rasmussen G. H., *Steroids*, **47**, 1–19 (1986).
- McConnel J., Wilson J. D., George F. J., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **25**, 505–509 (1992).
- Cabeza M., Gutierrez E., Miranda R., Heuze I., Bratoeff E., Flores G., Ramirez E., *Steroids*, **64**, 413–421 (1999).
- Cabeza M., Quiroz A., Bratoeff E., Murillo E., Ramirez E., Flores G., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1232–1236 (1999).
- Ramirez E., Cabeza M., Heuze I., Gutierrez E., Bratoeff E., Membrillo M., Lira A., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 15–20 (2002).
- Bradford M. M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254 (1986).
- Cabeza M., Vilchis F., Lemus A. E., Diaz de León L., Pérez-Palacios

- G., *Steroids*, **60**, 630—635 (1995).
- 14) Scatchard G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **52**, 660—672 (1949).
- 15) Cabeza M., Heuze I., Bratoeff E., Ramirez E., Martinez R., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 525—530 (2001).
- 16) Bratoeff E., Herrera H., Ramirez E., Solorzano K., Murillo E., Quiroz A., Cabeza M., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1249—1255 (2000).
- 17) Cheng Y. C., Prusoff W. H., *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 3099—3108 (1973).