



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

SÍNTESIS DE DERIVADOS FLUORADOS DE PREGNADIENO
CON UN GRUPO FENILO EN C-16

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

NAYELI TERÁN GALLEGOS



TUTOR: Dr. Eugene A. Bratoeff

AÑO: 2005

M: 350377



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 Dr. Federico Alfredo García Jiménez
Vocal Dr. Luis Ángel Maldonado Graniel
Secretario Dr. Héctor Salgado Zamora
Primer Suplente M en C. José Manuel Méndez Stivalet
Segundo Suplente Dra. Marisa Cabeza Salinas

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

NOMBRE: Nayeli Terán Gallegos

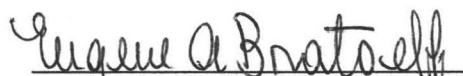
FECHA: 28/Septiembre/05

FIRMA: Nayeli Terán

La parte de síntesis química del presente trabajo se realizó en el Laboratorio L-125 del conjunto "E", en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Eugene Bratoeff.

La evaluación biológica se realizó en el Laboratorio de Hormonas (G-006) del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco, bajo la dirección de la Dra. Marisa Cabeza.

Asesor


Dr. Eugene A. Bratoeff Titeff

Sustentante


Nayeli Terán Gallegos

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT y DGEP por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

A DGAPA por el proyecto IN208505 que otorgó el soporte financiero para el desarrollo de este proyecto de investigación

Al Dr. Eugene A. Bratoeff por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su apoyo y enseñanzas durante la realización de la tesis.

A la Dra. Marisa Cabeza Salinas por su invaluable aportación en la determinación de la actividad biológica de los compuestos sintetizados, por sus observaciones y enseñanzas.

A los integrantes del jurado por su tiempo, comentarios y sugerencias a este trabajo.

Al personal académico de la USAI por la realización de los espectros de EMIE, UV, IR, RMN¹H y RMN¹³C

Gracias a Dios porque me concedió contar con un ángel guardián: la Dra. Elena G. Ramírez López, durante la realización de la tesis. Gracias por todo Elenita

A mis padres por su infinita paciencia.

A mis hermanos por su apoyo y exigencias.

Al bar-da, a Fernando, Fernanda, Gustavo, Ana, Claudia y Rosendo.

A mis compañeros de la maestría y del laboratorio 125 del Depto. de Farmacia en el Edificio E de la F.Q. por su apoyo y por permitirme convivir con ustedes.

ÍNDICE

	PÁGINA
ABREVIATURAS	IV
INTRODUCCIÓN	
I. Importancia de los antiandrógenos en la terapia médica de enfermedades	1
II. Cáncer de próstata e HPB	1
CAPÍTULO 1	
ANTECEDENTES	
1.1. Andrógenos	4
1.2. Testosterona	4
1.3. 5 α -Dihidrotestosterona	4
1.4. Receptor androgénico	6
1.5. Enzima 5 α -reductasa	7
1.6. Antiandrógenos	7
1.7. Cáncer de próstata e HPB	10
CAPÍTULO 2	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
CAPÍTULO 3	
OBJETIVOS	18
CAPÍTULO 4	
DESARROLLO EXPERIMENTAL	
Etapa A. Síntesis y caracterización de los derivados	20
4.1. Caracterización de la materia prima: acetato de 16-dehidropregnenolona	22
4.2. Síntesis de 16 α , 17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona	22
4.3. Síntesis de 3 β -acetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona	23
4.4. Síntesis de 3 β -acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-eno	24
4.5. Síntesis de 3 β , 17 α -dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenilpregnen-5-eno	25
4.6. Síntesis de 3 β , 17 α -dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homopregn-5-en-17a-ona	26
4.7. Síntesis de 3 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-D-homopregna-4,6-dien-3-17a-diona	27

4.8. Síntesis de derivados 16 β -fenil-17 α -aciloiloxi-17 β -metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona (11 a – 11 c)	28
--	----

Etapa B. Evaluación biológica de la actividad antiandrogénica	32
4.1. Experimento <i>in vivo</i> : Efecto de los compuestos 11a, 11b y 11c sobre el peso de la próstata de hámster	33
4.2. Experimento <i>in vitro</i> : Efecto de los compuestos 11a, 11b y 11c sobre la transformación de la testosterona (1) a dihidrotestosterona (2) en homogenados de próstata	35

CAPÍTULO 5

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Etapa A. Síntesis y caracterización de los derivados	38
Etapa B. Evaluación biológica de la actividad antiandrogénica	43

BIBLIOGRAFÍA

i

ANEXO

ESPECTROS

Acetato de 16-dehidropregnenolona

Espectro 1	EMIE
Espectro 2	UV
Espectro 3	IR
Espectro 4	RMN ¹ H

16 α , 17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona

Espectro 5	EMIE
Espectro 6	IR
Espectro 7	RMN ¹ H

3 β -acetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona

Espectro 8	EMIE
Espectro 9	IR
Espectro 10	RMN ¹ H

3 β -acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-eno

Espectro 11	EMIE
Espectro 12	IR
Espectro 13	RMN ¹ H

3 β , 17 α -dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenilpregn-5-eno

Espectro 14 EMIE

Espectro 15 IR

Espectro 16 RMN ¹H

3 β , 17 α -dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homopregn-5-en-17a-ona

Espectro 17 EMIE

Espectro 18 IR

Espectro 19 RMN ¹H

3 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-D-homopregna-4,6-dien-3-17a-diona

Espectro 20 EMIE

Espectro 21 UV

Espectro 22 IR

Espectro 23 RMN ¹H

16 β -fenil-17 α -fenilacetoxi-17 β -metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona

Espectro 24 EMIE

Espectro 25 UV

Espectro 26 IR

Espectro 27 RMN ¹H

Espectro 28 RMN ¹³C

Espectro 29 DEPT

16 β -fenil-17a-(2-fluorofenilacetoxi-17 β -metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona

Espectro 30 EMIE

Espectro 31 UV

Espectro 32 IR

Espectro 33 RMN ¹H

Espectro 34 RMN ¹³C

Espectro 35 DEPT

16 β -fenil-17a-(3-fluorofenilacetoxi-17 β -metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona

Espectro 36 EMIE

Espectro 37 UV

Espectro 38 IR

Espectro 39 RMN ¹H

Espectro 40 RMN ¹³C

Espectro 41 DEPT

ABREVIATURAS

A-PTS	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
AR	Receptor androgénico
CCF	Cromatografía en capa fina
DMF	Dimetilformamida
DHT	Dihidrotestosterona
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IR	Espectroscopía de infrarrojo
HL	Hormona luteinizante
J	Constante de acoplamiento
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Py	Piridina
r.f.	Factor de retención
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
T	Testosterona
THF	Tetrahidrofurano
uma	Unidades de masa atómica
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

I. Importancia de los antiandrógenos en la terapia médica de enfermedades

Hoy en día los antiandrógenos ofrecen un tratamiento útil para un gran número de enfermedades mediadas por andrógenos, tales como hirsutismo, acné, seborrea, alopecia androgénica, pubertad precoz y las de mayor relevancia el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna (HPB). El uso de los antiandrógenos en estas enfermedades, se fundamenta en que pueden inhibir el mecanismo de acción de los andrógenos. Por dos vías: el bloqueo de los receptores androgénicos y la inhibición de las enzimas metabólicas presentes en la esteroidogénesis.¹⁻³

Como consecuencia de la importancia de los antiandrógenos en las enfermedades citadas se ha estimulado la búsqueda de nuevos compuestos químicos con mayor potencia antiandrógenica y a la vez una disminución en los efectos secundarios no deseables. El presente trabajo es una contribución más a la búsqueda de nuevos compuestos químicos que funcionan como antiandrógenos. Los antiandrógenos que se encuentran en el mercado como el acetato de ciproterona (ACP), la finasterida, la flutamida y el ketoconazol, son los fármacos conocidos más eficaces para el tratamiento del cáncer de próstata y la HPB pero desafortunadamente muestran severos efectos colaterales, como: diarrea, vómito, disminución de la libido y daño hepático.¹⁻⁴

II. Cáncer de próstata e HPB

El cáncer de próstata, transformación maligna del componente celular epitelial a expensas de las células secretoras y la HPB, la cual se caracteriza por el incremento anormal de la glándula prostática, son dos de las enfermedades que afectan a la población masculina de edad avanzada. Ambos padecimientos están relacionados con un exceso de andrógenos en el organismo, y se desarrollan en la próstata, que es la glándula localizada en la parte inferior de la vejiga urinaria, rodeando a la uretra, con un peso aproximado de 20 g y de 3-4 cm de diámetro.⁵ Se encuentra formada por dos áreas principales: el componente

no glandular (34% del volumen total del órgano) y la parte epitelial (66% del volumen). La parte glandular se divide en tres zonas: central (c), transición (t) y periférica (p). La zona de transición es la más pequeña y representa el 5% del componente glandular, mientras que la zona periférica es la más grande representando el 70% del volumen glandular.⁶

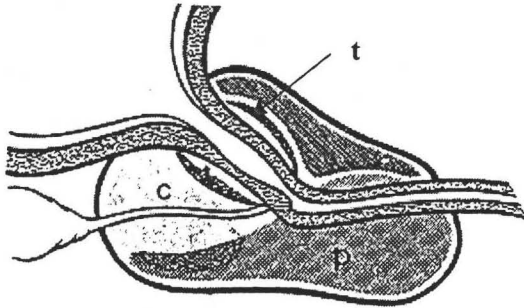


Figura II.1 Zonas anatómicas de la próstata

La **HPB** afecta exclusivamente la zona de transición de la próstata, pero el cáncer en 68% de los casos afecta a la zona periférica, 24% a la zona de transición y 8% a la región central.^{6,7}

El cáncer de próstata es el tipo de tumor maligno más frecuentemente diagnosticado en México. En relación con el total de tumores malignos y benignos, el cáncer de próstata se diagnosticó en el 18.6% de los casos en el año 2002, y el 4.7% de los pacientes que ingresan con este diagnóstico a los hospitales mueren. Es la segunda causa de muerte en hombres de 65 años o más, con un 3.2% del total de las defunciones. De las muertes por tumores malignos, el 22% es por causa del cáncer de próstata. La **HPB** es la 19a. causa de muerte en hombres de 65 años o más, de las 20 principales causas de mortandad en el año 2002, con un 0.4% del total de defunciones.^{8,9}

CAPÍTULO

1

ANTECEDENTES

1.1. Andrógenos

Los andrógenos son hormonas esteroidales que regulan la fisiología y el comportamiento sexual masculino. En general, la estructura química de los andrógenos está basada en el esqueleto del androstano, siendo la testosterona (**T**) la hormona sexual masculina predominante en el torrente sanguíneo. Es producida principalmente en los testículos (más del 95% de **T** la secretan las células testiculares de Leydig) y se encarga del desarrollo de las vesículas seminales, del epidídimo y del conducto eyaculatorio.⁷ El otro andrógeno de importancia es el mitógeno activo dihidrotestosterona (**DHT**)⁶ que se encarga del desarrollo de los caracteres masculinos externos así como del crecimiento de la uretra y la próstata. La acción de estos andrógenos, la **T** y la **DHT**, está mediada por un mismo receptor androgénico, localizado en el núcleo de la célula, de dichos andrógenos la **DHT** posee una mayor afinidad por el receptor androgénico (2.5 veces mayor).⁶

1.2. Testosterona T (1)

La biogénesis de la **T** se realiza en la mitocondria, donde el colesterol sufre la ruptura de la cadena lateral mediante un sistema oxidativo P-450 de función mixta, obteniéndose así la pregnenolona (**a**). Diversas transformaciones llevadas a cabo por enzimas no mitocondriales convierten la pregnenolona (**a**) en progesterona (**b**), la cual es finalmente convertida a **T**, (Figura 1.2.1).⁶

1.3. 5 α -Dihidrotestosterona DHT (2)

La **DHT** se produce a partir de la **T** presente en el torrente sanguíneo y que debido a su naturaleza lipídica le permite atravesar fácilmente las membranas celulares e introducirse en las células blanco. En el citoplasma de la célula la **T** es tomada por la enzima 5 α -reductasa tipo II (preferentemente encontrada en la zona urogenital)^{6,10} y transformada de forma irreversible (en presencia de NADPH), al andrógeno más activo **DHT**. El mecanismo de la transformación consiste en primer lugar en la formación del complejo 5 α -reductasa-NADPH; posteriormente la **T** se une a este complejo y se realiza la transferencia del hidruro del NADPH, a la posición 5 de la **T** (Figura 1.3.1). El enolato formado en C3-C4 se

estabiliza por un residuo electrofilico (E^+) de la enzima 5α -reductasa y debido a un equilibrio tautomérico, se da la formación de la 5α -dihidrotestosterona y la liberación de $NADP^+$.^{1,3-4,11}

El exceso de **DHT** en el organismo está relacionado con la serie de padecimientos andrógeno-dependientes mencionados en la introducción (página 1).^{1,10}

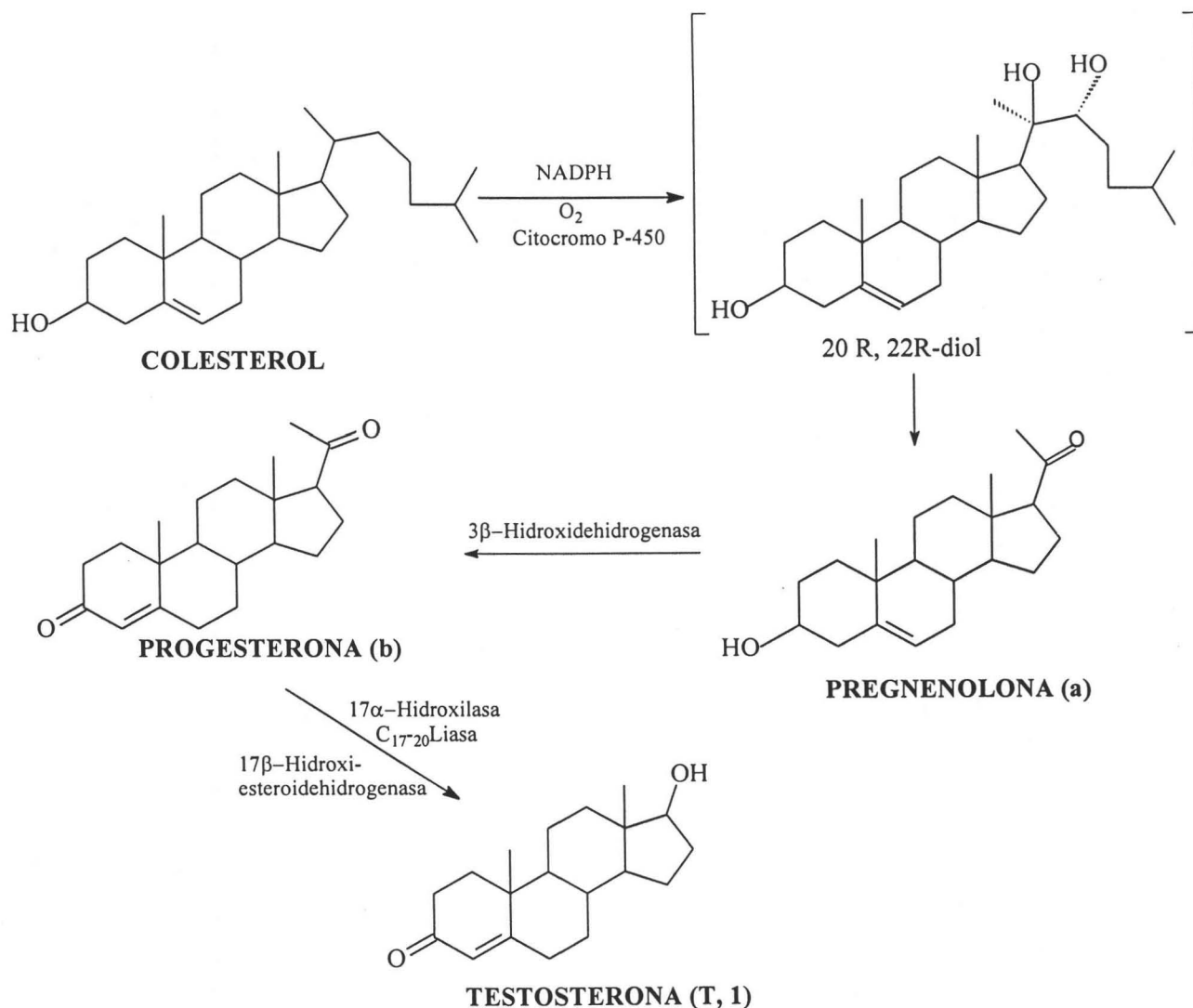


Figura 1.2.1 Biosíntesis de la Testosterona.

1.4. Receptor androgénico RA

La T que entra en la célula y la DHT formada in situ, llegan al núcleo por medio de difusión e interaccionan con el RA que es una fosfoproteína. Este RA consta de tres regiones: un dominio central (de unión a DNA, donde se encuentran localizados los dedos de zinc), un dominio COOH-terminal y un dominio N-terminal. El RA sufre un cambio conformacional formando un complejo andrógeno-receptor, mismo que transduce la señal androgénica extracelular, mediante la unión (como dímero) del complejo a los elementos de respuesta hormonal (en este caso las hormonas de interés son los andrógenos) localizados en las regiones flanco de los genes objetivo. Se forma un complejo estable cerca de la zona de inicio de transcripción del gen objetivo, que permite la iniciación eficiente de la transcripción por medio de la RNA polimerasa II. El RA logra lo anterior estimulando la formación del complejo de iniciación de transcripción o estabilizando el complejo. La interacción del RA con el DNA induce o reprime la transcripción del gen sensible al andrógeno en cuestión.⁶

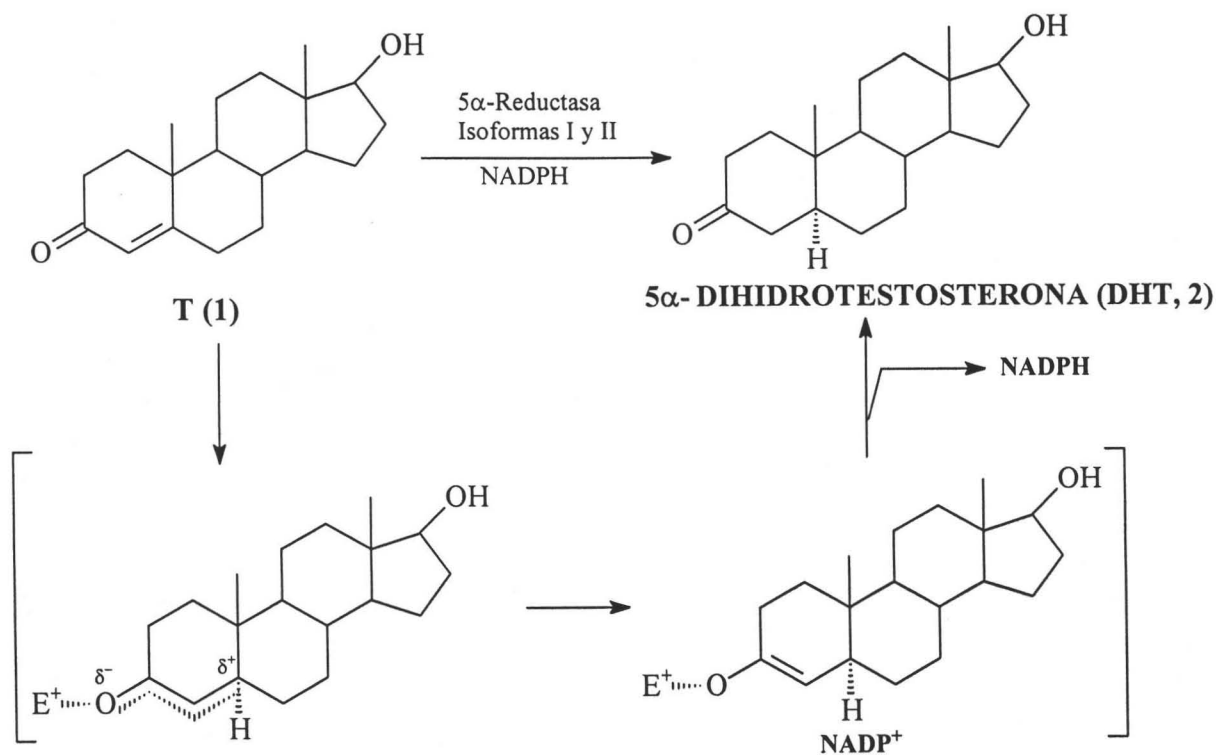


Figura 1.3.1 Mecanismo de acción de la enzima 5α-Reductasa

El **RA** en su forma inactiva se presenta como un complejo heteromolecular con diferentes proteínas de choque térmico (chaperonina hsp 90), así que el cambio conformacional que sufre, está acompañado de la disociación de dichas proteínas de choque térmico, aumentando la afinidad de la unión del **RA** con el DNA.^{1,3,6}

1.5. Enzima 5 α -reductasa

La enzima 5 α -reductasa se encuentra en dos isoformas denominadas tipo I y tipo II; las cuales difieren en su localización y su función. La isoenzima I se encuentra predominantemente en las glándulas sebáceas de la piel y el hígado, requiere de concentraciones elevadas de **T** para saturarse y su función catabólica permite la remoción de andrógenos en el hígado y piel. Se le relaciona con el acné y el hirsutismo en mujeres. La isoenzima II predomina en tejido genital como la próstata, testículos y vesículas seminales; requiere de concentraciones bajas de **T** para saturarse y su función anabólica permite la amplificación de la androgenicidad de la **T** por su conversión a **DHT**. Se le relaciona con el cáncer de próstata. La **HPB** y la alopecia androgénica, están relacionadas con la concentración de ambas isoenzimas.¹⁰

1.6. Antiandrógenos

El término antiandrógeno se reserva para las sustancias que actúan como un antagonista del **RA**. Según la definición de Dorfman: “antiandrógenos son sustancias que previenen la expresión de la actividad de los andrógenos en sus sitios objetivo. Por consiguiente el efecto inhibitorio de éstas sustancias, se diferencia de los compuestos que disminuyen la síntesis y/o liberación de las hormonas del hipotálamo (factores de liberación) y pituitaria anterior (gonadotropinas, particularmente **HL**) y también se deben diferenciar de los materiales que actúan directamente en la gónada inhibiendo la biosíntesis y/o secreción de andrógenos.” Para inhibir esa expresión de los andrógenos, los antiandrógenos pueden bloquear la conversión de **T** a su metabolito más activo **DHT**, lo cual sucede por inactivación de la enzima 5 α -reductasa; o pueden competir por el **RA** formándose un complejo antiandrógeno-receptor, en lugar de formarse el complejo

andrógeno-receptor. Para que un antiandrógeno compita por el **RA**, su afinidad de unión al mismo debe ser similar a la que presenta la **DHT**. Se ha sugerido que una rápida disociación entre el **RA** y su ligando, y la unión inmediata del antiandrógeno, serían uno de los mecanismo de competencia por el **RA**.^{3,6}

Para distinguir los diferentes antiandrógenos resulta importante considerar cuatro aspectos: (i) especificidad en relación con los diferentes sistemas de receptor de esteroide, (ii) propiedades del antagonista o un agonista parcial del **RA**, (iii) especificidad adicional debida a la selectividad en la penetración en los tejidos o al metabolismo de los compuestos fuera del órgano blanco y (iv) la cuestión práctica de si son de estructura no esteroideal o esteroideal.⁶

Algunos ejemplos de antiandrógenos de estructura no esteroideal son la bicalutamida (**c**), el dietilestilbestrol (estrógeno) (**d**) y el ketoconazol (**e**), (Figura 1.6.1). Se ha demostrado que el mecanismo de acción de la bicalutamida radica en su afinidad por el **RA**, compitiendo con la **DHT** por los dominios de unión. El ketoconazol es un agente que disminuye drásticamente la producción de **T**, debido a que interactúa con el **RA** e inhibe la enzima citocromo P-450, involucrada en su biogénesis. Aunque esta clase de antiandrógenos no presentan efectos agonistas hormonales, han mostrado severos efectos colaterales, incluyendo hepatotoxicidad, diarreas, náuseas y vómitos. Por otro lado, la desventaja más grande que presentan estos compuestos es su vida media muy corta y como resultado las mayores dosis en tiempos cortos que se asocian a efectos colaterales inaceptables.^{1,4}

Los antiandrógenos de estructura esteroideal pueden ser de origen natural como la progesterona (**b**, Figura 1.2.1, página 5) y de origen sintético. Entre los compuestos de origen sintético se encuentran el acetato de ciproterona (**ACP**, **f**), la oxendolona (**g**) y el BOMT (**h**), (Figura 1.6.1). El **ACP** es quizás el antiandrógeno más conocido, es el prototipo de los compuestos que compiten con la **DHT** por el sitio de unión en el **RA**; que muestra actividad antigonadotrópica, actúa sobre el eje hipotálamo-pituitaria-testículos y

por lo tanto previene la liberación de **HL** e inhibe la biosíntesis de **T**.⁶ La oxendolona y el BOMT son otros fármacos menos estudiados, pero que presentan actividad antiandrogénica al competir por el **RA**. La mayoría de estos antiandrógenos presentan efectos secundarios severos que reducen su utilidad clínica. Dentro de estos efectos colaterales, se pueden presentar anomalías a todos los niveles fisiológicos, que van desde los prostatales y conducta sexual, hasta anomalías hormonales, como son la pérdida de la libido, ginecomastia, impotencia y anomalías en el espermatozoides y corazón.^{1,4}

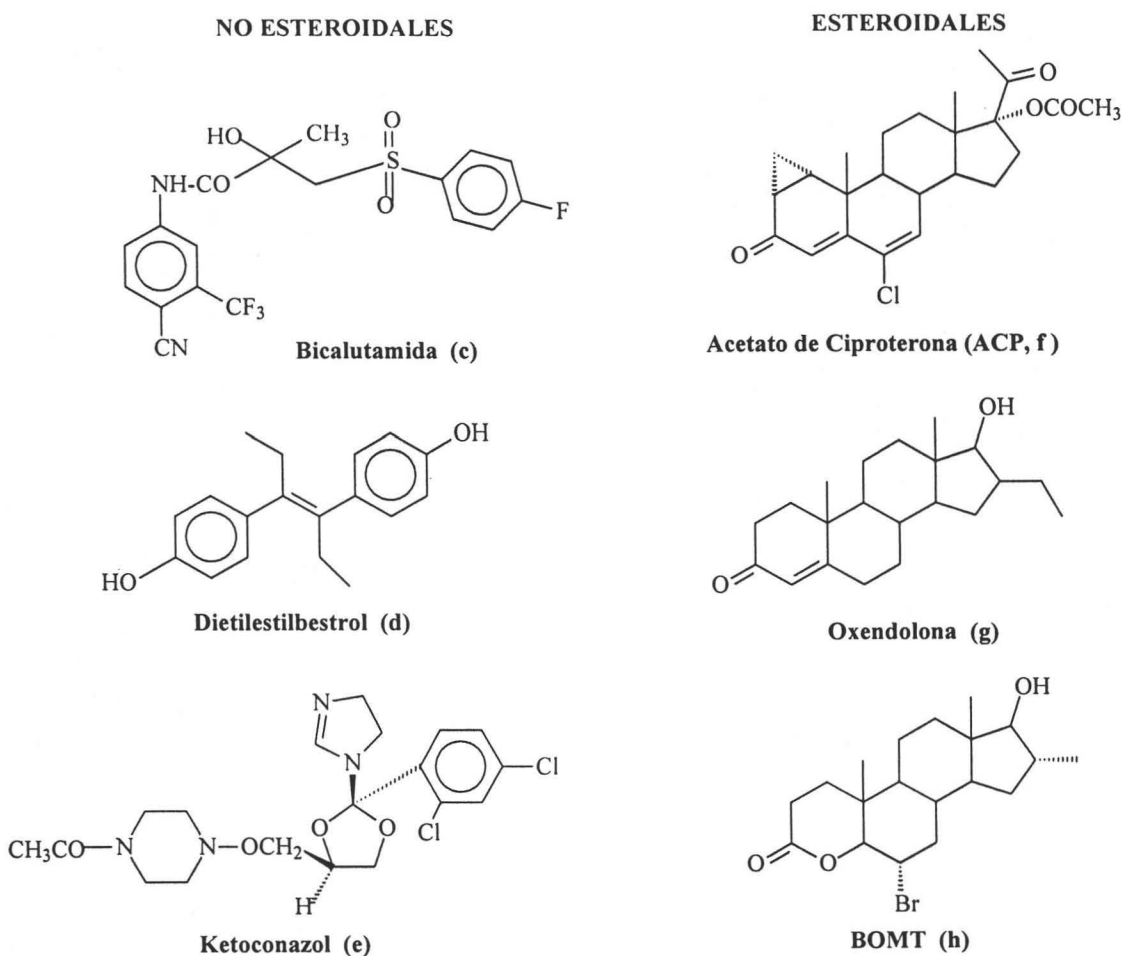


Figura 1.6.1 Ejemplos de antiandrógenos

Otros dos compuestos de estructura esterooidal y de origen sintético son la finasterida (i) y epristerida (j) (Figura 1.6.2), los cuales se caracterizan por ser inhibidores de la enzima

5 α -reductasa. Estos compuestos representan ejemplos de dos tipos de inhibidores diseñados con base en el mecanismo de transformación enzimática de la **T** a la **DHT**. El primer tipo de inhibidores lo constituyen los sustratos análogos a la **T**, los cuales compiten con ella inhibiendo su unión al complejo 5 α -reductasa-NADPH. El prototipo de esta clase de inhibidores reversibles es la finasterida (i), conocida comercialmente como Proscar. El segundo tipo de inhibidores lo constituyen compuestos que mimetizan al enolato intermediario, formado durante la reducción enzimática de la **T**. Estos inhibidores se unen al complejo 5 α -reductasa-NADP⁺ (Figura 1.3.1, página 6), después que la **DHT** ha sido liberada, lo cual ocasiona que dicho complejo no pueda entrar a otro ciclo catalítico. El prototipo de esta clase de inhibidores es la epristerida (j). Estos inhibidores de la acción de la 5 α -reductasa, inducen el decremento de la concentración de **DHT**, aumentando los niveles de **T** y con ello se produce una disminución marcada del tamaño de la próstata, sin presentar efectos secundarios no deseables, mejorando la calidad de vida del enfermo, en contraste con los otros compuestos antes descritos utilizados en los tratamientos terapéuticos.^{1,4}

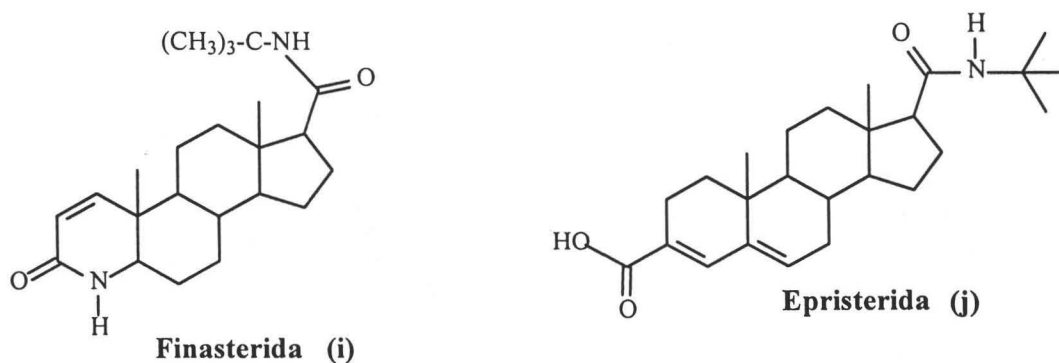


Figura 1.6.2 Ejemplos de inhibidores de la enzima 5 α -reductasa

1.7. Cáncer de próstata e HPB

Tanto la enzima 5 α -reductasa y la **DHT** tienen importancia en el crecimiento de la próstata. Diversos estudios han demostrado que la característica esencial de la próstata es su dependencia de la presencia continua de andrógenos para mantener su estructura y funcionalidad.^{1,6} Por ejemplo, una cantidad insuficiente de **T** dentro del suero fetal provoca

que la próstata no se desarrolle; la glándula tampoco se desarrolla en hombres con pseudohermafroditismo (caso reportado en República Dominicana), quienes presentan deficiencia de la enzima 5α -reductasa tipo II y por lo tanto de **DHT**.¹ Es decir, los andrógenos son necesarios para la vida de las células prostáticas: normales o sanas, la acción de éstos previene directamente la muerte de las células y también estimulan la síntesis y liberación de factores de crecimiento. Las células sanas de un organismo por medio de un proceso de retroalimentación (en el cual participan los andrógenos) regulan su proliferación. La reproducción celular de un tejido en estado normal (sano), ocurre sólo cuando es direccionada por otras células en su vecindad, asegurando de esta manera que cada tejido u órgano mantenga su tamaño y su forma apropiadas para las necesidades del cuerpo.^{1,6}

Contrariamente, las células cancerosas violan el esquema de crecimiento y comienzan a seguir sus propias señales de proliferación y tampoco mueren en ausencia de andrógenos (cuando las células cancerosas son sensibles a andrógenos).^{1,6} Además, poseen la habilidad de migrar desde los sitios donde se originaron, invadiendo tejidos a los alrededores y formando masas distantes (metástasis). Los tumores formados por esta clase de células malignas se tornan cada vez más dañinos, convirtiéndose incluso en letales, cuando interfieren con la funcionalidad de órganos y tejidos necesarios para la supervivencia de un organismo. En el cáncer de próstata, los eventos que controlan el ciclo celular se encuentran desregulados por diversos factores, promoviendo un crecimiento inadecuado de la glándula. A pesar de lo anterior y debido a que esta glándula se encuentra encapsulada, se retrasa la metástasis del cáncer y su diagnóstico oportuno, siendo una enfermedad de alta incidencia en hombres de edad avanzada.^{1,6} La **HPB** es otro de los padecimientos que afectan a varones adultos, caracterizada por el agrandamiento anormal de la próstata y la formación de nódulos.^{1,12-13}

Ambas patologías tienen diversas características en común: como la incidencia en la vejez y se encuentran directamente ligadas a concentraciones altas de andrógenos. También los diversos factores de patogénesis son comunes en ambas, por ejemplo: la raza, la

variación geográfica y posiblemente la dieta rica en grasas.^{1,14-16} Los signos y síntomas de alerta de ambos padecimientos son similares como: flujo de orina lento, interrumpido o con control difícil; frecuente necesidad de orinar, dolor al orinar, dolor pélvico o en la espalda. Obviamente, estos síntomas se deben al agrandamiento de la próstata, obstruyendo los conductos urinarios y los tejidos que se encuentran alrededor de ella.^{1,12}

Dentro de los métodos de diagnóstico más utilizados se encuentran la prueba del Antígeno Prostático Específico (APS) y el examen por tacto rectal. El APS es una glucoproteína que secretan las células epiteliales de la próstata tanto en estado normal como maligno, pero cuando el cáncer está presente, los niveles en circulación frecuentemente se elevan (mayores a 4 ng/mL). En el examen por tacto rectal, se detectan mecánicamente tumores por la dureza o nódulos en la glándula. Sin embargo, por este procedimiento sólo se pueden identificar tumores no microscópicos.^{1,6}

Dentro de los métodos disponibles para el tratamiento del cáncer de próstata e **HPB**, se encuentran: la prostatectomía, la orquiectomía bilateral, la radiación y las terapias hormonales. La prostatectomía, que representa actualmente el tratamiento más aceptado para el cáncer de próstata, incluye la extirpación parcial o total de la glándula prostática, su mayor ventaja es que si el tumor se encuentra localizado (en el 70% de los casos); las células cancerosas pueden ser removidas completamente. La orquiectomía es la extirpación de los testículos donde se produce el 95% de **T**. La radiación externa puede eliminar las células cancerosas, evitando los tediosos procedimientos (operatorios y postoperatorios) sin embargo involucra los propios riesgos de la radiación en los órganos alrededor de la glándula. El precio que los pacientes pagan por someterse a alguno de los procedimientos anteriores, incluyen en diferente grado: un período de recuperación largo, efectos colaterales de largo plazo que pueden incluir varios meses de incontinencia urinaria e impotencia eréctil corta o permanente.¹

Por otro lado, la terapia hormonal está basada en el hecho que los andrógenos promueven el crecimiento de los tumores prostáticos. Al evitar que el cuerpo produzca

andrógenos y/o que se bloquee su acción, se tiene como resultado frecuentemente la muerte de las células malignas. La terapia hormonal con antiandrógenos, los cuales reducen o modifican la acción de los andrógenos en el tejido prostático, se puede combinar con la radiación, alargando el tiempo de vida de los pacientes que se someten a esa combinación de tratamientos.^{1,17}

Finalmente la elección de la terapia adecuada es influenciada por la etapa de la enfermedad en que se encuentra el individuo.^{1,6}

CAPÍTULO

2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El exceso de andrógenos en el organismo provoca enfermedades como el hirsutismo, cáncer de próstata e **HPB**, entre otras y los fármacos comerciales actuales presentan efectos colaterales adversos; por lo tanto, se propone la búsqueda de nuevos antiandrógenos. Para sugerir los compuestos a sintetizar nos referimos a la literatura respecto a estudios de relación estructura-actividad de una serie de derivados de pregnano, la cual aporta ciertos requerimientos estructurales necesarios para obtener compuestos con posible actividad antiandrogénica como son:

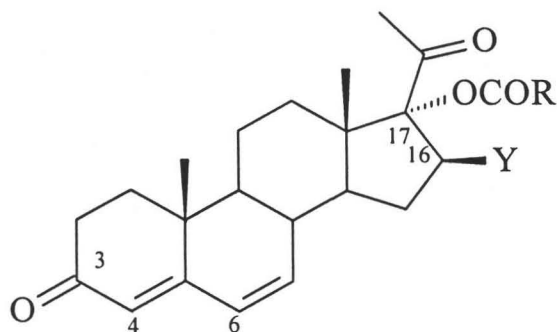


Figura 2.1 Esquema de los requerimientos estructurales en las nuevas moléculas

1. Presencia de un sistema conjugado 4,6-dien-3-ona.
2. Presencia de un grupo voluminoso en C-16 beta orientado.
3. Introducción de un grupo electronegativo y voluminoso en C-17 (éster) o la expansión del anillo D. Aparentemente la presencia del éster en posición C-17 es necesaria para que se presente la actividad antiandrogénica.^{2,3,11,18-20}

Continuando con lo observado por el grupo de trabajo del Dr. Bratoeff en relación a la expansión del anillo D, en trabajos anteriores se plantea la síntesis de derivados del D-homo pregnano^{1,4,21,22} con la siguiente base estructural, que cumplen a la vez con los otros requerimientos mencionados. A continuación se describen los compuestos sintetizados en este trabajo.

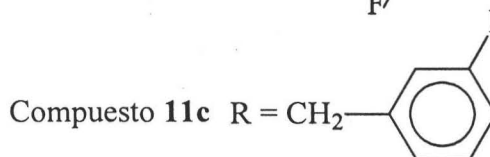
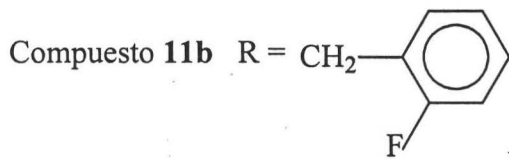
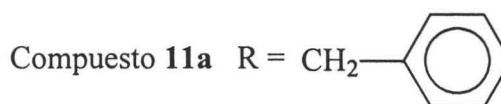
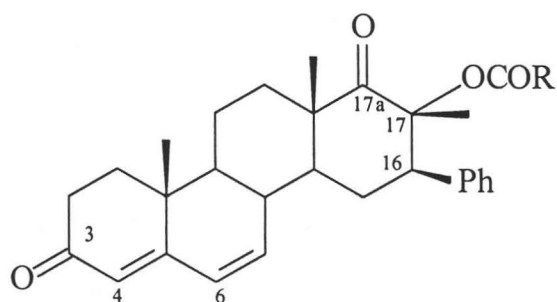


Figura 2.2 Estructura de los compuestos sintetizados en este trabajo

Se propone la presencia de un grupo R de tipo halobencílico, porque el halógeno le confiere estabilidad a la molécula debido a que usualmente no toman parte durante las reacciones metabólicas, siendo los halogenuros aromáticos menos reactivos que los alifáticos. En particular la sustitución de un hidrógeno por flúor, le confiere esa baja reactividad dado lo fuerte del enlace C-F en comparación con el enlace C-H, siendo el enlace C-F el más fuerte con respecto a los otros halógenos. Además, los halógenos en general hacen al compuesto más lipofílico, por lo que aquellos se usan frecuentemente para mejorar la penetración de las membranas lipídicas.²³ Además el flúor puede dificultar la eliminación del ácido aromático.

Una vez concluida la síntesis de los compuestos **11a**, **11b** y **11c**, se determinó la actividad biológica de éstos mediante ensayos biológicos apropiados, los cuales nos ayudarán a identificar si el efecto biológico deseado se produce por inhibición de la enzima 5 α -reductasa y/o por interacción con los RA.

CAPÍTULO

3

OBJETIVOS

Una vez determinados los requerimientos de las moléculas a obtener y utilizando Acetato de 16-dehidropregnenolona como materia prima, se tienen los siguientes objetivos en este estudio.

- Sintetizar y purificar los compuestos que se presentan en la Figura 4.1 (página 21).
- Caracterizar los compuestos **11a**, **11b** y **11c** (Figura 4.1, página 21) por medio de su punto de fusión, y utilizando métodos espectroscópicos (UV, IR, EMIE, RMN ¹H, RMN ¹³C).
 - 16β-fenil-17α-fenilacetoxi-17β-metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona (**11 a**).
 - 16β-fenil-17α-(2-fluorofenilacetoxi-17β-metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona (**11 b**).
 - 16β-fenil-17α-(3-fluorofenilacetoxi-17β-metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona (**11 c**).
- Determinar y analizar la actividad biológica de los esteroides **11a**, **11b** y **11c**, con respecto al estándar finasterida (**i**, Figura 1.6.2, página 10), mediante pruebas (*in vivo* e *in vitro*) de:
 - i. La variación del peso de la próstata, y
 - ii. La transformación de la T (**1**) a DHT (**2**) (Figura 1.3.1, página 6) en homogenados de próstata.

CAPÍTULO

4

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Etapa A. Síntesis y caracterización de los derivados

La pureza de los productos y el avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando cromatoplasmas de gel de sílice comerciales con indicador de fluorescencia F254. Como reveladores se usaron una solución de CoCl_2 al 1% en H_2SO_4 2N y/o lámpara de luz UV ($\lambda=254$ nm), según fuese requerido.

Los compuestos finales (**11a**, **11b** y **11c**) se purificaron por cromatografía en capa fina, utilizando placas preparativas de 30 X 30 cm con gel de sílice Merck 60GF 254 y sílica gel 60G, en una mezcla de elución adecuada para cada compuesto.

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

Los espectros de absorción en el UV de los compuestos sintetizados se llevó a cabo en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Hitachi modelo 200, utilizando como disolvente metanol.

Los espectros de infrarrojo para los derivados y productos finales se determinaron en un espectrofotómetro IR de transformada de Fourier Perkin-Elmer modelo 1600. Las determinaciones se realizaron en película. Para indicar la intensidad de las bandas se emplearon las siguientes abreviaturas: (F) fuerte, (M) media, (D) débil.

El análisis por espectrometría de masas (EMIE) se realizó con un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5985-B CG/MS, por introducción directa utilizando la técnica de Impacto Electrónico a 70eV. Los valores se expresan en m/z (masa/carga).

Los espectros de RMN de hidrógeno (^1H) y carbono (^{13}C) se determinaron en un aparato de RMN Varian VRX-300S, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) están dados en partes por millón (ppm) referidos al TMS. Para indicar las señales en ^1H se utilizaron las siguientes abreviaturas: (s) simple, (d) doble, (t) triple, (m) múltiple, (dd) doble de dobles.

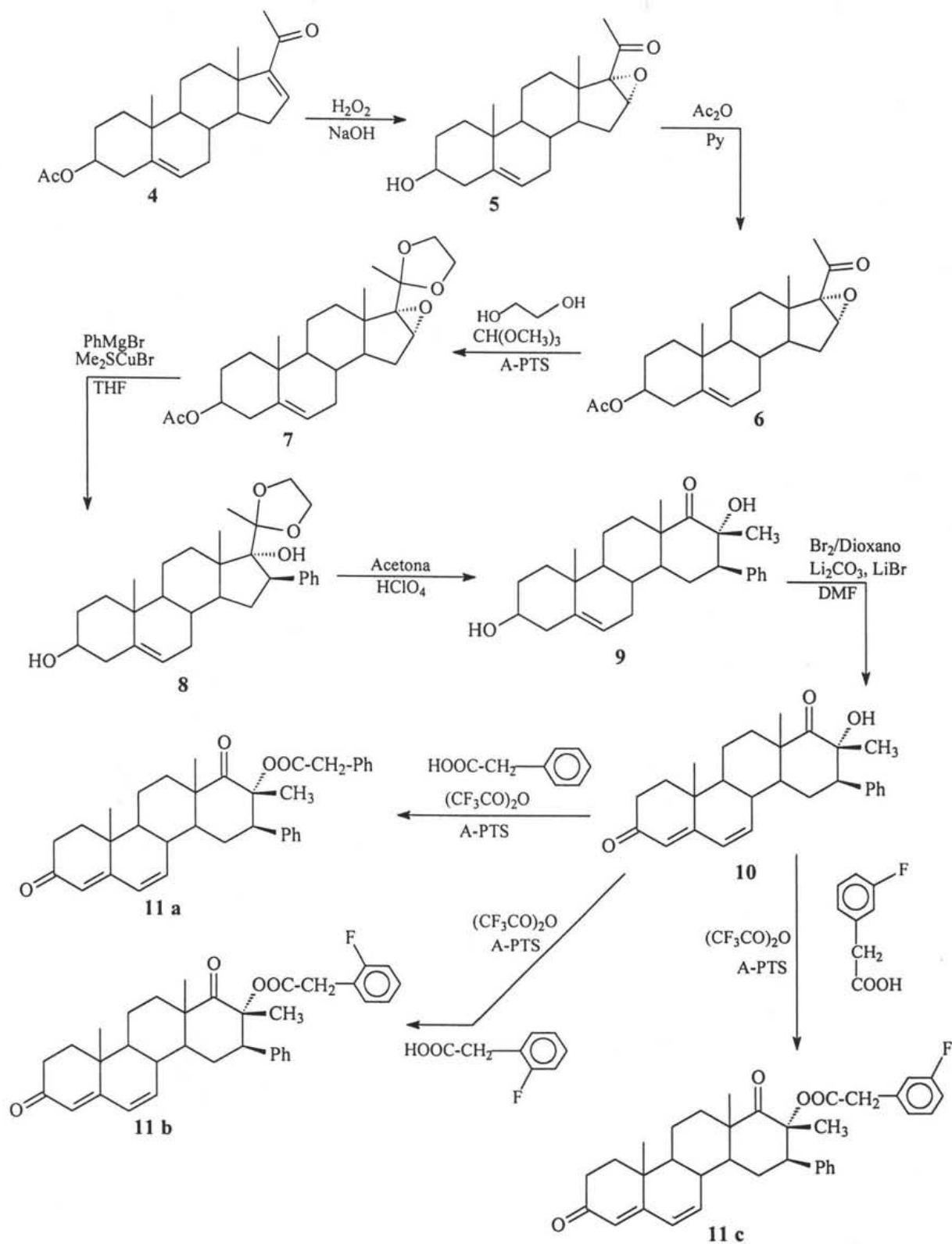
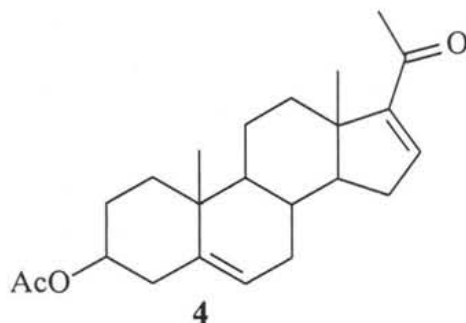


Figura 4.1 Esquema de Síntesis

4.1. Caracterización de la materia prima: acetato de 16-dehidropregnenolona (4)



Fórmula Molecular: C₂₃H₃₂O₃.

Peso Molecular (uma), (espectro 1): 356.

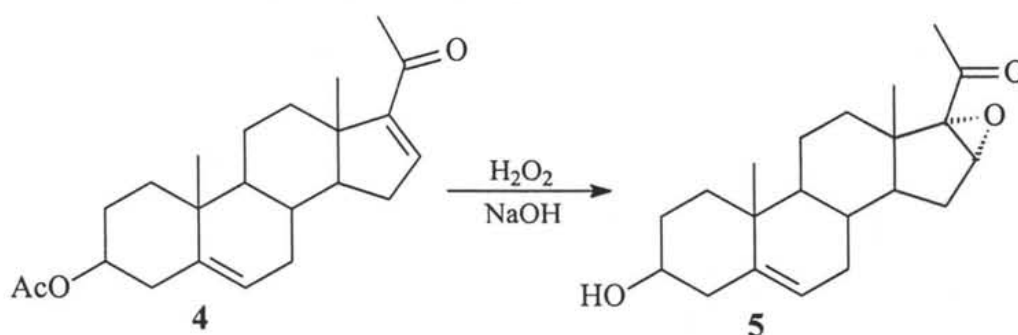
Punto de Fusión: 167 - 170 ° C. (Punto de Fusión Literatura²⁴: 170 – 172 ° C)

UV (λ_{\max}), (espectro 2): 238.21 (C=O α,β insaturado en C20, C16-C17) nm.

IR (ν_{\max}), (espectro 3): 2945 (D, CH₃-, CH₂-), 1729 (F, MeCOOR en C3), 1661 (F, C=O en C20), 1584 (D, C=C conjugado en C16), 1247 (F, MeCOOR en C3), 1037 (F, MeCOOR en C3) cm⁻¹.

RMN ¹H (δ), (espectro 4): 6.8 (1H, dd, J₁=3Hz, J₂=1.5Hz, H16), 5.4 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H6), 4.6 (1H, m, H3), 2.26 (3H, s, MeCOO-), 2.04 (3H, s, H21), 1.06 (3H, s, H19), 0.92 (3H, s, H18) ppm.

4.2. Síntesis de 16 α , 17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (5).^{11,25}



REACCIÓN 1

En un matraz bola de 100 mL con agitador magnético, se disolvió la materia prima **4** (1 g, 2.8 mmol) en 50 mL de metanol caliente, bajo agitación constante se agregaron 2 mL de una solución de hidróxido de sodio 4N y 4 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. La

mezcla resultante se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. El exceso de metanol se destiló a presión reducida en un rotavapor y se agregó hielo a la mezcla concentrada. El sólido blanco (5) que se separó se filtró con vacío y se lavó con agua destilada hasta pH neutro. El producto se secó a temperatura ambiente y después se recrystalizó con metanol. El rendimiento obtenido fue de 86.2% (0.80 g, 2.4 mmol).

Fórmula Molecular: $C_{21}H_{30}O_3$.

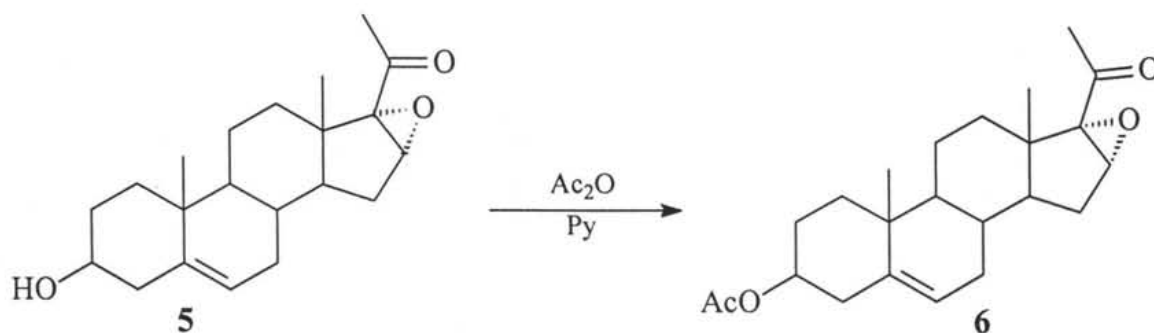
Peso Molecular (uma), (espectro 5): 330.

Punto de Fusión: 181 – 184 ° C. (Punto de Fusión Literatura¹¹: 180-182 ° C)

IR (ν_{max}), (espectro 6): 3371 (M, -OH en C3), 2937 (F, CH_3 -, CH_2 -), 1692 (F, C=O en C20) 1376 (M, C=C en C5), 1056 (M, C-O, en C3), 857 (D, epóxido C16-C17) cm^{-1} .

RMN 1H (δ), (espectro 7): 5.38 (1H, dd, $J_1=4$ Hz, $J_2=2$ Hz, H6), 3.69 (1H, dd, $J_1=4$ Hz, $J_2=2$ Hz, H16), 3.52(1H, m, H3), 2.03 (3H, s, H21), 1.05 (3H, s, H19), 1.02 (3H, s, H18) ppm.

4.3. Síntesis de 3 β -acetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona (6).^{11,25}



REACCIÓN 2

En un matraz bola de 25 mL, se disolvió 1g (3.0 mmol) del producto 5 en 5 mL (61.9 mmol) de piridina. Se agregaron bajo agitación magnética constante 10 mL (106 mmol) de anhídrido acético y la mezcla de reacción se agitó por un intervalo de 6 horas a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en un vaso de precipitados con aproximadamente 30 g de hielo y se agitó por 30 minutos. El precipitado blanco 6 se separó por filtración al vacío y se lavó con agua hasta pH neutro. Se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se recrystalizó en metanol. Rendimiento 91.2% (1.03 g, 2.8 mmol).

Fórmula Molecular: C₂₃H₃₂O₄.

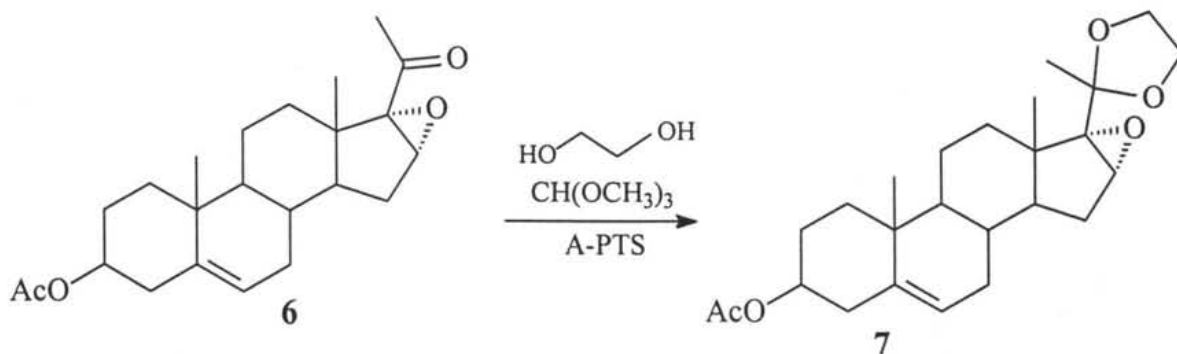
Peso Molecular (uma), (espectro 8): 372.

Punto de Fusión: 153 – 156 ° C. (Punto de Fusión Literatura¹¹: 157 – 159 ° C)

IR (ν_{max}), (espectro 9): 2953 (M, CH₃-, CH₂-), 1732 (F, MeCOOR en C3) 1698 (F, C=O en C20), 1376 (M, C=C, en C5), 1245 (F, MeCOOR en C3), 1032 (M, MeCOOR en C3) cm⁻¹.

RMN ¹H (δ), (espectro 10): 5.30 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H6), 4.58 (1H, m, H3), 3.42 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=1 Hz, H16), 1.96 (6H, s, CH₃COO- y H21), 0.98 (3H, s, H19), 0.97 (3H, s, H18) ppm.

4.4. Síntesis de 3β-acetoxi-16α,17α-epoxi-20-etilendioxipregn-5-eno (7).^{11,25}



En un matraz bola se disolvieron 1 g (2.6 mmol) del producto 6 y 0.020 g (1.13 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico (A-PTS), en 6 mL de tolueno. Bajo agitación magnética constante se adicionaron 3.2 mL (53 mmol) de etilenglicol y 4 mL (45 mmol) de ortoformiato de metilo. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente. Se agregó 0.097 g (1.18 mmol) de acetato de sodio anhidro y se continuo agitando por 15 minutos. Se vertió esta mezcla en un embudo de separación que contenía 20 mL de agua y 20 mL de cloroformo. Se separó la fase orgánica, se lavó con 20 mL de agua y la fase clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro. Se filtró y se evaporó sequedad en un rotavapor a presión reducida, obteniéndose un sólido blanco (7) que se recrystalizó en metanol. El rendimiento de esta reacción fue 77.6% (0.83 g, 2.12 mmol).

Fórmula Molecular: C₂₅H₃₆O₅.

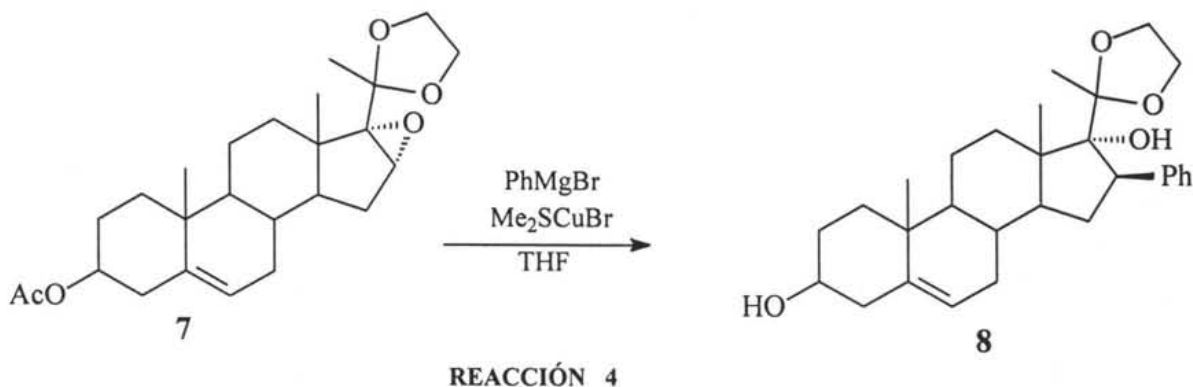
Peso Molecular (uma), (espectro 11): 416.

Punto de Fusión: 193 – 196 ° C. (Punto de Fusión Literatura¹¹:192 – 194 ° C)

IR (ν_{max}), (espectro 12): 2941 (M, CH₃-, CH₂-), 1719 (F, MeCOOR en C3), 1248 (F, MeCOOR en C3), 1033 (M, MeCOOR en C3) cm⁻¹.

RMN ¹H (δ), (espectro 13): 5.38 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H16), 4.6 (1H, m, H3), 3.96 (4H, m, etilendioxi en C20), 3.39 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=3 Hz, H16), 2.03 (3H, s, Me de éster en H3), 1.44 (3H, s, H21), 1.04 (3H, s, H19), 0.99 (3H, s, H18) ppm.

4.5. Síntesis de 3 β , 17 α -dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenilpregn-5-eno (8).²²



En un matraz de dos bocas de 50 mL con agitador magnético se colocaron 1.0 g (2.4 mmol) del producto 7 y 0.33 g (1.6 mmol) de complejo de bromuro de dimetilsulfuro de cobre. Se colocó en una de las bocas del matraz un refrigerante en posición de reflujo y en la otra boca del matraz, así como en el extremo superior del refrigerante, tapones septum. Se evacuó el sistema con una bomba de vacío y en estas condiciones se dejó por 24 horas. Para la reacción de apertura del epóxido, se suspendió la evacuación y se introdujo atmósfera de nitrógeno seco en el matraz. Se agregó 20 mL de una solución de bromuro de fenilmagnesio 1M en THF y la mezcla de reacción se mantuvo a la temperatura de reflujo por 24 horas con agitación continua. Se enfrió y la mezcla se vertió lentamente en 20 ml de una solución acuosa saturada fría de cloruro de amonio. Se extrajo con 3 X 20 mL de cloroformo y la fase orgánica combinada se lavó con agua hasta pH neutro, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a sequedad en un rotavapor a

presión reducida, obteniéndose un producto aceitoso (8) que solidificó y se recrystalizó en metanol. El rendimiento de esta reacción fue de 44.61% (0.41 mmol).

Fórmula Molecular: C₂₉H₄₀O₄.

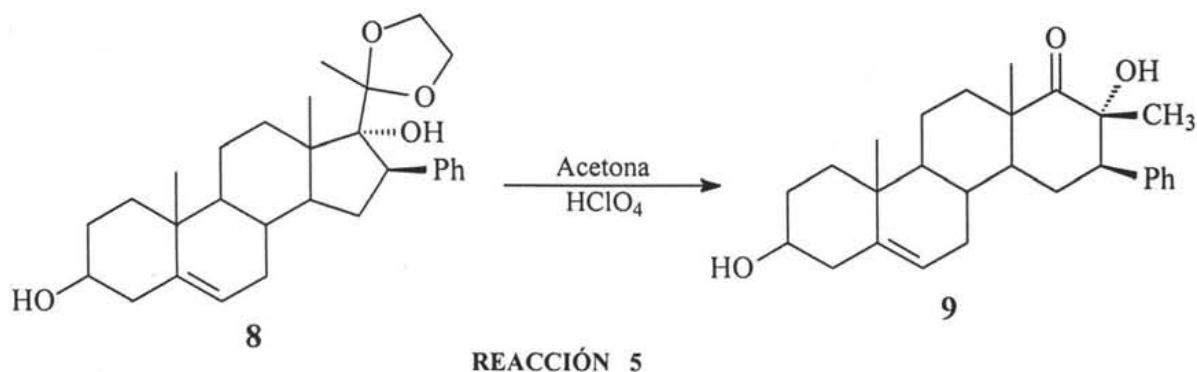
Peso Molecular (uma), (espectro 14): 452.

Punto de Fusión: 216–219 ° C. (Punto de Fusión literatura²²: 220 – 222 ° C)

IR (ν_{mzx}), (espectro 15): 3375 (M, HO- en C3 y C17), 2937 (F, CH₃-, CH₂-), 2894 (F, -CH₂-O- de etilendioxi), 1548, 1493 (D, C=C aromáticos en C16), 1049 (F, C-O-C del etilendioxi) cm⁻¹.

RMN ¹H (δ), (espectro 16): 7.2 (5H, m, aromáticos), 5.40 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H6), 3.6 (4H, m, etilendioxi en C20), 2.65 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H16), 1.23 (3H, s, H21), 1.12 (3H, s, H19), 1.07 (3H, s, H18) ppm.

4.6. Síntesis de 3 β , 17 α -dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homopregn-5-en-17a-ona (9).²¹⁻²²



En un matraz bola de 250 mL, provisto de agitador magnético, se hizo una solución del producto 8 (1 g, 2.22 mmol) en 100 mL de acetona. Se agregó gota a gota, bajo agitación constante 1.25 mL (0.13 mol) de ácido perclórico al 69 – 72 % v/v y se dejó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se vertió en 300 mL de una solución saturada de NaHCO₃ bajo agitación, precipitando el compuesto 9 como un sólido blanco. Se filtró con vacío y se se lavó con agua destilada hasta pH neutro. El producto se secó primero a temperatura ambiente y después se recrystalizó en metanol. El rendimiento obtenido fue 90.65 % (0.82 g, 2.0 mmol).

Fórmula Molecular: C₂₇H₃₆O₃.

Peso Molecular (uma), (espectro 17): 408.

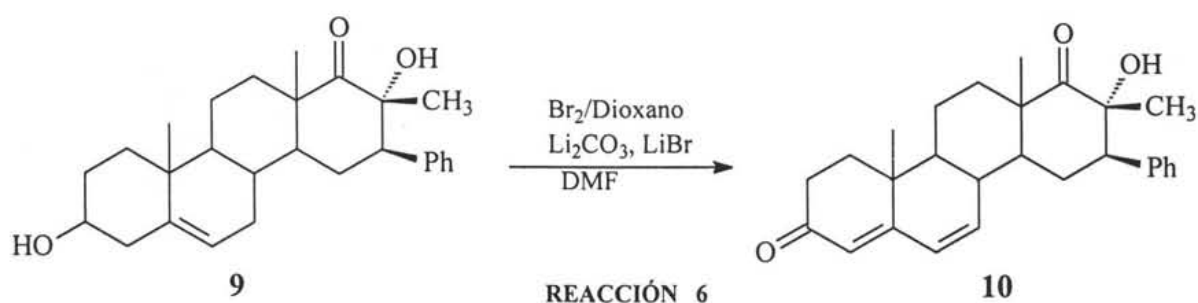
Punto de Fusión: 204– 207 ° C.

(Punto de Fusión Literatura²²:209 – 211 ° C)

IR (ν_{max}), (espectro 18): 3456 (M, HO- en C3 y C17), 2935 (F, CH₃-, CH₂-), 1695 (F, C=O de cetona en C17a), 1601 (D, C=C aromáticos en C16), 1048 (M, C-OH en C17) cm⁻¹.

RMN ¹H (δ), (espectro 19): 7.3 (5H, m, aromáticos), 5.32 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H6), 3.52 (1H, m, CH- en H3), 2.93 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H16), 1.21 (3H, s, H21), 1.12 (3H, s, H19), 1.07 (3H, s, H18) ppm.

4.7. Síntesis de 3 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona (10).²¹⁻²²



En un matraz de dos bocas equipado con un refrigerante en posición de reflujo y provisto de agitador magnético, se colocaron 1 g (2.4 mmol) del producto **9**, 3 g (40 mmol) de carbonato de litio, 2 g (22 mmol) de bromuro de litio y 14 mL de DMF. La suspensión se agitó por espacio de 30 minutos y se adicionó gota a gota y bajo agitación constante, una solución de bromo (0.78 g, 0.26 mL, 4.9 mmol) en 8.5 mL de dioxano. Se calentó a 75° C \pm 4° C durante 2.5 horas y se enfrió a temperatura ambiente. Se filtró y las sales se lavaron con 3 mL de dioxano. Al filtrado reunido se le agregaron 120 mL de una solución acuosa de bisulfito de sodio y bicarbonato de sodio (0.5 g de cada sal por cada 100 mL de agua. Obteniéndose un sólido amarillo **10**, que se separó por filtración a vacío. El producto crudo **10** se recristalizó con acetato de etilo para dar 0.53 g (1.3 mmol, 53.08%) del compuesto **10** puro.

Fórmula Molecular: C₂₇H₃₂O₃.

Peso Molecular (uma), (espectro 20): 404.

Punto de Fusión: 269– 273 ° C.

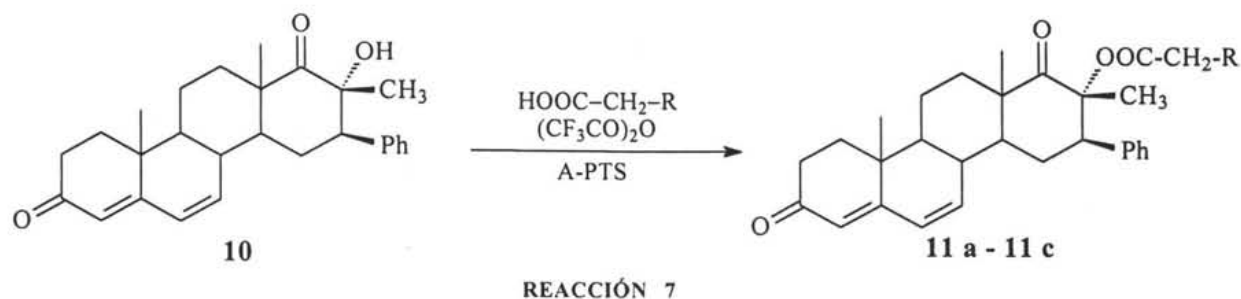
(Punto de Fusión Literatura²²: 278 – 280 ° C)

UV (λ_{max}), (espectro 21): 283.23 (C=O $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturado en C4-C5, C6-C7) nm.

IR (ν_{mzx}), (espectro 22): 3444 (M, HO- en C17), 1694 (M, C=O en C17a), 1652 (F, C=O de cetona en C3), 1617 (D, C=C dieno conjugado en C4-C5, C6-C7) cm^{-1} .

RMN ^1H (δ), (espectro 23): 7.3 (5H, m, aromáticos), 6.31 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=2$ Hz, H7), 6.18 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=2$ Hz, H6), 5.69 (1H, s, H4), 2.99 (1H, dd, $J_1=4$ Hz, $J_2=3$ Hz, C16), 1.29 (3H, s, Me en H17), 1.14 (3H, s, H19), 1.13 (3H, s, H18) ppm.

4.8. Síntesis de derivados 16 β -fenil-17 α -aciloiloxi-17 β -metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona (11 a - 11 c).



En un matraz de 25 mL con agitador magnético se mezclaron 8.96 mmol del ácido correspondiente (Tabla 1), 1.4 mL (0.94 g, 4.03 mmol) de anhídrido trifluoroacético y 11 mg (0.59 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico. La mezcla se agitó por 2 horas a temperatura ambiente, se agregó el compuesto **10** (1 g, 2.47 mmol) y se agitó por 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con 3 X 20 mL de cloroformo. La fase orgánica reunida se lavó con agua hasta pH neutro, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó en un rotavapor a presión reducida. Los productos **11a - 11c** se purificaron por cromatografía en capa fina con un sistema de elución hexano:acetato de etilo (7:3 y 8:2) % v/v, según fue requerido, obteniéndose cristales blancos de cada producto **11a - 11c**.

Tabla 1 Cantidad del ácido correspondiente para la síntesis de los compuestos (**11a - 11c**)

Compuesto	Ácido	Cantidad (8.96 mmol)
11 a	Fenilacético	1.22 g
11 b	2-Fluorofenilacético	1.38 g
11 c	3-Fluorofenilacético	1.38 g

16β-fenil-17α-fenilacetoxi-17β-metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona (11 a)

Rendimiento: 39 % (0.50 g, 0.97 mmol).

Fórmula Molecular: C₃₅H₃₈O₄.

Peso Molecular (uma), (espectro 24): 522.

Punto de Fusión: 186 - 189 ° C.

UV (λ_{max}), (espectro 25): 282.76 (C=O α,β, γ, δ insaturado en C4-C5 y C6-C7) nm.

IR (ν_{max}), (espectro 26): 3030 (D, C=C-H en aromáticos), 2953 (F, CH₃-, CH₂-), 1720 (F, C=O del éster en C17), 1704 (F, C=O en C17a), 1667 (F, C=O en C3), 1620 (M, C=C dieno conjugado en C4-C5 y C6-C7), 1216 (D, COO-R de éster en C17), 870, 761, 728 y 700 (M, aromáticos monosustituido en C16 y del éster en C2') cm⁻¹.

RMN ¹H (δ), (espectro 27): 7.35 (5H, m, aromáticos), 7.23 (3H, m, aromáticos), 6.82 (2H, dd, J₁=8 Hz, J₂=1.4 Hz, aromáticos), 6.26 (1H, d, J₁=10 Hz, H7), 6.13(1H, dd, J₁=3 Hz, J₂=10 Hz, H6) 5.68 (1H, s, H4), 3.67 (2H, s, COO-CH₂-Ph, (C2')), 1.26 (3H, s, H21), 1.22 (3H, s, H19), 1.17 (3H, s, H18) ppm.

A continuación se esquematiza la numeración que se uso para el grupo fenilacetoxi en C17.

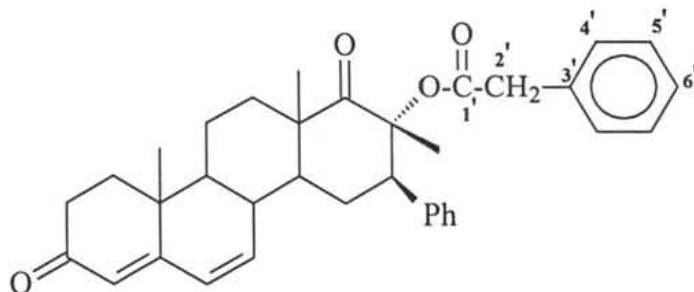


Tabla 2 RMN ¹³C (δ), (espectro 28 y 29):

Tipo de Carbono	Asignación: ppm
CH ₃ - 1° (3)	C18: 16.22, C19: 17.75, C21: 22.88
-CH ₂ - 2° (6)	C11: 19.28, C15: 25.80, C12: 33.04, C2: 33.54, C1:33.81, C2': 41.78
-CH- 3° (17)	C8: 36.10, C9: 44.28, C14: 48.40, C16: 49.48, C4: 123.83, C- <i>para</i> : 127.04, C6': 127.28, C- <i>orto</i> (2C): 128.07, C4' (2C): 128.69, C- <i>meta</i> (2C): 128.74, C6: 128.93, C5' (2C): 129.55, C7: 138.18

Tipo de Carbono	Asignación: ppm
C 4° (9)	C10: 36.15, C13: 48.52, C17: 84.21, C3': 133.48, C <i>ipso</i> del grupo fenilo en C16: 139.26, C5: 162.61, C=O del éster en C1': 170.73, C=O en C3: 199.40, C=O en C17a : 211.60

16β-fenil-17α-(2-fluorofenilacetoxi-17β-metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona (11 b).

Rendimiento: 37.41 % (0.50 g, 0.93 mmol).

Fórmula Molecular: C₃₅H₃₇FO₄.

Peso Molecular (uma), (espectro 30): 540.

Punto de Fusión: 192 - 194 ° C.

UV (λ_{\max}), (espectro 31): 284.14 (C=O $\alpha,\beta, \gamma, \delta$ insaturado en C4-C5 y C6-C7) nm.

IR (ν_{\max}), (espectro 32): 3030 (D, C=C-H en aromáticos), 2946 (M, CH₃-, CH₂-), 1730 (M, C=O del éster en C17) 1712 (F, C=O en C17a), 1662 (F, C=O en C3), 1618 (M, C=C dieno conjugado en C4-C5 y C6-C7), 1268 (M, C-F en C4'), 1215 (D, COO-R de éster en C17), 877, 758 y 702 (M, aromáticos monosustituido en C16), 758 (F, aromático 1,2 disustituido del éster en C2') cm⁻¹.

RMN ¹H (δ), (espectro 33): 7.26-7.35 (4H, m, aromático 1,2 disustituido en C2'), 7.04-7.16 (5H, m, aromáticos), 6.27 (1H, d, J₁=9.5 Hz, H7), 6.13 (1H, dd, J₁=9.5 Hz, J₂=2.6 Hz, H6) 5.67 (1H, s, H4), 3.75 (2H, dd, J₁=16.2 Hz, J₂=1.5 Hz, en COO-CH₂-Ph, (C2')), 1.22 (3H, s, H21), 1.13 (3H, s, H19), 1.11 (3H, s, H18) ppm.

A continuación se esquematiza la numeración que se uso para el grupo fenilacetoxi en C17.

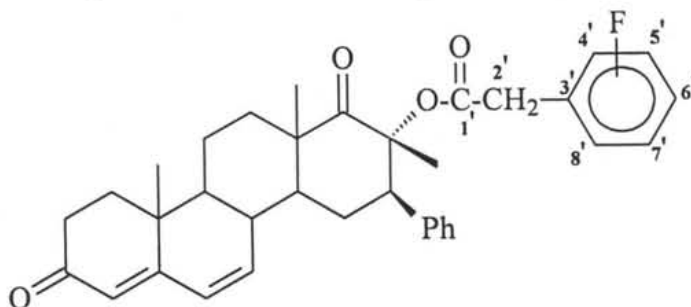


Tabla 3 RMN ¹³C (δ), (espectro 34 y 35):

Tipo de Carbono	Asignación: ppm
CH ₃ - 1° (3)	C18: 16.47, C19: 18.00, C21: 23.14
-CH ₂ - 2° (6)	C11: 19.51, C15: 26.07, C12: 33.21, C2: 33.77, C1:34.08, C2': 35.10
-CH- 3° (16)	C8: 36.39, C9: 44.52, C14: 48.70, C16: 49.66, C5' :115.67, C4: 124.08, C7': 124.52, C- <i>para</i> : 127.43, C- <i>orto</i> (2C): 128.43, C- <i>meta</i> (2C): 129.07, C6: 129.19, C6': 129.53, C8': 132.09, C7: 138.46
C 4° (10)	C10: 36.33, C13: 48.76, C17: 84.76, C3': 121.20, C <i>ipso</i> del grupo fenilo en C16: 139.57, C-F en C4': 159.68, C5: 162.88, C=O del éster en C1': 170.22, C=O en C3: 199.72, C=O en C17a : 211.80

16β-fenil-17α-(3-fluorofenilacetoxi-17β-metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona (11 c).

Rendimiento: 37.41 % (0.50 g, 0.93 mmol).

Fórmula Molecular: C₃₅H₃₇FO₄.

Peso Molecular (uma), (espectro 36): 540.

Punto de Fusión: 178 - 180 ° C.

UV (λ_{max}), (espectro 37): 284.21 (C=O α,β, γ, δ insaturado en C4-C5 y C6-C7) nm.

IR (ν_{max}), (espectro 38): 3030 (D, C=C-H en aromáticos), 2943 (M, CH₃-, CH₂-), 1711 (F, C=O en C17a), 1662 (F, C=O en C3), 1616 (M, C=C dieno conjugado en C4-C5 y C6-C7), 1266 (M, C-F en C5'), 1217 (D, COO-R de éster en C17), 875, 765 y 702 (M, aromático monosustituido en C16 y aromático 1,3 disustituido en C2').

RMN ¹H (δ), (espectro 39): 7.37-7.30 (1H, dd, J₁=8 Hz, J₂= 7 Hz, H7'), 7.26-7.19 (3H, m, aromático 1,3), 7.13-6.98 (3H, m, aromáticos), 6.91-6.87 (2H, m, aromáticos), 6.27 (1H, d, J₁=10.3 Hz, H7), 6.13 (1H, dd, J₁=10.3 Hz, J₂=2.6 Hz, H6) 5.7 (1H, s, H4), 3.66 (2H, s, COO-CH₂-Ph, (C2')), 1.22 (3H, s, H21), 1.14 (3H, s, H19), 1.12 (3H, s, H18) ppm.

Tabla 4 RMN ^{13}C (δ), (espectro 40 y 41):

Tipo de Carbono	Asignación: ppm
CH ₃ - 1° (3)	C18: 16.22, C19: 17.73, C21: 22.85
-CH ₂ - 2° (6)	C11: 19.25, C15: 25.83, C12: 33.83, C1:33.51, C2: 32.00, C2': 41.40
-CH- 3° (16)	C8: 36.12, C9: 44.38, C14: 48.44, C16: 49.45, C6': 114.27, C4': 116.62, C4: 123.85, C8': 125.26, C- <i>para</i> : 127.18, C- <i>orto</i> (2C): 128.12, C- <i>meta</i> (2C): 128.75, C6: 128.97, C7': 130.11, C7: 138.10
C 4° (10)	C10: 36.08, C13: 48.51, C17: 84.55, C3': 135.75, C <i>ipso</i> del grupo fenilo en C16: 139.14, C-F en C5': 162.84, C5: 162.56, C=O del éster en C1': 170.11, C=O en C3: 199.41, C=O en C17a : 211.45

Etapa B. Evaluación biológica de la actividad antiandrogénica

La actividad biológica (*in vivo* e *in vitro*) de los esteroides sintetizados **11a**, **11b** y **11c** se determinó mediante dos pruebas:

1. Determinación del peso de la próstata
2. Transformación de la **T** en **DHT** en homogenados de próstata.

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

Equipos empleados:

- Contador de centelleo Liquid Scintillation Analyzer, modelo Tricards 2100 TR-packard, para medir la radiactividad,
- Incubadora modelo BMR-18/25,
- Centrífuga modelo Allegra 6R Centrifuge Beckman,

- Rotor SW 60Ti Beckman,
- Micropipetas electrónicas, Advanced electronic pipette Rainin modelo Edip 3, con capacidad para 10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L y
- Lámpara UV ($\lambda = 254$ nm).

Reactivos empleados:

- Compuestos: **11a**, **11b** y **11c**.
- Cromatofolios de gel de sílice 60F254 Merck.
- Treo-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol (ditiotreitól DTT).
- **DHT (2)**
- Dihidrotestosterona tritiada [3 H] DHT.
- Diclorometano (CH₂Cl₂).
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- Éter.
- Glicerol
- HCl-Tris (Trisma Hydrochloride).
- Líquido de centelleo Ultima Gold.
- Molibdato de sodio.
- Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH).
- Sacarosa
- Finasterida (i)
- Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 y pH 7.0.
- **T (1)**.
- Testosterona tritiada [3 H]T.
- Aceite de sésamo (ajonjolí).

4.1. Experimento *in vivo*: Efecto de los compuestos **11a**, **11b** y **11c** sobre el peso de la próstata de hámster.

Este ensayo biológico se fundamenta en el hecho de que la enzima 5 α -reductasa y los **RA** se encuentran presentes en este tejido, de tal manera que si el compuesto a evaluar inhibe a dicha enzima o interactúa con el **RA** provocará una disminución en el peso de la próstata, debido a la disminución en la concentración de **DHT (2)**, Figura 1.3.1, página 6) o a la obstrucción de los **RA** frente a este metabolito.

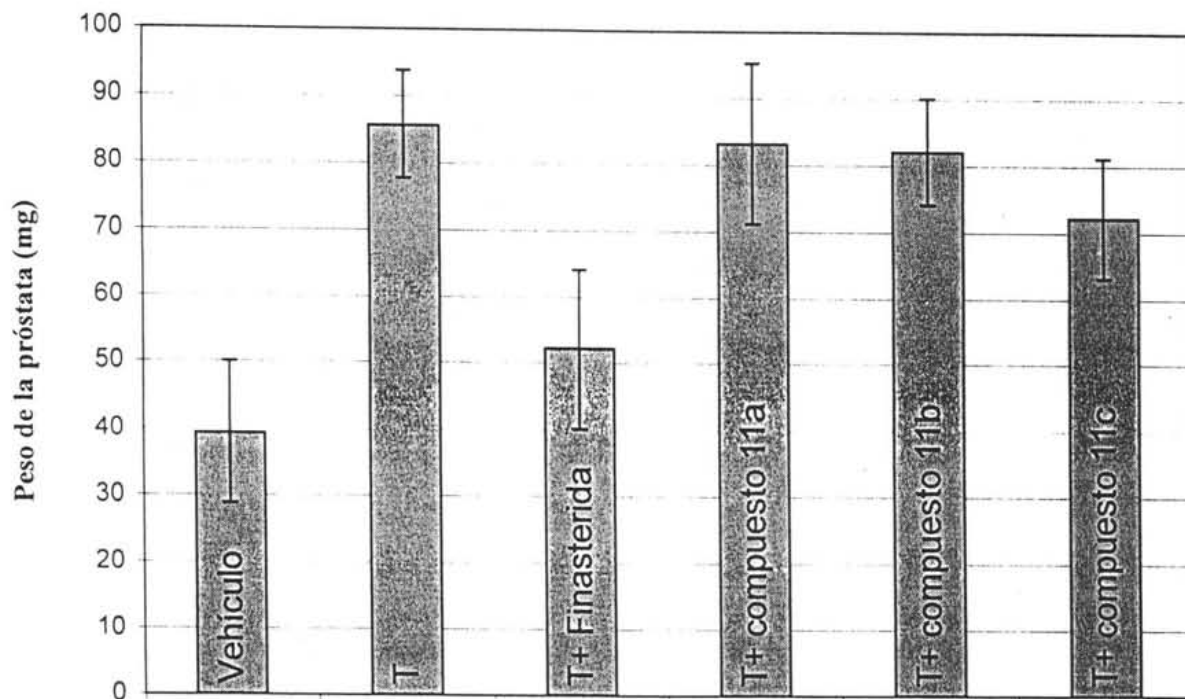
Para realizar este ensayo biológico se utilizaron seis grupos de cuatro hámsteres cada uno, con diferentes tratamientos. A cada uno de los animales de los diversos grupos, se les administraron por vía subcutánea 200 µg de **T (1)**, Figura 1.2.1, página 5) y 400 µg de cada uno de los esteroides (**11a**, **11b** y **11c**) disueltos en aceite de sésamo (ajonjolí) como vehículo. Se aplicaron inyecciones diarias por un periodo de seis días y se utilizaron tres grupos de animales como controles:

- ◇ 1er. Grupo, se trató únicamente con vehículo
- ◇ 2do. Grupo, se trató con una solución oleosa de **T (1)**
- ◇ 3er. Grupo, se trató con una solución oleosa de **T (1)** junto con una solución oleosa que contenía finasterida (**i**, Figura 1.6.2, página 10).

Después de seis días, los animales fueron sacrificados mediante anestesia con éter y se obtuvieron las próstatas, las cuales fueron pesadas posteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1.1 y Gráfica 4.1.1.

Tabla 4.1.1 Efecto de los esteroides sobre el peso de la próstata de hámster

Grupo	Tratamiento	Peso de la próstata (mg)
1	Vehículo	39.4 ± 10.6
2	T	85.7 ± 8
3	T + Finasterida	52.2 ± 12
4	T + compuesto 11 a	83.2 ± 12
5	T + compuesto 11 b	82.1 ± 8
6	T + compuesto 11 c	72.2 ± 9



Gráfica 4.1.1 Efecto de los compuestos 11a, 11b y 11c sobre el peso de la próstata

4.2. Experimento *in vitro*: Efecto de los compuestos 11a, 11b y 11c sobre la transformación de la T (1) a DHT (2) en homogenados de próstata.

Este experimento consiste en la inhibición de la actividad de la enzima 5α -reductasa presente en la fracción microsomal de próstata humana de cadáver a pH 7.0. A continuación se describe la técnica para la obtención de la fracción microsomal de próstata.

La próstata de cadáver fue proporcionada amablemente por el Dr. Avissai Alcántara del Departamento de Patología del Hospital General de México y conservada a -70°C . La próstata fue descongelada y picada con tijeras sobre un baño de hielo. A partir de este momento todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C . El tejido se homogeneizó en 2 volúmenes de medio A (fostato de sodio 20 mM, sacarosa 0.32M, 0.1 mM ditiotreitól) a pH de 6.5. Los homogenados se centrifugaron a 1500 g por 20 minutos utilizando el rotor SW 60Ti (Beckman). Los pellets se separaron y se lavaron con 3 volúmenes de medio A y se centrifugaron 2 veces más a 440 g a 0°C por 10 minutos. Los pellets lavados se

suspendieron en medio A y se conservaron a -70°C . La suspensión (5 mg de proteína/mL determinado por el método de Bradford) fue utilizada como fuente de la enzima 5α -reductasa.

Con la fracción microsomal de próstata previamente obtenida, se realizó un estudio metabólico *in vitro* para reconocer el posible efecto inhibitorio del esteroide sobre la enzima 5α -reductasa. Para realizar este ensayo biológico, los esteroides a evaluar (**11a**, **11b** y **11c**) fueron incubados en presencia de 134 μg de proteína de microsomas de próstata y una mezcla de incubación que contenía: 2nM de testosterona tritiada [^3H]T, 2 mM de NADPH, 1mM de ditioneitol y una solución amortiguadora de fosfatos 40 mM a pH 6.5. El ensayo biológico se incubó durante 1 hora a temperatura de 37°C con agitación constante.

Además se preparó un control que contenía fracción microsomal y mezcla de incubación sin inhibidor el cual corresponde al 100% de conversión. La incubación terminó con la adición de CH_2Cl_2 , para después realizar extracciones sucesivas a la mezcla de reacción con el mismo disolvente. La separación de los productos tritiados: [^3H]T y [^3H]DHT, se realizó por C.C.F. en un sistema de elución de cloroformo: acetona (9:1), corriendo la placa 3 veces, separando los compuestos en base a su polaridad (el r.f. de la **T** es 0.55 y el r.f. de la **DHT** es 0.67) y midiendo la radiactividad en la región correspondiente a [^3H]DHT (producto obtenido por la transformación de [^3H]T en presencia de la enzima 5α -reductasa). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.2.1.

Tabla 4.2.1 Inhibición de la enzima 5α -reductasa

Compuesto	IC_{50} *
Finasterida (i)	$8.5 \times 10^{-9} \text{ M}$
Compuesto 11a	$3.1 \times 10^{-7} \text{ M}$
Compuesto 11b	$5.0 \times 10^{-10} \text{ M}$
Compuesto 11c	$7.9 \times 10^{-11} \text{ M}$

* IC_{50} cantidad de sustrato al cual se inhibe el 50% de la actividad de la enzima

CAPÍTULO

5

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Y

CONCLUSIONES

Respecto a la caracterización de la materia prima (4) mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, estas determinaciones coincidieron con las reportadas en la literatura.¹

En el primer paso de la ruta sintética (página 21) se busca la inserción de un grupo oxirano en la molécula, dado que en la misma se plantea la presencia de un grupo α -hidroxilo en C17 y un grupo β -fenilo en C16. Para la inserción del oxirano, se aprovechó la presencia en la materia prima (4) de una cetona α - β insaturada en C20, C16-C17. La epoxidación se realizó con peróxido de hidrógeno al 30% en medio básico y procede mediante la adición nucleofílica (tipo Michael) del anión hidroperóxido sobre la doble ligadura en C16. De esta reacción se obtuvo el compuesto 5, de acuerdo a la técnica descrita en la literatura.^{11,25}

La caracterización correspondiente a la espectroscopia IR (espectro 6), permitió observar la presencia de las bandas en 3371 cm^{-1} y en 1056 cm^{-1} correspondientes al alcohol en C3 (O-H y C-O respectivamente). Se observó la presencia del grupo cetona en C20 (banda de intensidad fuerte en 1692 cm^{-1}). También se observó una banda de intensidad débil en 857 cm^{-1} correspondiente al alargamiento C-O-C del epóxido en C16 y C17.

En el espectro de RMN de ^1H (espectro 7) se observó la señal en 3.7 ppm que integró para un protón y se asignó al hidrógeno en C16 (base del oxirano).

Dado que en la ruta de síntesis se pretende introducir un grupo fenilo en C16, mediante la apertura del epóxido en C16-C17 con un reactivo de Grignard, fue necesario acetilar previamente el alcohol en C3 para evitar la descomposición del reactivo organometálico. En esta REACCIÓN 2, el anhídrido acético y la piridina, forman el electrófilo acetilpiridinio que funciona como la especie acetilante. De esta reacción se obtuvo el compuesto 6, de acuerdo a la técnica descrita en la literatura.^{11,25}

En el espectro de IR (espectro 9) las bandas en 1732, 1245 y 1032 cm^{-1} corresponden al grupo acetoxi en C3; la primera se debe al C=O y las otras dos son las vibraciones entre C-O-C. Finalmente, la banda en 1698 cm^{-1} se debe al grupo cetona en C20.

En el espectro de RMN ^1H (espectro 10) se observó un singlete que integra para 6 hidrógenos en 1.96 ppm, que corresponden a los hidrógenos del metilo del grupo acetoxi en C3 y al metilo en C21. La señal en 4.58 ppm se asignó al hidrógeno en el C3, dada la presencia del grupo acetoxi en esa posición.

En la siguiente **REACCIÓN 3** se protege el carbonilo en C20 mediante la formación de un cetal, debido a que es un centro susceptible del ataque del reactivo de Grignard que se propone para la **REACCIÓN 4**. Esta protección se llevó a cabo empleando etilenglicol, ortoformiato de metilo y ácido-*p*-toluensulfónico como catalizador, obteniéndose el derivado etilendioxi compuesto **7** y se realizó de acuerdo a la técnica descrita en la literatura.^{11,25}

En espectroscopía de IR (espectro 12) se observó el C=O del grupo acetoxi en C3 con una absorción de 1719 cm^{-1} .

En espectroscopía de RMN ^1H (espectro 13), se observó que la señal de los hidrógenos en C21 se desplaza a campo más alto a 1.44 ppm. La señal múltiple a 3.96 ppm que integró para cuatro hidrógenos se asignó al dioxolano en C20.

En la **REACCIÓN 4** se propone la apertura del oxirano para introducir un grupo β -fenilo en C16, al mismo tiempo que se obtiene un grupo α -hidroxilo en C17, lo cual ocurre a través de un mecanismo de sustitución nucleofílica utilizando bromuro de fenilmagnesio (en THF) como nucleófilo y como catalizador el complejo de dimetilsulfuro de cobre. De esta reacción se obtuvo el producto **8**, siguiendo la técnica reportada en la literatura.²²

El espectro de IR (espectro 15) mostró una banda de absorción en 3375 cm^{-1} correspondiente a los alcoholes en C17 y C3, además de la banda en 1049 cm^{-1} asignada al grupo C-O-C del etilendioxi.

El espectro de RMN ^1H (espectro 16) mostró el singulete (1.23 ppm) correspondiente a los tres hidrógenos del metilo en C21. La señal en 7.2 ppm que integró para 5H se asignó a los protones del grupo fenilo introducido en C16. Aparece también la señal (3.6 ppm) correspondiente al grupo etilendioxi en C20.

La siguiente **REACCIÓN 5** consistió en la desprotección del carbonilo en C20, mediante catálisis ácida con ácido perclórico. El medio ácido de la reacción promueve la transcetalización del compuesto **8** con el disolvente que es la acetona, regenerándose así el carbonilo en C20. Una vez regenerado el carbonilo en C20 y por las condiciones ácidas de la reacción, ocurre la expansión del anillo D del esteroide, formándose el D-homo derivado **9**. Esta reacción se realizó de acuerdo a la técnica reportada en la literatura.²¹⁻²²

En el espectro de IR (espectro 18) se observó una banda intensa en 1695 cm^{-1} correspondiente al C=O en 17a y se observó una señal en 3456 cm^{-1} asignada a los alcoholes en C3 y C17.

En el espectro de RMN ^1H (espectro 19), se asignó el singulete en 1.21 ppm a los hidrógenos del metilo β en C17. La señal de 2.93 ppm se asignó al hidrógeno en C16. La señal múltiple en 3.52 ppm se asignó al hidrógeno en C3.

En la **REACCIÓN 6** se formó el sistema 4,6-pregnadien-3-ona, del compuesto **10**, empleando bromo como agente oxidante. La síntesis de este compuesto se realizó de acuerdo a la técnica reportada en la literatura.²¹⁻²² Para verificar la formación del sistema dieno en el producto **10** se usó espectroscopía de UV (espectro 21), donde se observó un máximo de absorción en 283.23 nm.

En el espectro de IR (espectro 22) se observó una banda de absorción en 3444 cm^{-1} correspondiente al alcohol en C17. Las bandas en 1694 y 1652 cm^{-1} se asignaron a los carbonilos en C17a y C3 respectivamente.

En el espectro de RMN ^1H (espectro 23) se aprecia la entidad 4,6-dien-3-ona por las señales en la zona correspondiente a los hidrógenos vinílicos: un singulete en 5.69 ppm correspondiente al hidrógeno en C4 y dos más en 6.18 y 6.31 ppm asignados a los hidrógenos en C6 y C7 respectivamente.

Como se mencionó anteriormente en este trabajo, dentro de los requerimientos de los esteroides a sintetizar se encuentra el contar con grupos voluminosos en C16 y C17. De esta manera la REACCIÓN 7 involucró la esterificación del alcohol α en C17 con cada uno de los tres ácidos: fenilacético, 2-fluorofenilacético y 3 fluorofenilacético. En la primera etapa de cada una de las tres reacciones de esterificación se forma el anhídrido mixto (aciloiloxitrifluoroacético), con el anhídrido trifluoroacético y el ácido con el cual se desea esterificar, utilizando como catalizador ácido-*p*-toluensulfónico. El anhídrido aciloiloxitrifluoroacético reacciona a continuación con el alcohol en C17 del compuesto 10.

Con lo cual se logró efectuar la síntesis de los tres compuestos finales 11a, 11b y 11c (Figura 4.1, página 21).

Para verificar la existencia en los tres ésteres del carbonilo conjugado en C4-C5, C6-C7 se empleó espectroscopía UV (espectros 25, 31 y 37), donde se observó un máximo de absorción en $283 - 284\text{ nm}$.

En los espectros 26, 32 y 38 de IR las bandas en $1704 - 1712$ y $1662 - 1666\text{ cm}^{-1}$ corresponden a los dos carbonilos en C17a y en C3 respectivamente. Para los compuestos 11a y 11b se corrobora la esterificación del α -oxhidrilo en C17, debido a que se observó una señal en $1720 - 1730\text{ cm}^{-1}$ asignada al carbonilo del éster formado en C17. En el espectro 38 del compuesto 11c, la banda anterior no apareció debido a que se sobrepuso parcialmente con la banda de 1711 cm^{-1} asignada al carbonilo en C17a.

En cada espectro de RMN ^1H (espectros 27, 33 y 39) se observó la presencia del sistema α , β , γ y δ insaturado en las señales correspondientes a los hidrógenos vinílicos en 5.7, 6.13 y 6.27 ppm correspondientes a H4, H6 y H7 respectivamente. En los espectros 27 y 39 de los compuesto **11a** y **11c** la señal de 3.67 ppm un singulete, se asignó a los dos hidrógenos en C2' (página 29); mientras para el compuesto **11b** esos hidrógenos se asignaron a la señal, doble de doble en 3.75 ppm.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto **11a** (espectro 27) se observó la presencia del grupo fenilo del éster en C2' en 7.35 ppm que integró para 5 hidrógenos. Las señales del grupo fenilo en C16 se asignaron en 7.23 (integró para 3 hidrógenos: 2 *meta* y 1 *para*) y 6.82 (integró para 2 hidrógenos *orto*) ppm.

En el espectro de RMN ^1H (espectro 33) del compuesto **11b** se observó la presencia del grupo fenilo del éster en C2' (página 30) en la señal múltiple en 7.26-7.35 ppm que integró para 4 hidrógenos. La señal del grupo fenilo en C16 se asignó en 7.04-7.16 ppm.

En el espectro de RMN ^1H (espectro 39) del compuesto **11c** la señal (doblete) en 7.37-7.30 ppm correspondiente a un hidrógeno y la señal múltiple en 7.26-7.19 ppm que integró para 3 hidrógenos fueron asignadas a los hidrógenos del fenilo del éster en C2'. Las señales del grupo fenilo en C16 se asignaron en 7.13-6.98 (integró para 3 hidrógenos) y en 6.91-6.87 (integró para 2 hidrógenos) ppm.

En cada uno de los espectros de RMN ^{13}C para los compuestos **11a** - **11c** (espectros 28, 29, 34, 35, 40 y 41) se observaron las señales en 16, 18 y 23 ppm que fueron asignados a los carbonos C18, C19 y C21 respectivamente. Las señales en 36, 49 y 85 ppm se asignaron a los carbonos C10, C13 y C17 respectivamente. La señal en 139 ppm fue asignada al C *ipso* del fenilo en C16. Las señales en 124, 129 y 138 ppm se asignaron a los carbonos con hibridación sp^2 el C4, C6 y C7 respectivamente. La señal en 163 ppm se asignó al C5 sp^2 no protonado. Las señales en 170, 199 y 212 ppm fueron asignadas a los 3 carbonilos presentes en los carbonos C1', C3 y C17a respectivamente. Para los compuestos **11a** y **11c** (espectros 28, 29, 40 y 41) la señal en 41 ppm fue asignada al metileno en C2'

(página 29) y para el compuesto **11b** (espectros 34 y 35) ese metileno se asignó en 35.10 ppm.

En RMN ^{13}C (espectros 28 y 29) del compuesto **11a** los carbonos del fenilo en C16 se observaron en las siguientes señales 127.04 (1C), 128.07 (2C) y 128.74 (2C) ppm correspondientes al C-*para*, C-*orto* y C-*meta* respectivamente. Las señales de los carbonos aromáticos del fenilo del éster se observaron en 129.55 (2C), 128.69 (2C) y 127.28 (1C) ppm correspondientes a C5' (C-*meta*), C4' (C-*orto*) y C6' (C-*para*) respectivamente. La señal en 133.48 ppm se asignó al C3' (C *ipso*).

En RMN ^{13}C (espectros 34 y 35) del compuesto **11b**, los carbonos del fenilo en C16 se observaron en las siguientes señales 127.43 (1C), 128.43 (2C) y 129.07 (2C) ppm correspondientes al C-*para*, C-*orto* y C-*meta* respectivamente. La señal en 139.57 ppm se asignó al C *ipso* del fenilo en C16. Las señales de los carbonos aromáticos del fenilo del éster se observaron en 115.67, 124.52, 129.53 y 132.09 ppm correspondientes a C5', C7', C6' y C8' respectivamente. La señal en 121.20 ppm se asignó al C3' (C *ipso*) y la señal en 159.68 ppm se asignó al C4' (C-F).

En RMN ^{13}C (espectros 40 y 41) del compuesto **11c** los carbonos del fenilo en C16 se observaron en las siguientes señales 127.18 (C-*para*), 128.12 (2C-*orto*) y 128.75 (2C-*meta*) ppm. La señal en 139.14 ppm se asignó al C *ipso* del fenilo en C16. Las señales de los carbonos aromáticos del fenilo del éster se observaron en 114.27, 116.62, 125.26 y 130.11 ppm correspondientes a C6', C4', C8' y C7' respectivamente. La señal en 135.75 ppm se asignó al C3' (C *ipso*) y la señal en 162.84 ppm se asignó al C5' (C-F).

Etapa B. Evaluación biológica de la actividad antiandrogénica

Los resultados del ensayo biológico *in vivo* (Tabla 4.1.1 y Gráfica 4.1.1, páginas 34 y 35) muestran que el tratamiento diario, durante seis días, con inyecciones de T (**1**) en los animales gonadectomizados incrementan el peso de la próstata (85.7 ± 8 mg) con respecto a los animales solo inyectados con el vehículo (39.4 ± 10.6 mg) (es decir animales sin

tratamiento). Respecto a los animales tratados con T (1) y finasterida (i, Figura 1.6.2, página 10), que funciona como nuestro estándar, el peso de la próstata disminuyó (52.2 ± 12 mg) como se esperaba.

En relación a los compuestos 11a, 11b y 11c también disminuyeron el peso de la próstata, aunque no por debajo de la disminución provocada por la finasterida (i), de hecho es muy poco significativa la disminución provocada por el tratamiento con estos tres compuestos.

Se puede concluir que solo el compuesto 11c muestra una reducción significativa de 15.8%, sin llegar a ser esta disminución en el peso de la próstata, comparable con la presentada por el estándar finasterida (i) de aproximadamente 40% la disminución en el peso de la próstata (85.7 mg).

El compuesto 11a disminuye el peso solo en 2.9% y el compuesto 11b lo disminuye en 4.2%.

Los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* (Tabla 4.2.1, página 36) para la inhibición de la actividad de la enzima 5α -reductasa, presente en la fracción microsomal de próstata de hámster a pH 7.0, indican que el compuesto 11a no es inhibidor de dicha enzima, ya que presenta un IC_{50} de 3.1×10^{-7} M; mientras que la finasterida (i), que funciona como nuestro estándar, muestra un IC_{50} de 8.5×10^{-9} M.

Por lo contrario los compuestos 11b y 11c resultaron ser potentes inhibidores de la enzima 5α -reductasa tipo II, aún mejor que el estándar finasterida (i); el compuesto 11b resultó 17 veces más potente mientras que el compuesto 11c resultó 108 veces más potente.

Desafortunadamente estos tres compuestos 11a, 11b y 11c no formaron un complejo con el RA y como resultado de lo anterior no mostraron actividad biológica *in vivo*.

Así, los compuestos de interés en cuanto a su actividad biológica resultaron ser los esteroides 11b y 11c. Estos compuestos contienen un fluoruro de arilo en el éster en C17, a diferencia del compuesto 11a que no contiene flúor. Por lo tanto, quizás la presencia del flúor es lo que le confiere a ambas moléculas una mayor estabilidad (resistencia a la hidrólisis u oxidación), lo que se refleja en una mayor actividad biológica.

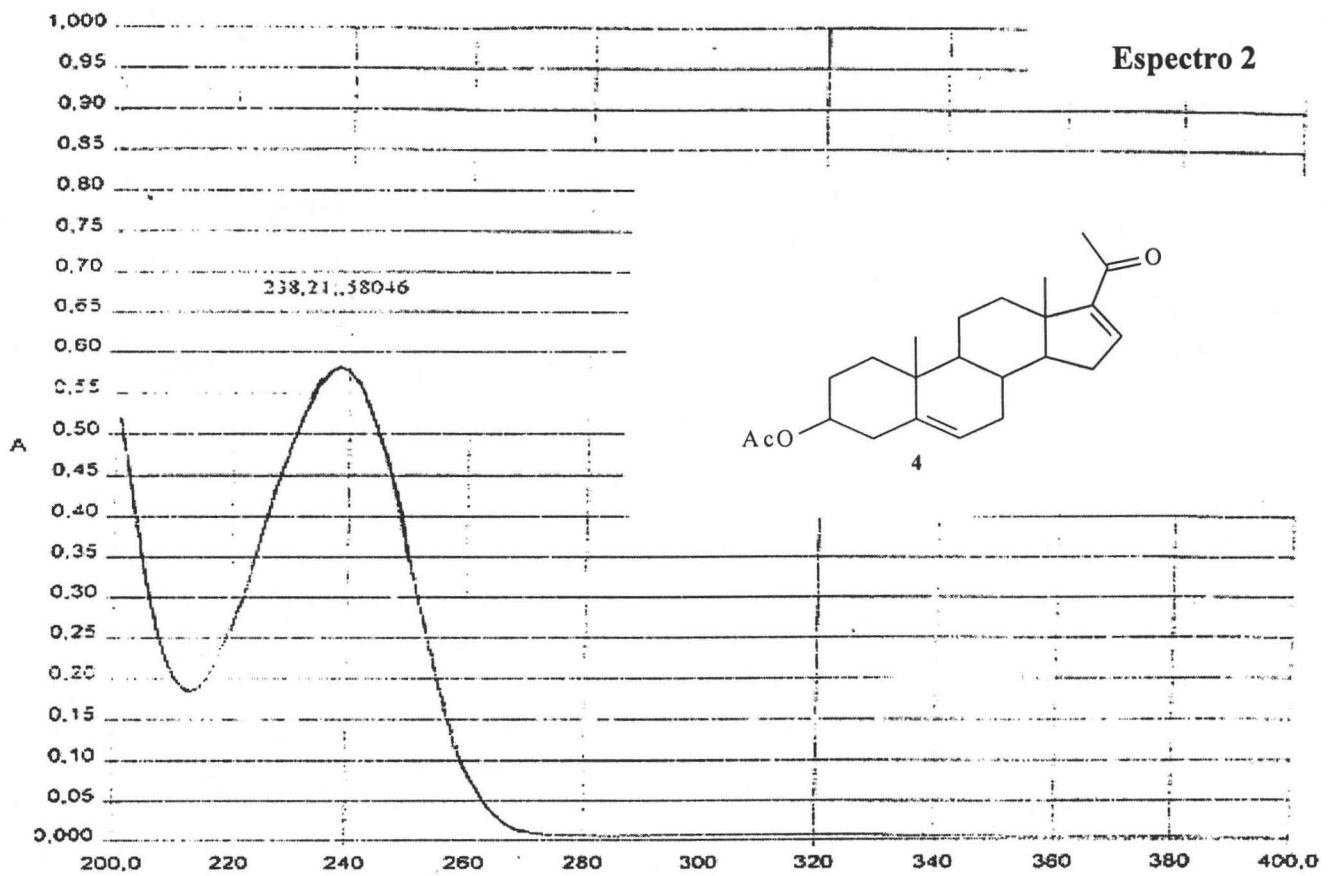
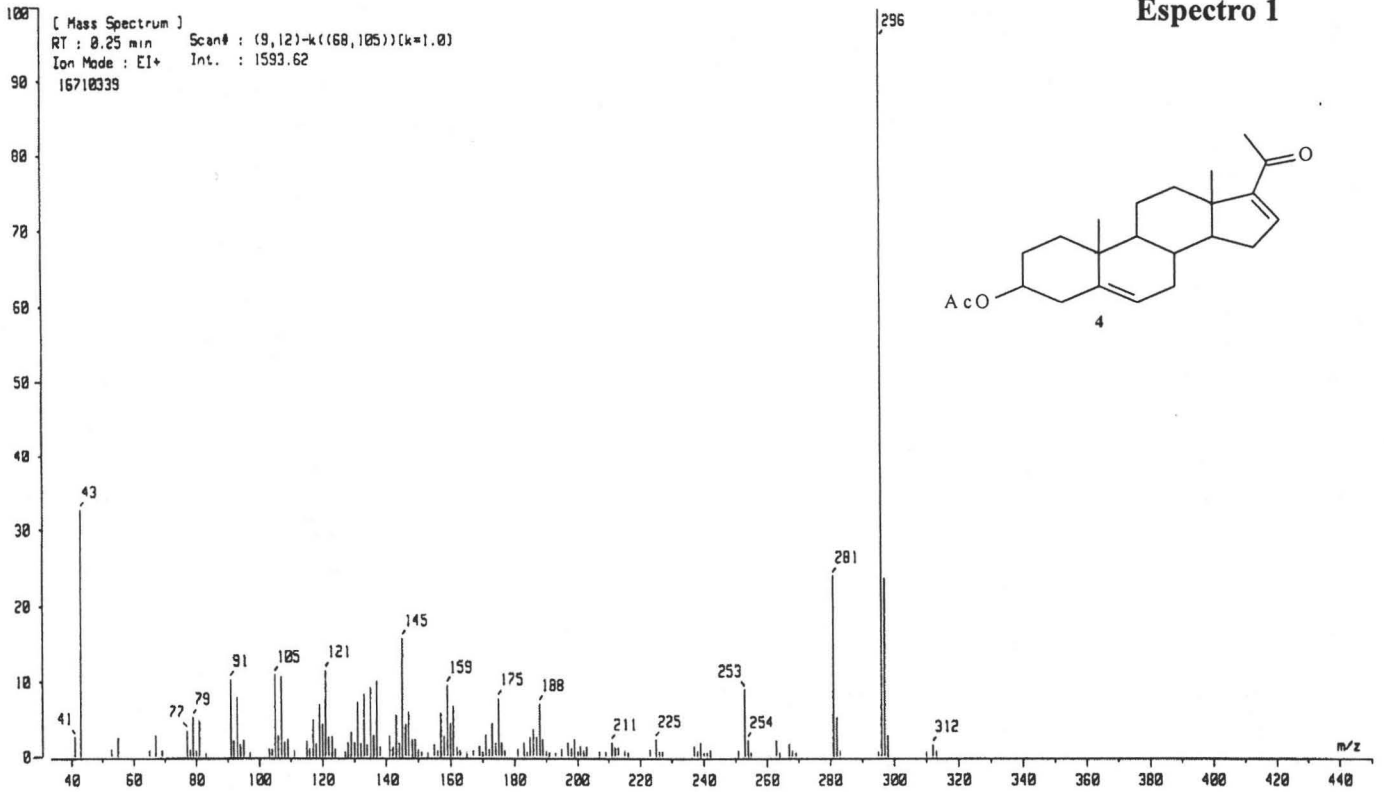
BIBLIOGRAFÍA

1. Herrera-Hidalgo HE, Síntesis y evaluación antiandrogénica de nuevos derivados del D-homo pregnano: 17 α -benzoiloxi-16 β -fenil-6halo-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3, 17 α -diona, Tesis de Maestría de la Facultad de Química UNAM, México (1999).
2. Flores E, Bratoeff E, Cabeza M, Ramírez E, Quiroz A, Heuze I, Steroid 5 α -Reductase Inhibitors, *Mini Reviews in Med. Chem.*, 3, 225-237 (2003).
3. Bratoeff E, Ramírez E, Murillo E, Flores G, Cabeza M, Steroidal antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors, *Curr. Med. Chem.*, 6, 1107-1123 (1999).
4. Ramírez-López E, Síntesis de 17 α -aciloiloxi derivados del pregnano con un sustituyente en C-16 β como antiandrógenos, Tesis de Doctorado de la Facultad de Química UNAM, México (2002).
5. Fernández-Tresguerres JA, Bellida C, Fisiología Humana, Ed. McGraw Hill-Interamericana de España, España, Capítulo 84, 1073-1086 (1992).
6. Pasqualini JR, Katzenellenboyen BS, Hormone-Dependent Cancer, Ed. Marcel Dekker Inc., Estados Unidos de América, Capítulo 12-20, 267-447 (1996).
7. Litter M, Farmacología experimental y clínica, Ed. El Ateneo, 6^a Edición, Argentina, Capítulo 38, 1218-1235.
8. <http://www.inegi.gob.mx/prod.serv/contenidos/espanol/biblioteca>
9. Estadísticas del sector salud y seguridad social, Edición 2003, INEGI.
10. Giménez AM, 5-alfa-reductasa, *Act. Dermatolog.*, 10, 655-666 (1997).
11. Bratoeff E, Trejo A, Hernández J, Sánchez P, E, Síntesis de derivados del pregnano con un grupo metilo en posición-16, *Rev. Mex. Cien. Farm.*, 28, 14-18 (1997).
12. http://www.tuotromedico.com/temas/cancer_de_próstata.htm
13. Wilkin R, Bruchovsky N, Shnitka T, Rennie P, Comeau T, Stromal 5 α -reductase activity is elevated in benign prostatic hyperplasia, *Acta Endocrinologica*, 94, 284-288 (1980).
14. Kucuk O, Chemoprevention of prostate cancer, *Cancer and Metastasis Reviews*, 21, 111-124 (2002).

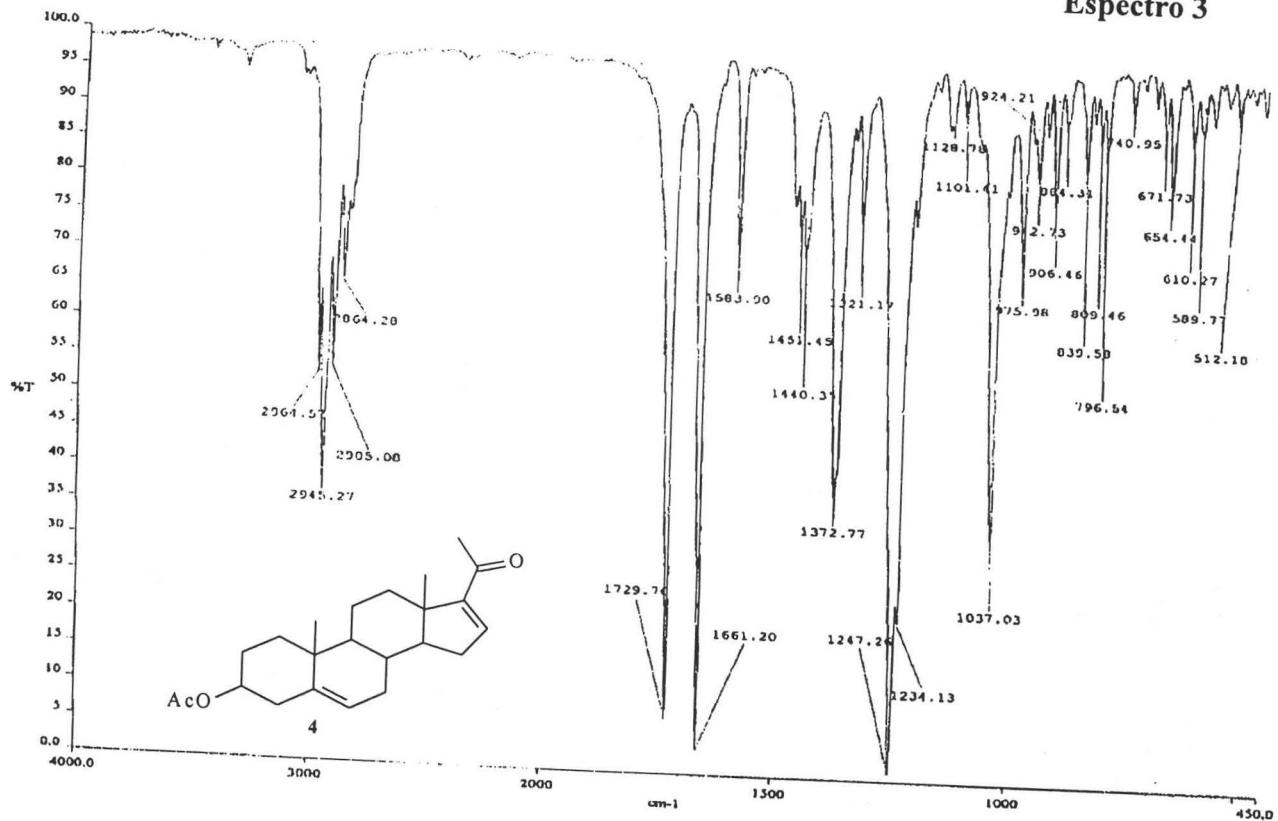
15. Ansari M, Gupta N, Hemal A, Chemoprevention of carcinoma prostate: A review, *Int. Urology and Nephrology*, 34, 207-214 (2002).
16. Ross R, Bernstein L, 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and us white and black males, *Lancet*, 339, 887-889 (1992).
17. Tammela T, Endocrine treatment of prostate cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 92, 287-295 (2004).
18. Cabeza M, Gutiérrez E, Miranda R, Bratoeff E, Ramírez E, Flores G, Synthesis pharmacological effect of 6-halo-16-beta methylpregnane derivatives, *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 41, 87-88 (1998).
19. Cabeza M, Gutiérrez E, Miranda R, Heuze I, Bratoeff E, Flores G, Ramírez E, Androgenic and antiandrogenic effect of progesterone derivatives with different halogen at C-6 position, *Steroids*, 64, 413-421 (1999).
20. Cabeza M, Quiroz A, Heuze I, Bratoeff E, Herrera H, Ramírez E, Murillo E, Antiandrogenic effect of new synthetic steroids, *Proc West. Pharmacol. Soc.*, 43, 1-2 (2000).
21. Soriano M, Hernández S, Bratoeff E, Valencia N, Ramírez E, Flores G, 17 α -Acetoxy-17 β -methyl-16 β -phenyl-D-homo-4,6-pregnadiene-3,17a-dione: Synthesis and crystal structure determination of a new rearranged pregnane derivative. *J. Chem. Cryst.*, 28, 487-491 (1998).
22. Bratoeff E, Herrera H, Ramírez E, Solórzano K, Mirillo E, Quiróz A, Cabeza M, Antiandrogenic effect of 16-substituted, non substituted and D-homopregnane derivatives, *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 1249-1255 (2000).
23. Gareth T, Medicinal Chemistry an Introduction, Ed. John Wiley, Great Britain, Capítulo 2 y 9, 45-59, 342-350, (2000).
24. Marker R, Tsukamoto T, Turner L, Sterols C. Diosgenin, *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 2525 – 2530 (1940).
25. Ramírez E, Cabeza M, Heuze I, Gutiérrez E, Bratoeff E, Membrillo M, Lira A, Synthesis and pharmacological evaluation of new 16-methyl pregnane derivatives, *Chem. Pharm. Bull.*, 50, 15-20 (2002).
26. Orozco A, Derivados de la progesterona como antiandrógenos, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, (2003).
27. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A13 y A25, Editorial VCH, Fed. Rep. Of Germany (1989).

ANEXO

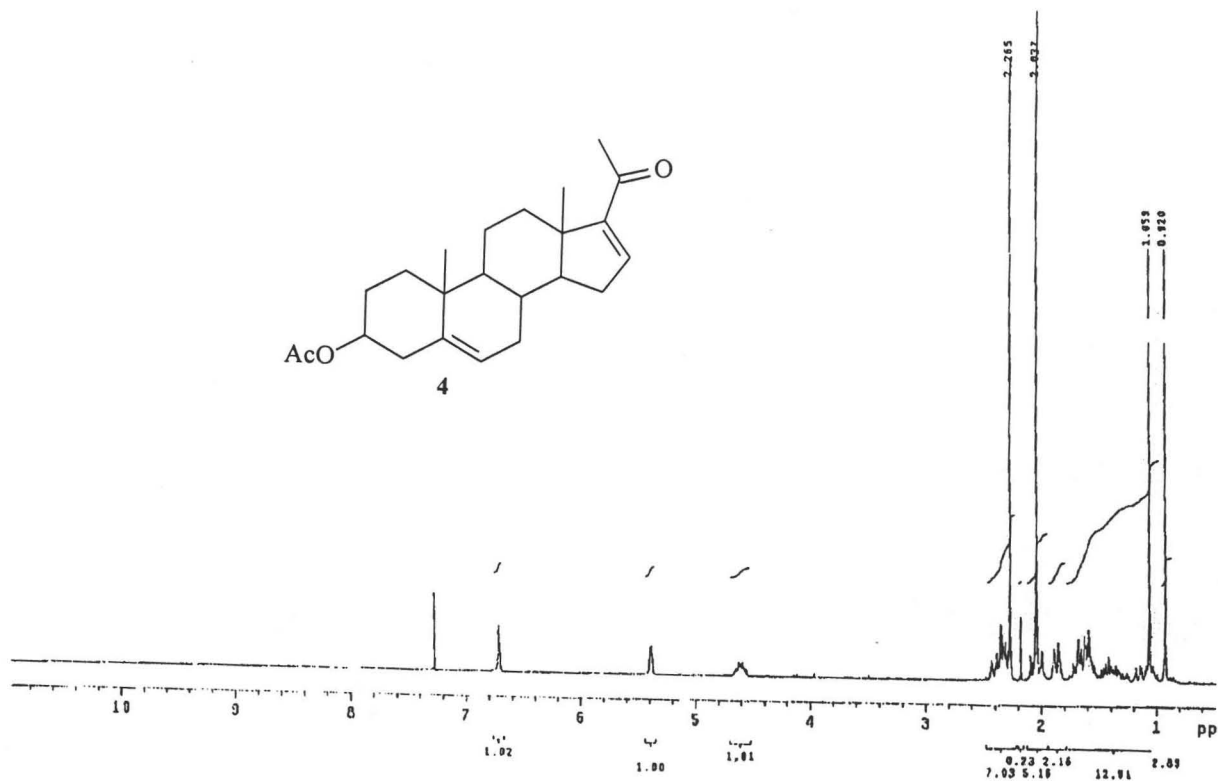
Acetato de 16-dehidropregnenolona



Espectro 3

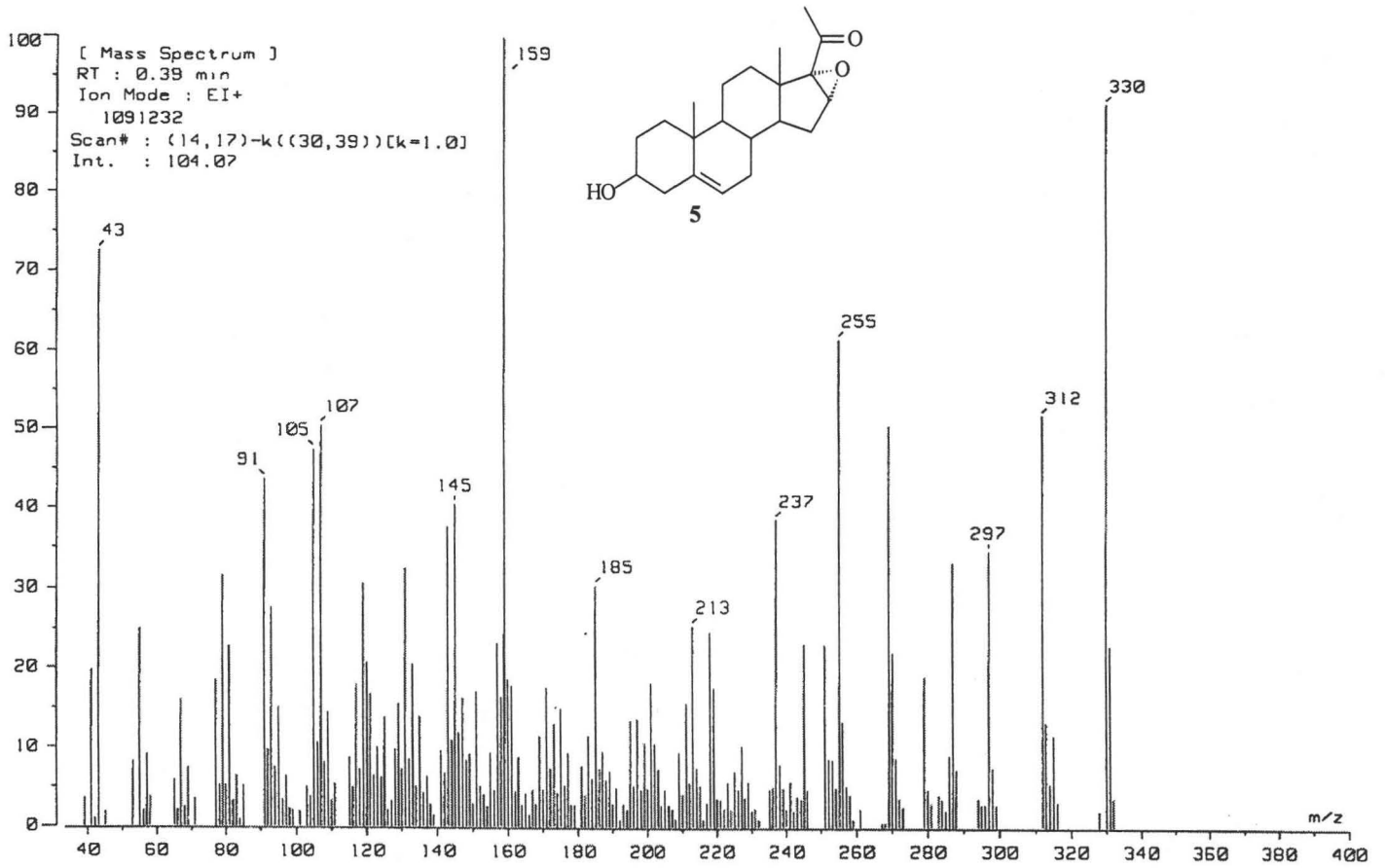


Espectro 4

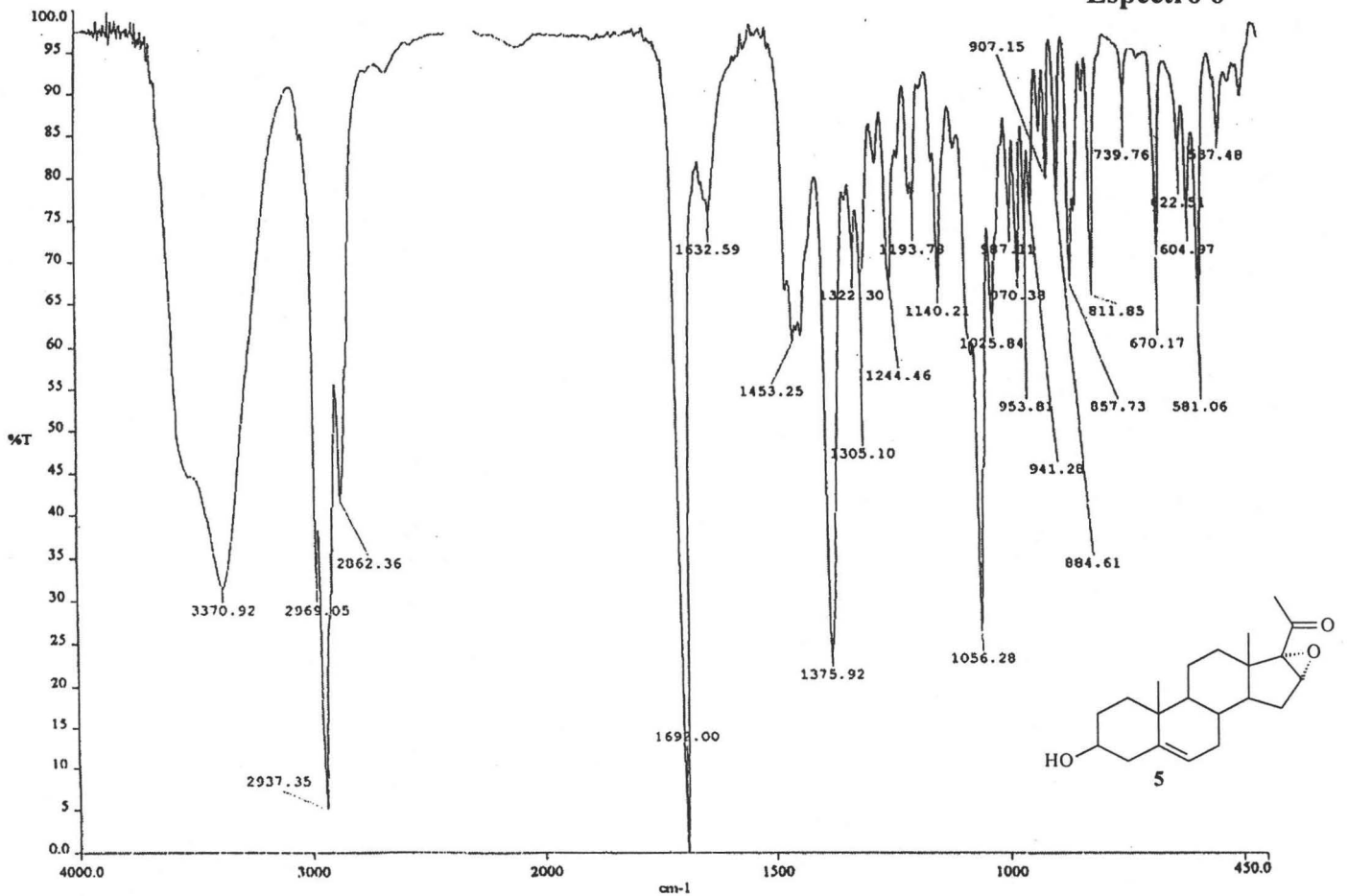


16 α , 17 α -epoxi-3 β -hidroxipreg-5-en-20-ona

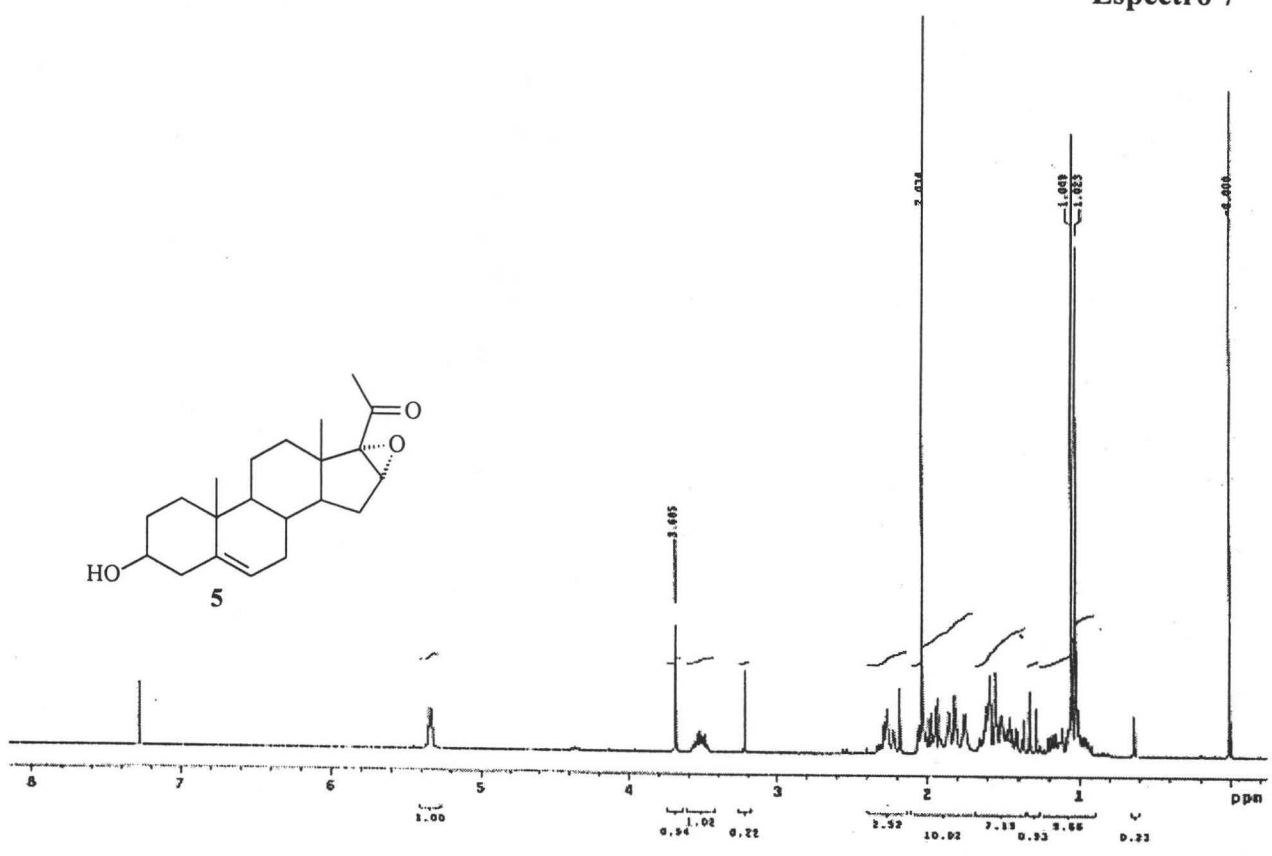
Espectro 5



Espectro 6

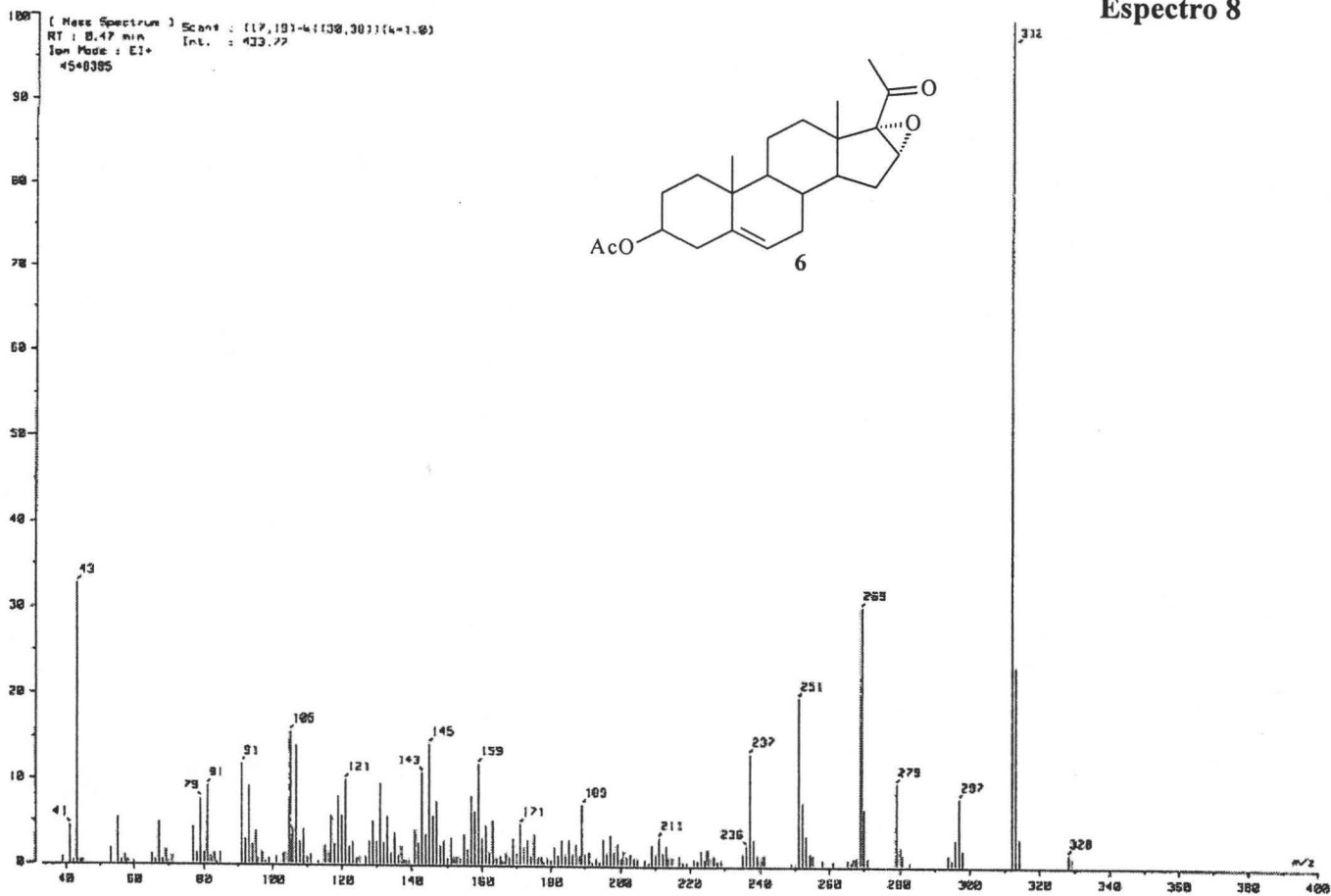


Espectro 7

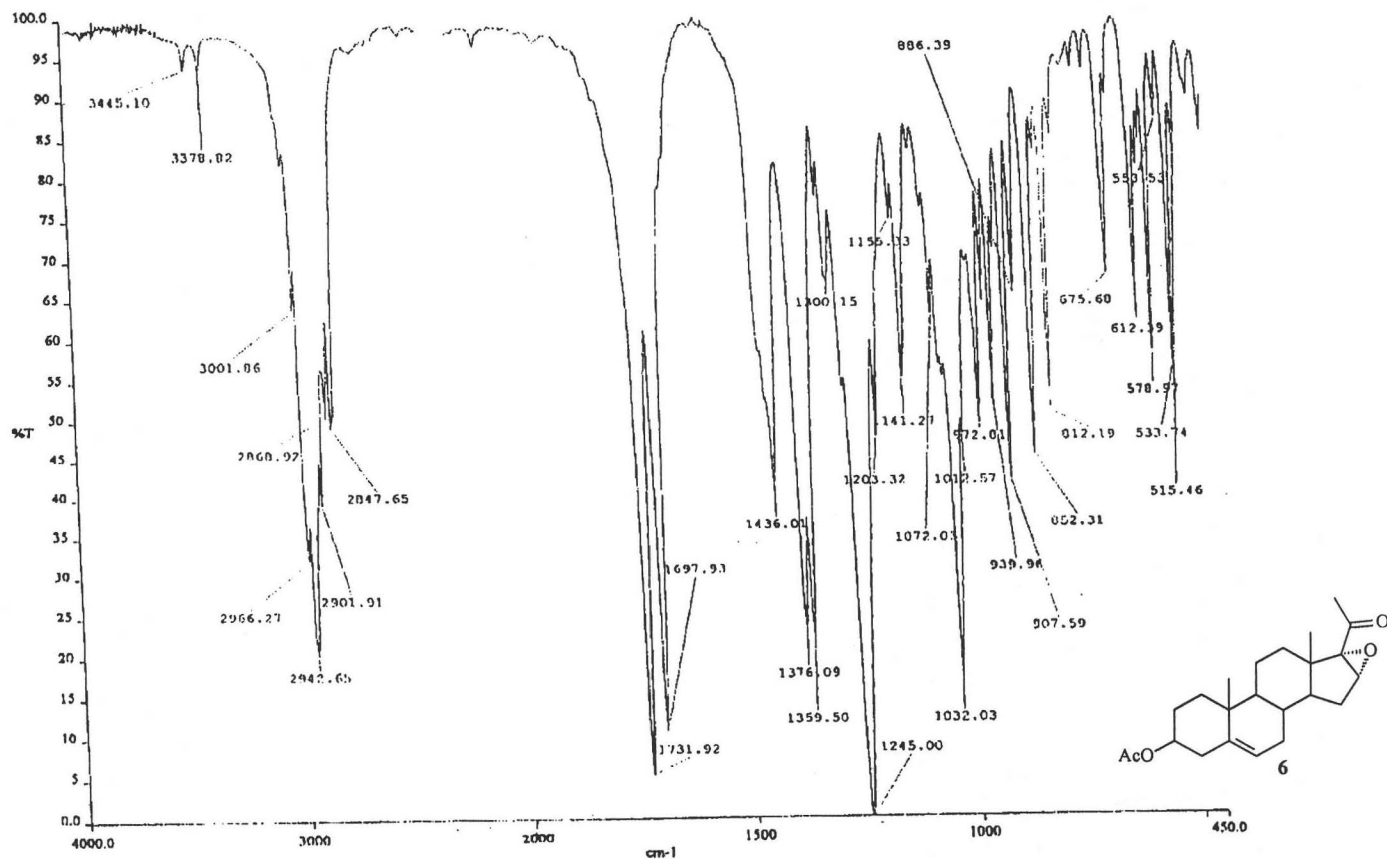


3β-acetoxi-16α,17α-epoxipregn-5-en-20-ona

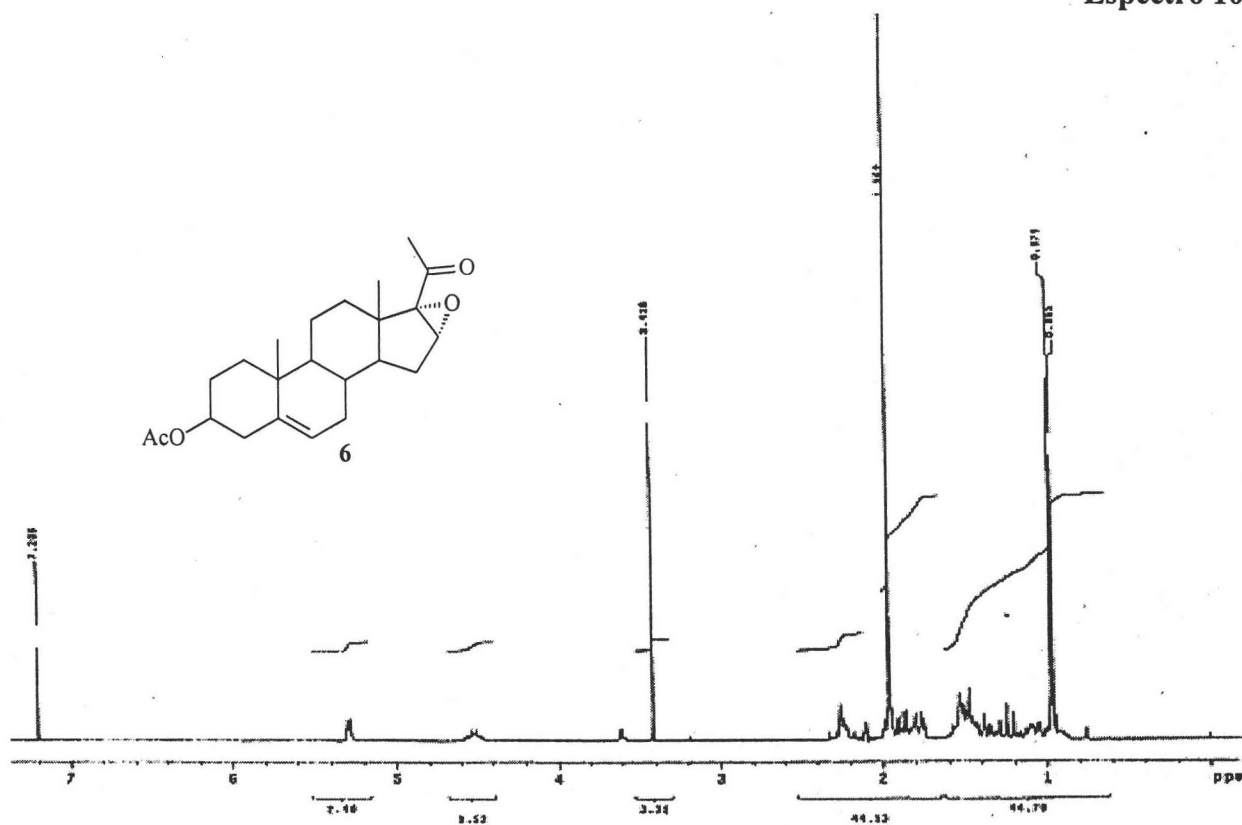
Espectro 8



Espectro 9

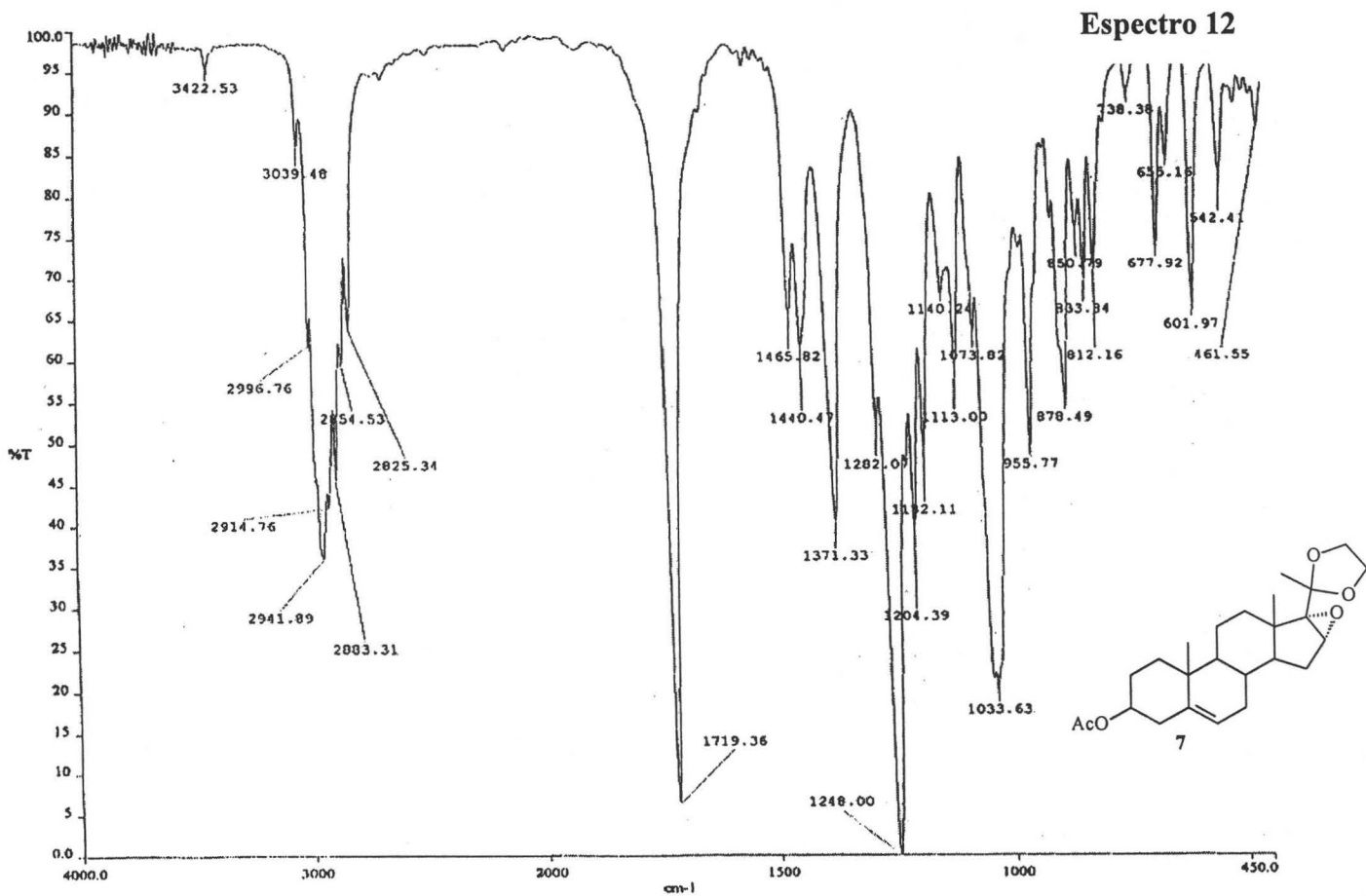
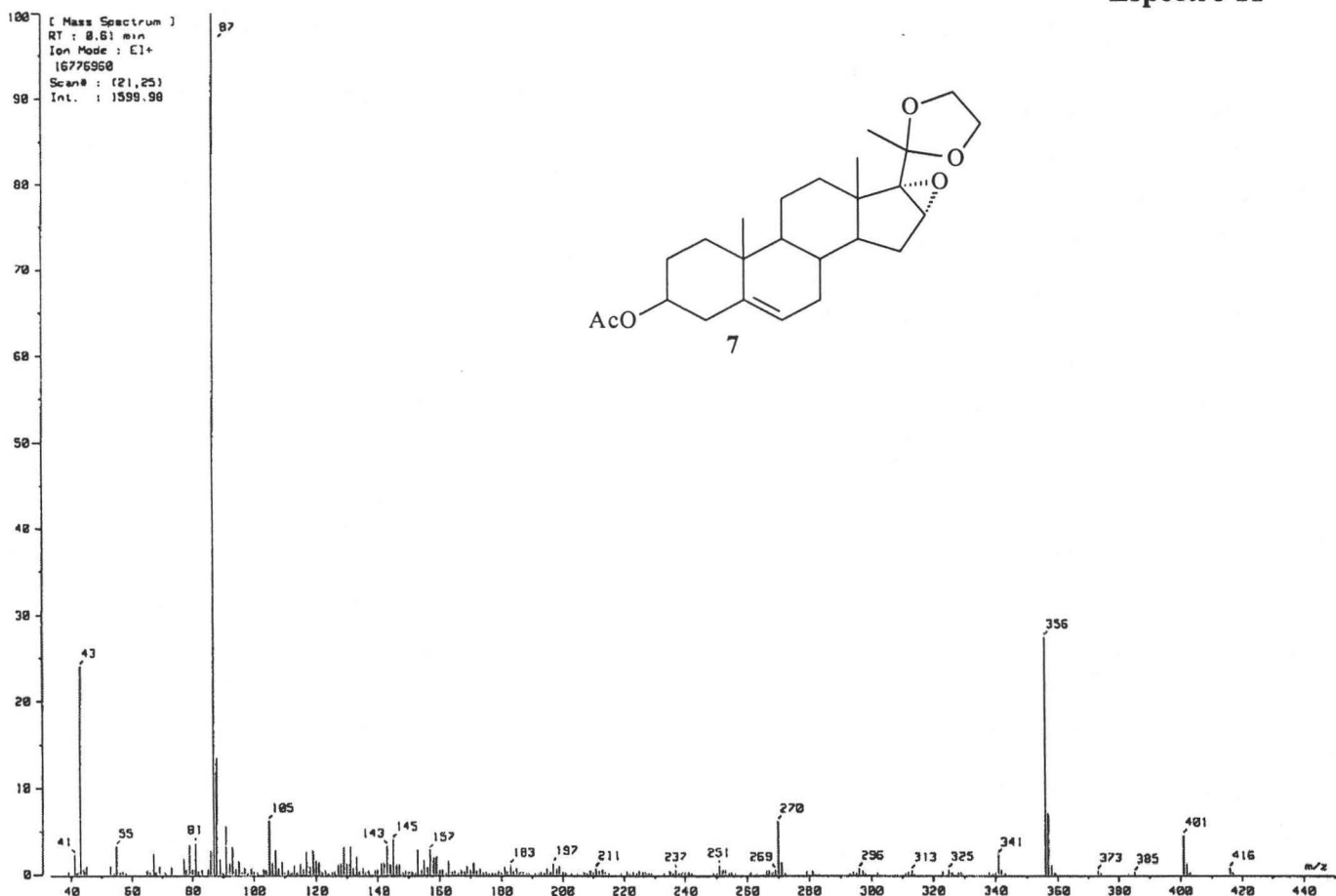


Espectro 10

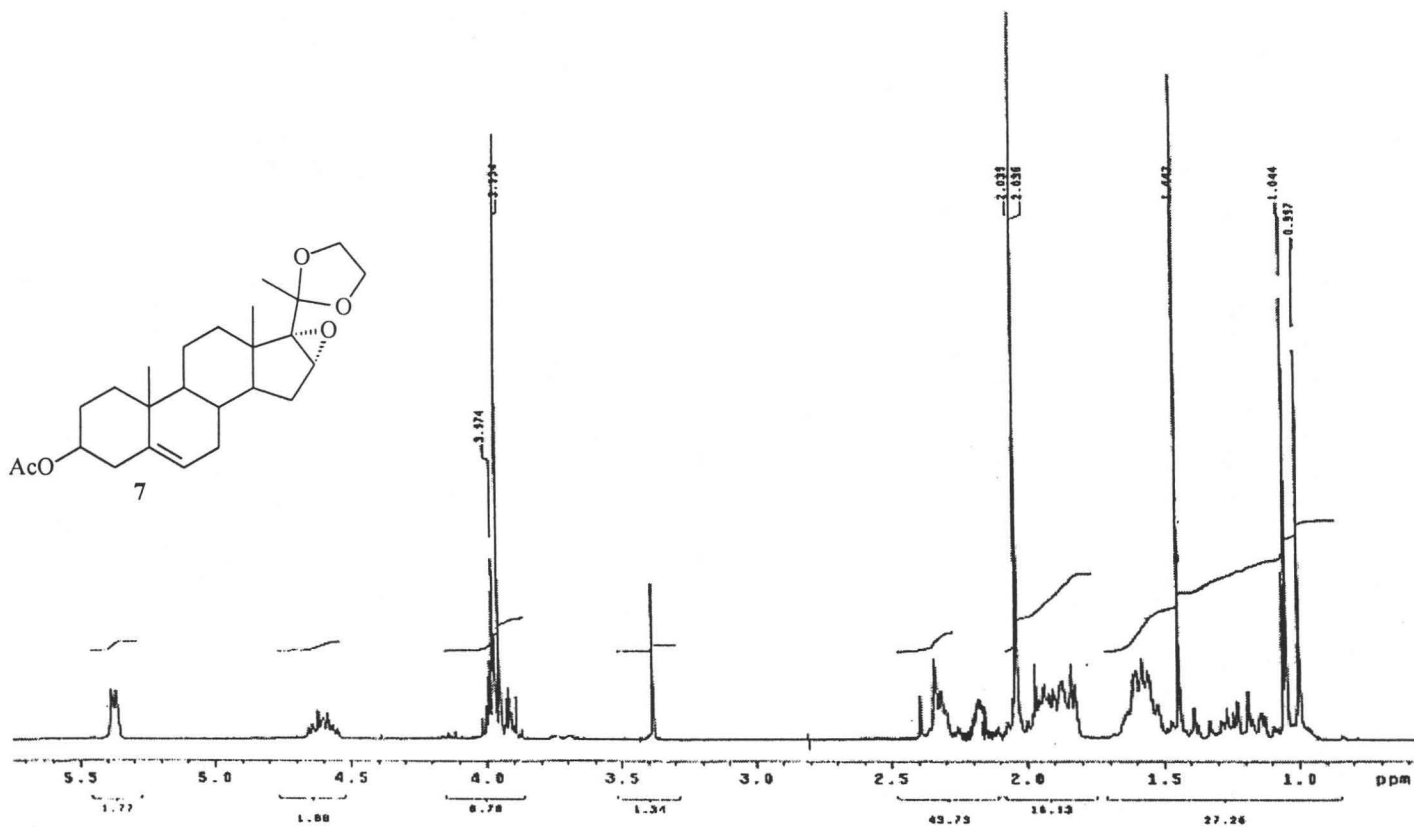


3 β -acetoxi-16 α , 17 α -epoxi-20-etilendioxipregn-5-eno

Espectro 11

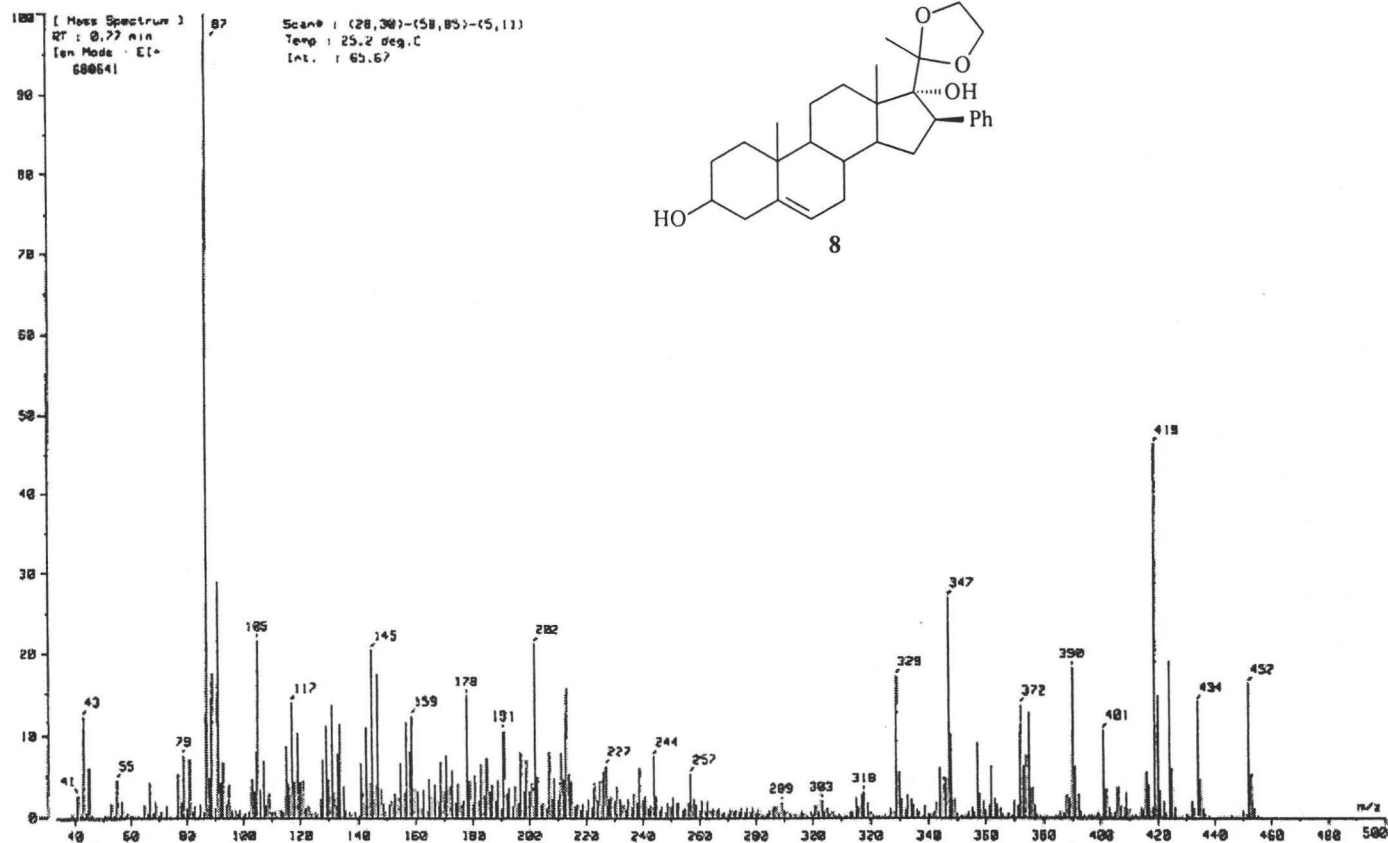


Espectro 13

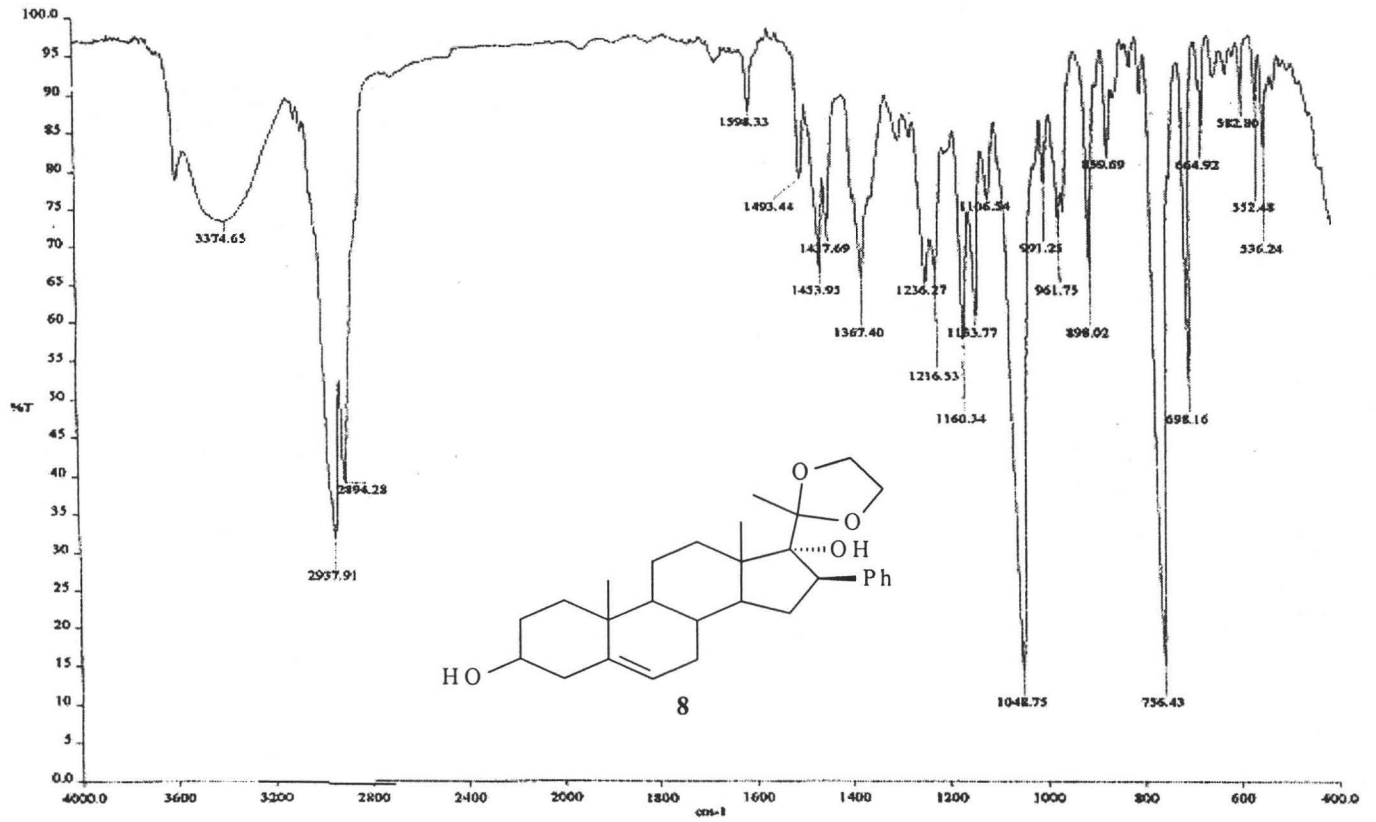


3β, 17α-dihidroxi-20-etilendioxi-16β-fenilpregn-5-eno

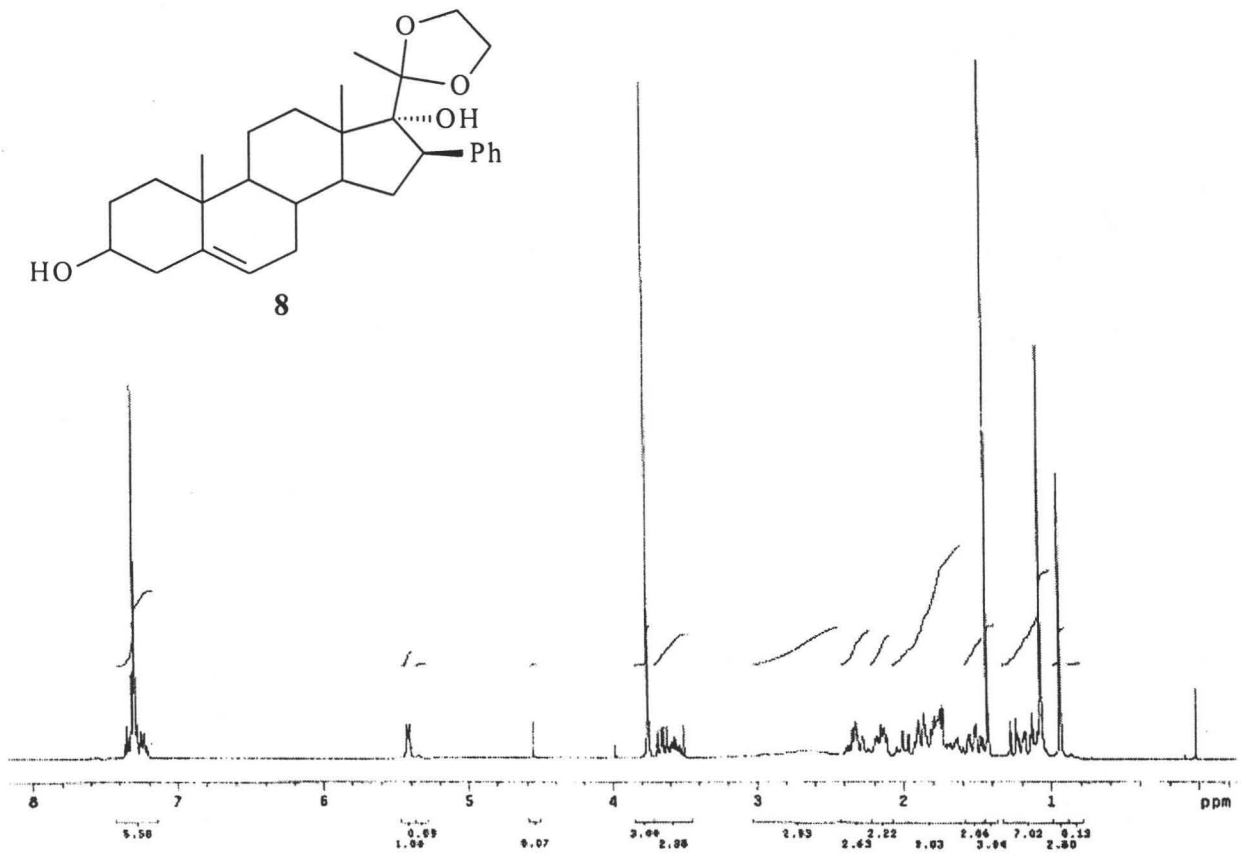
Espectro 14



Espectro 15

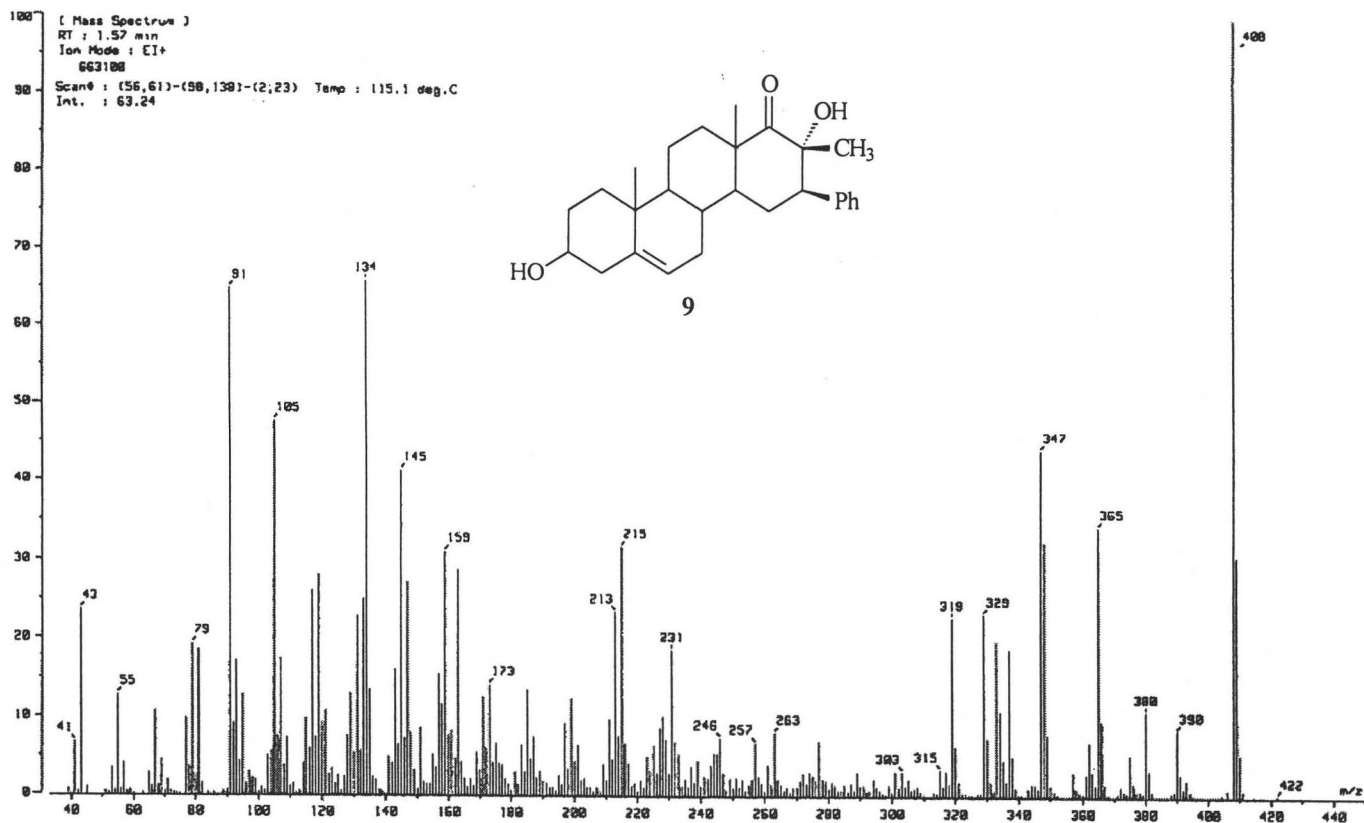


Espectro 16

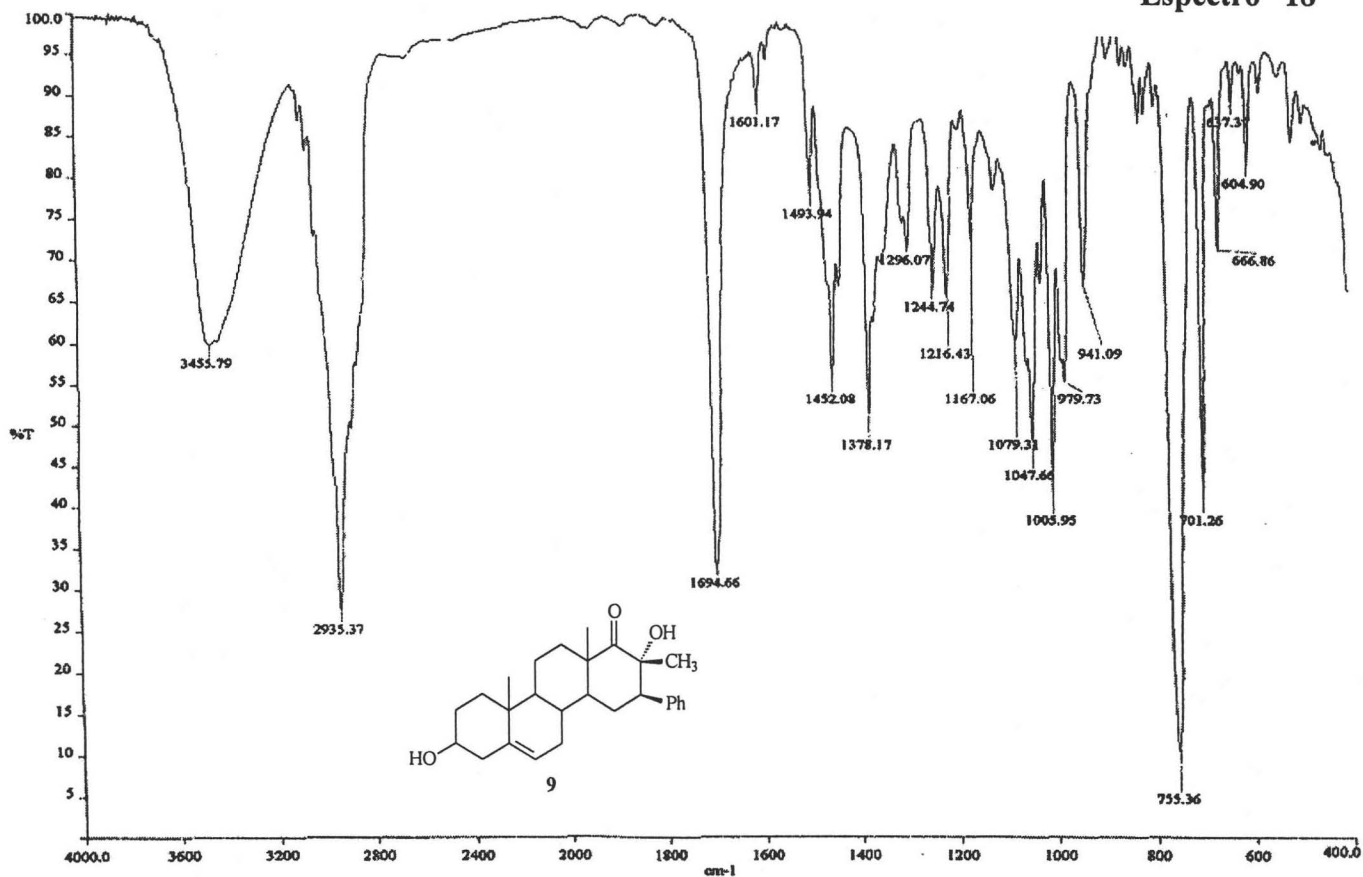


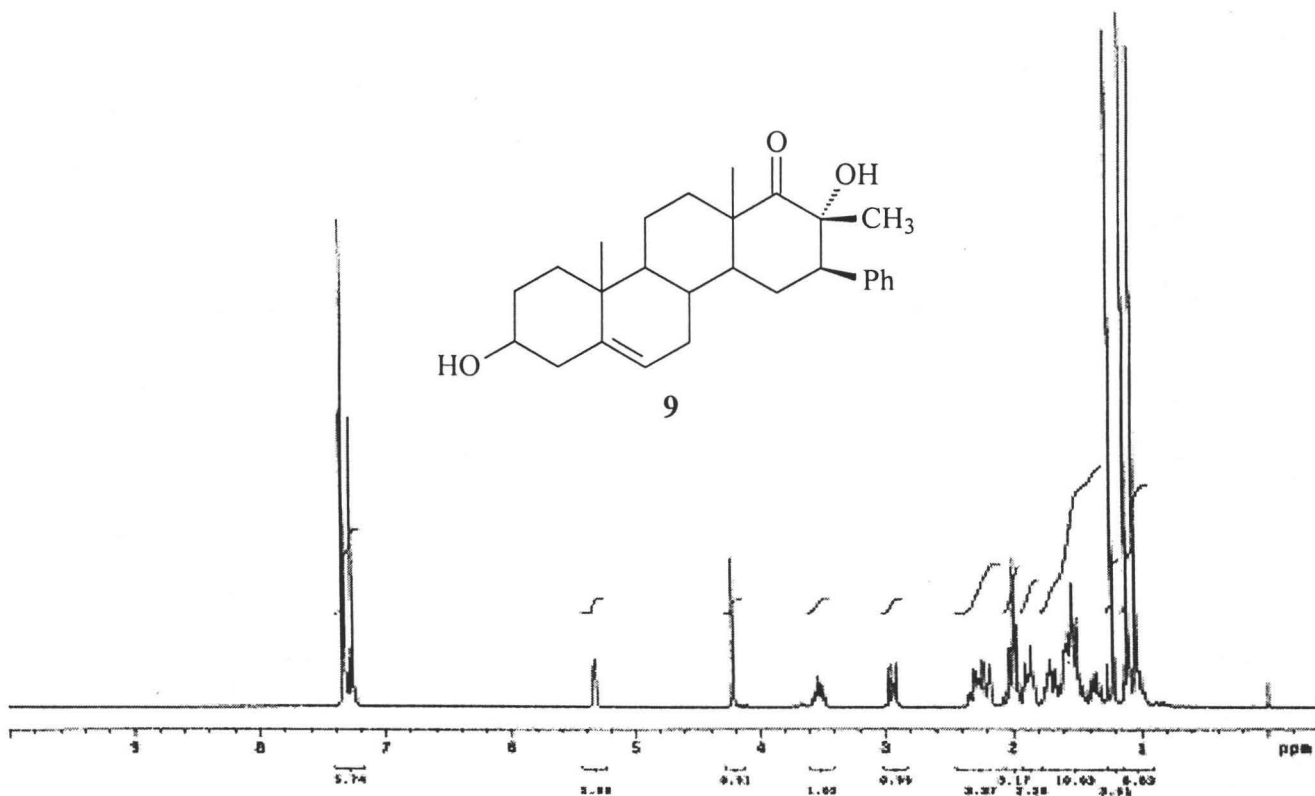
3 β , 17 α -dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homopregn-5-en-17a-ona

Espectro 17

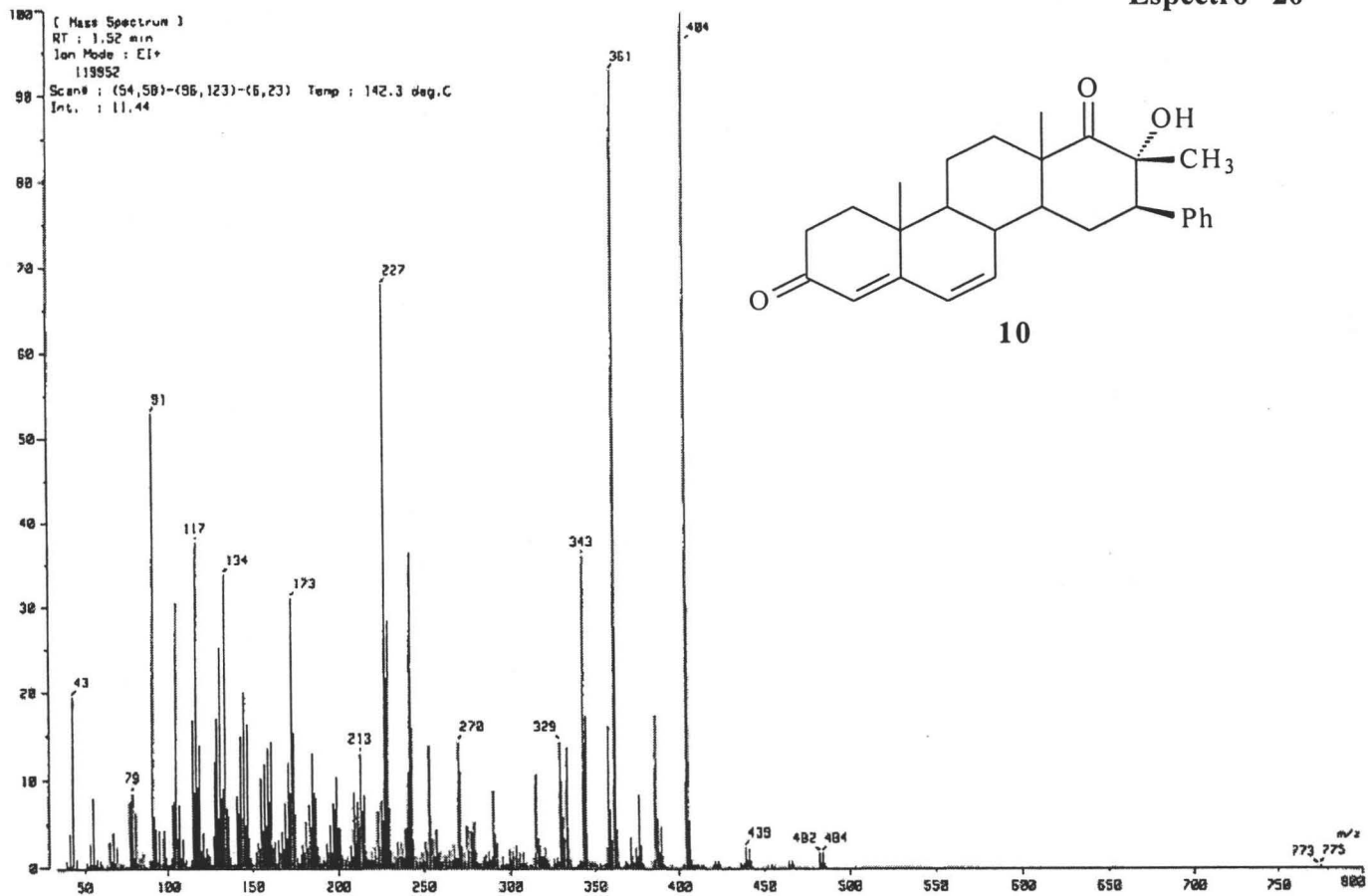


Espectro 18

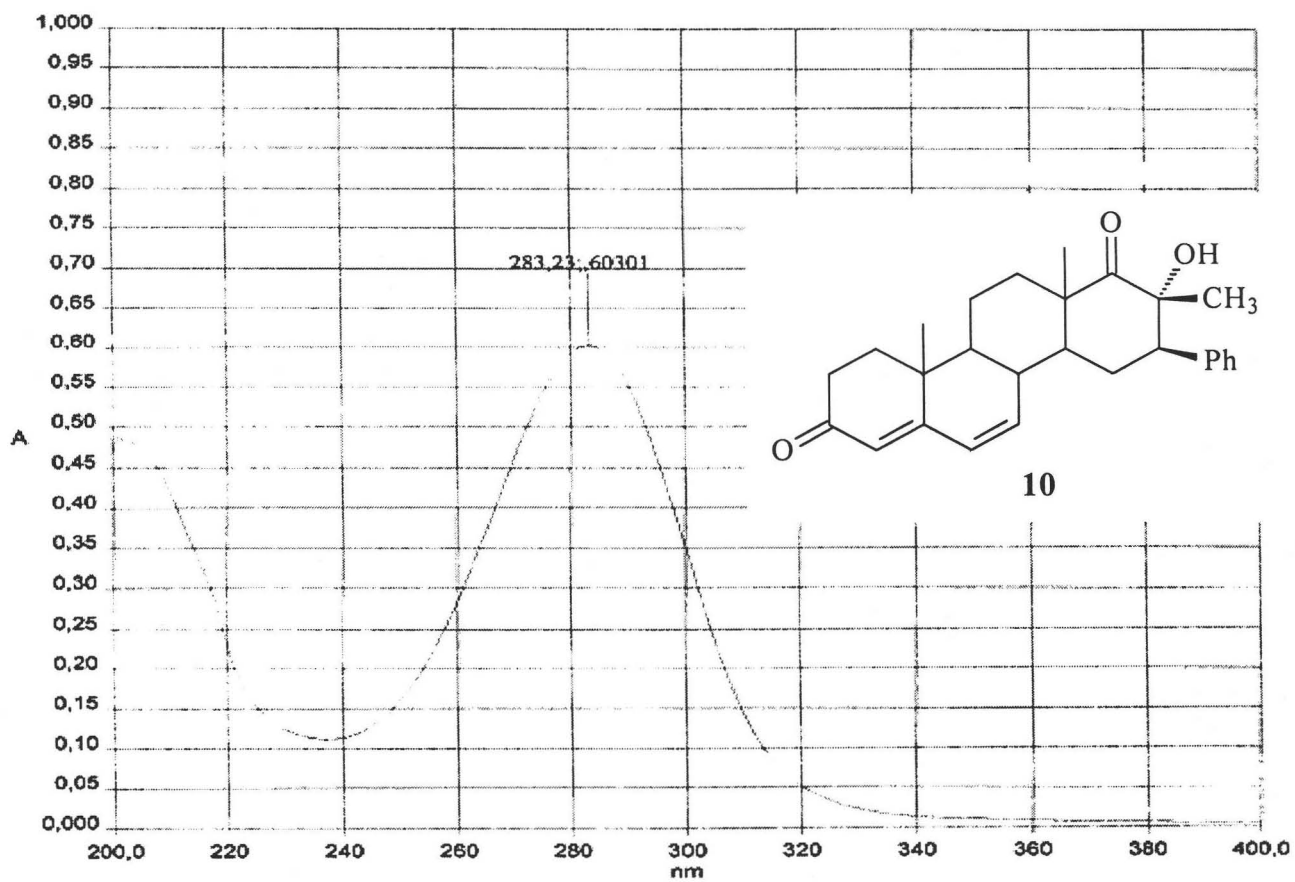




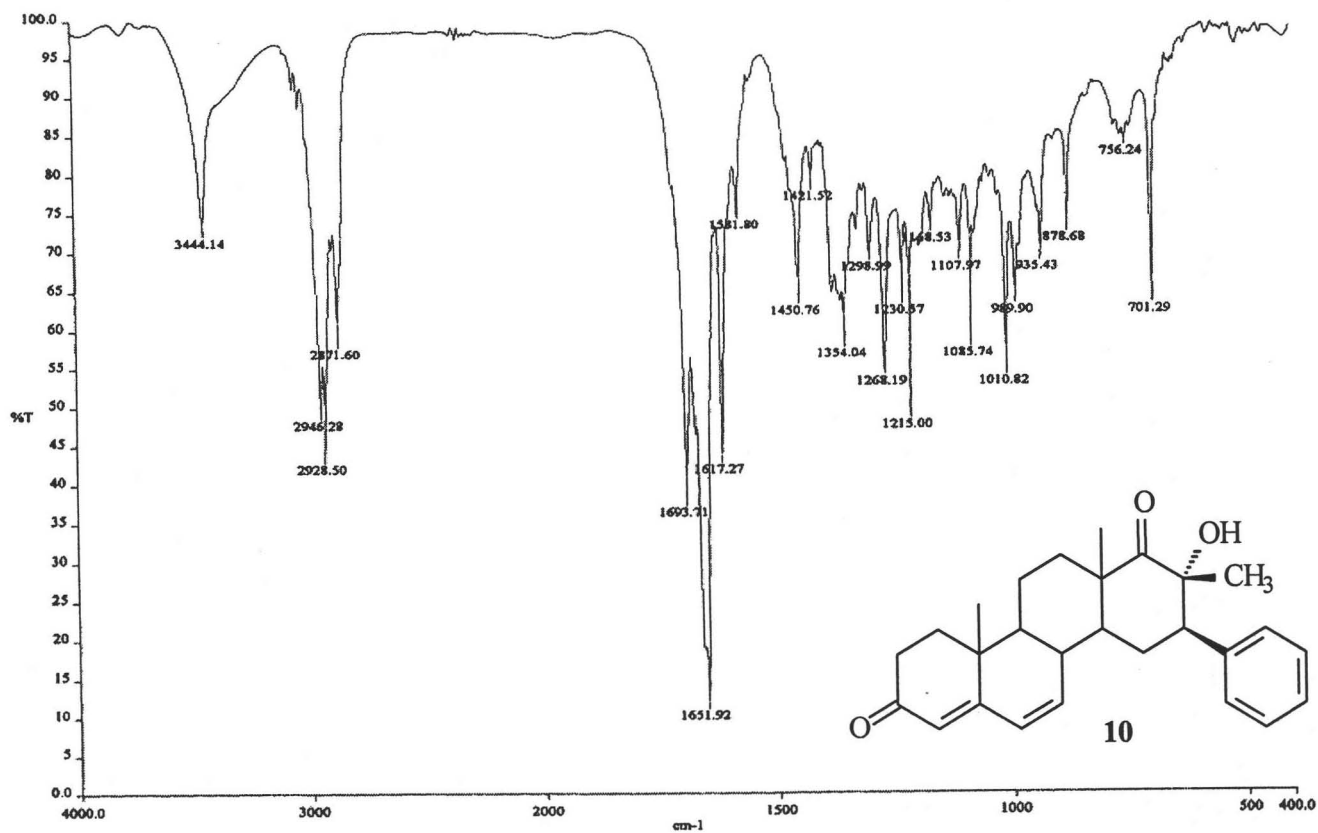
3β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homopregna-4,6-dien-3-17a-diona

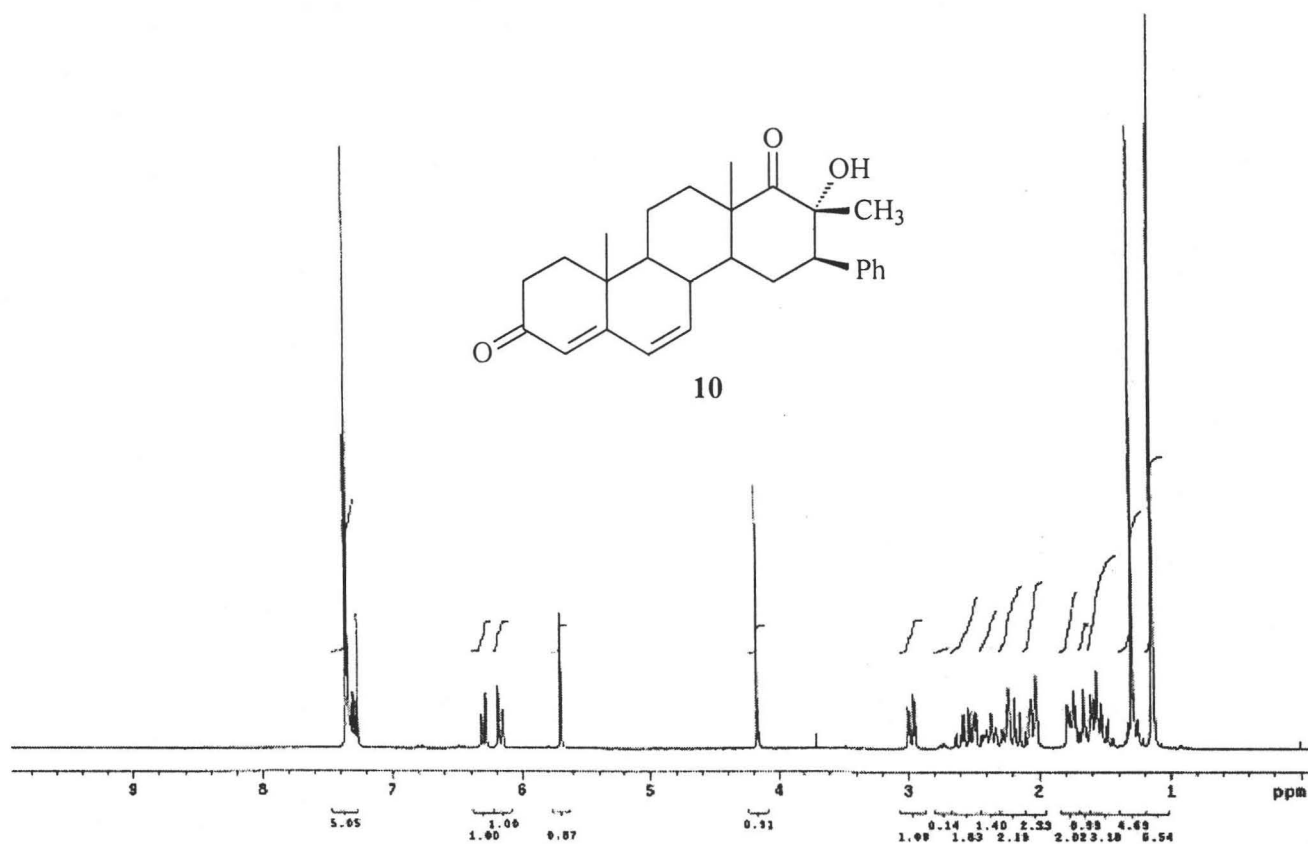


Espectro 21



Espectro 22





16β-fenil-17α-fenilacetoxi-17β-metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona

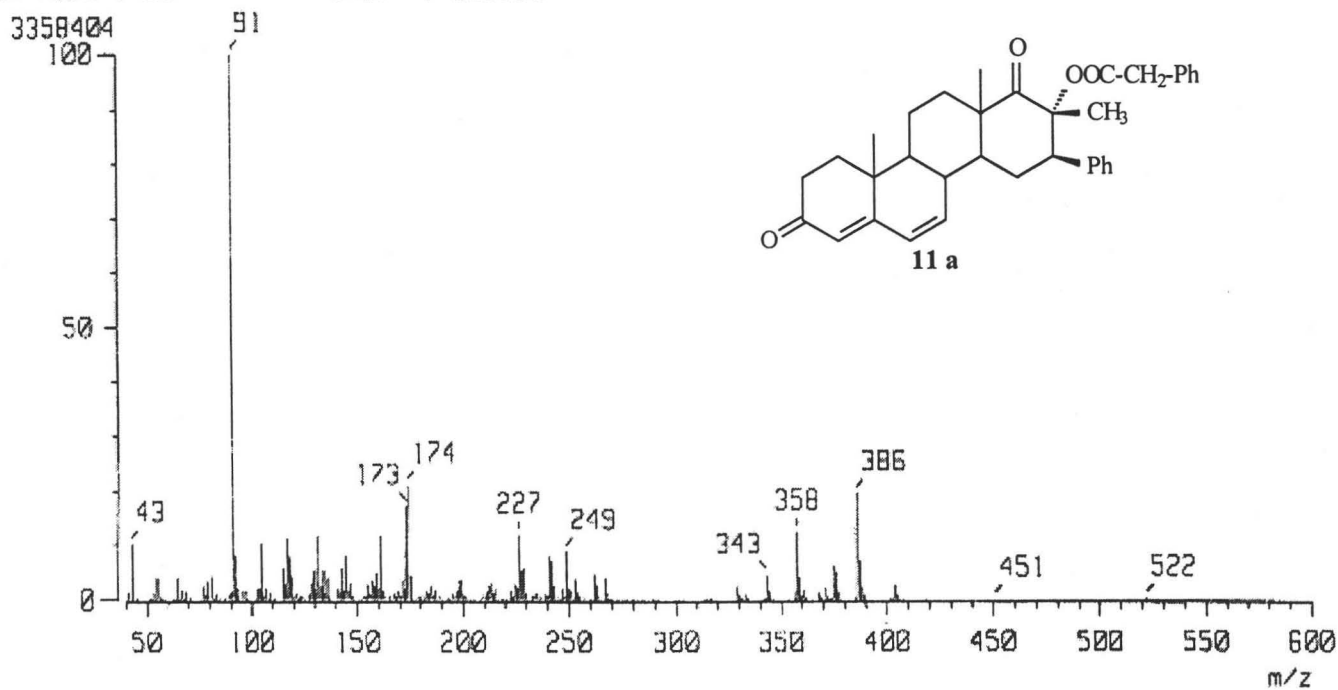
[Mass Spectrum]

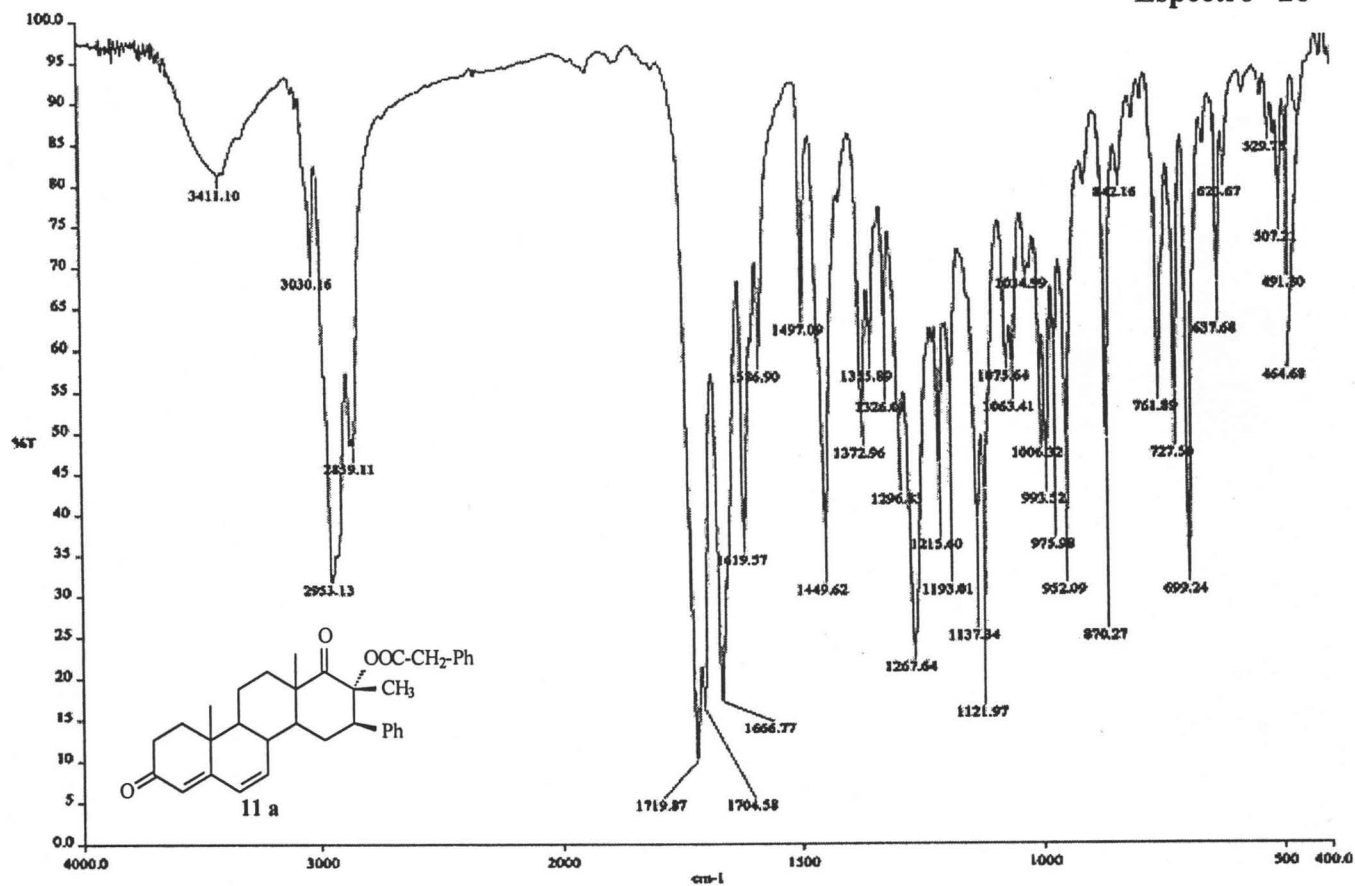
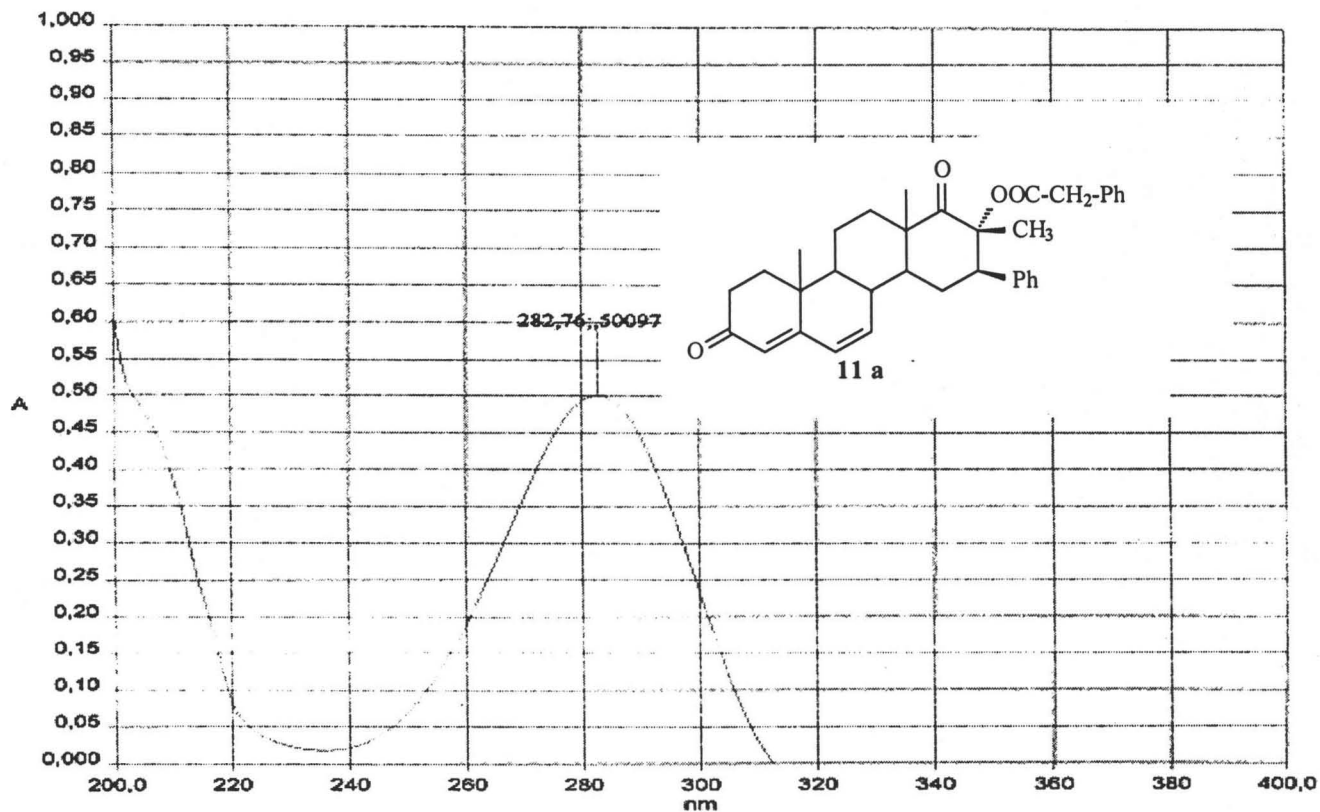
RT : 1.67 min

Scan# : (41,45)-k((108,122))(k=1,0)

Ion Mode : EI+

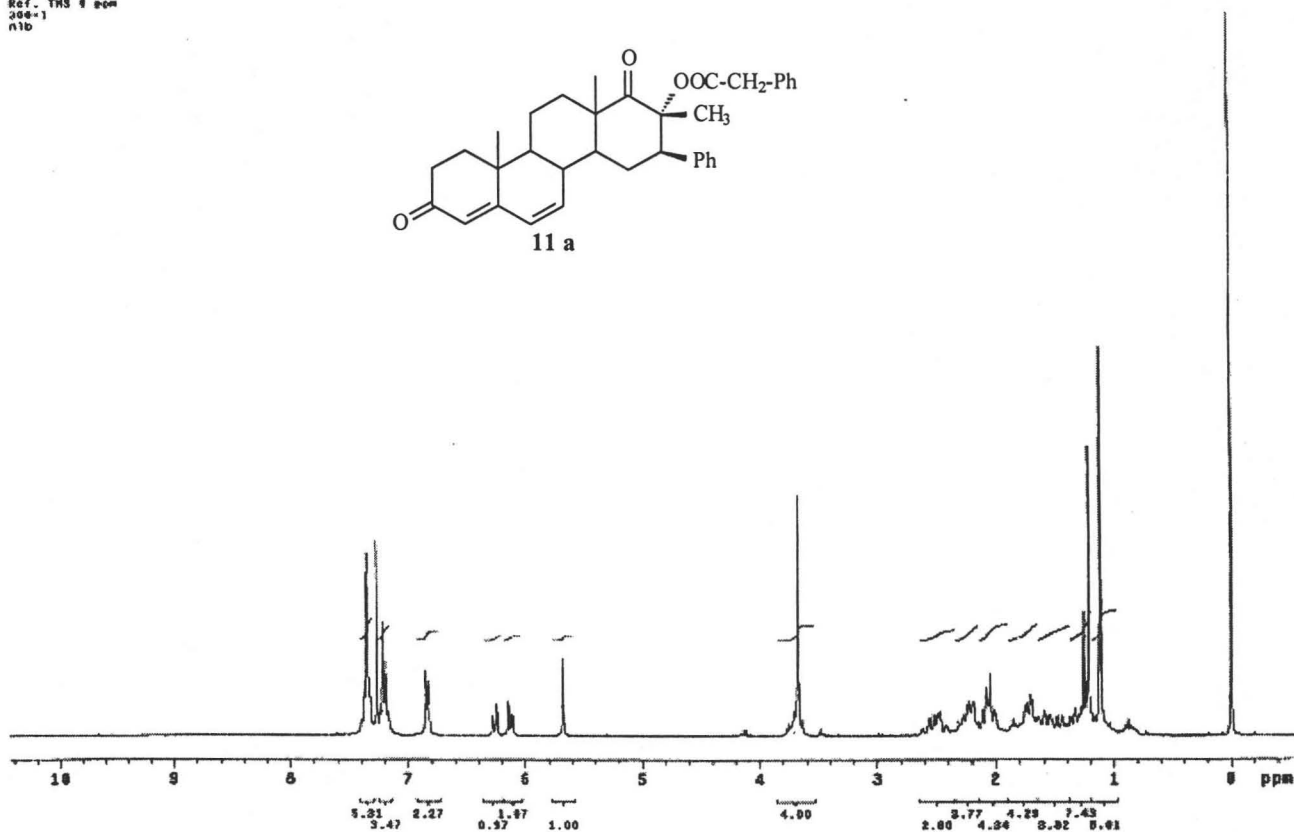
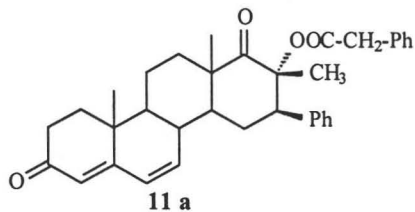
Int. : 320.28





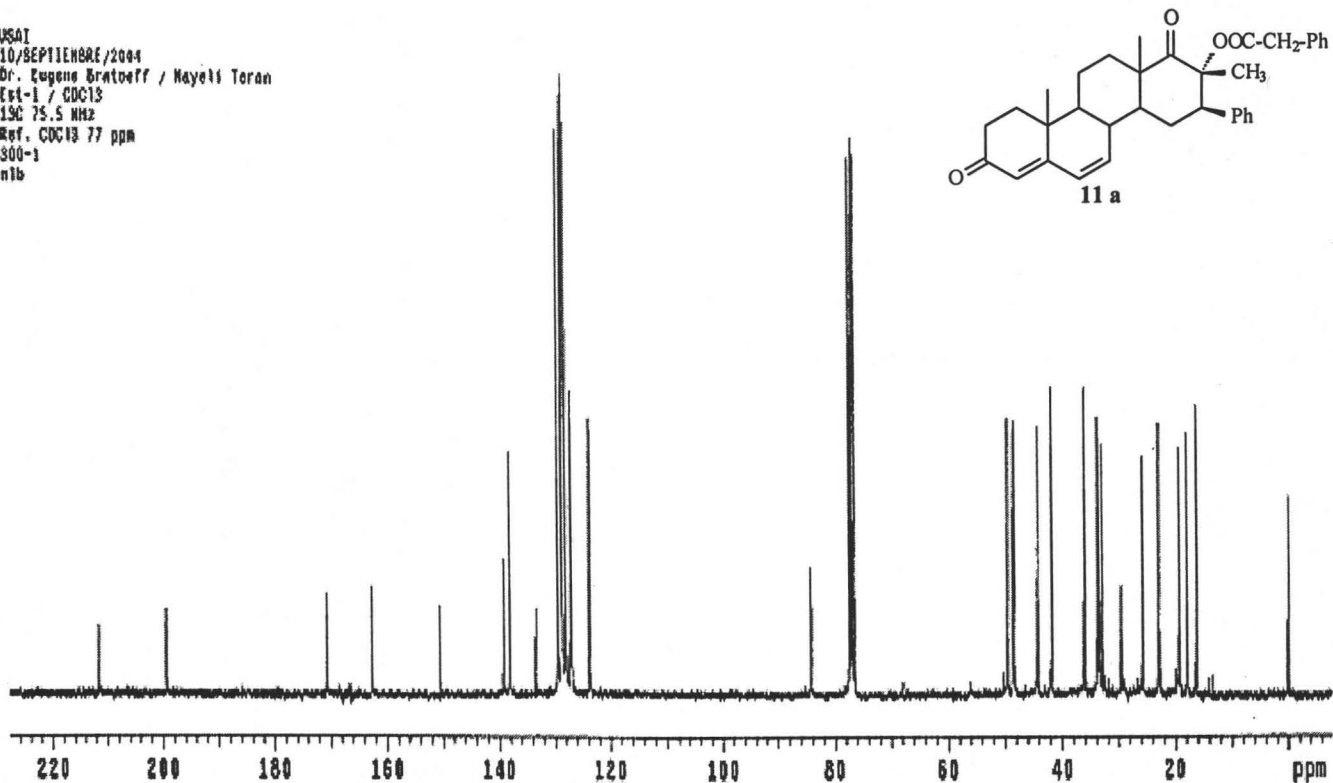
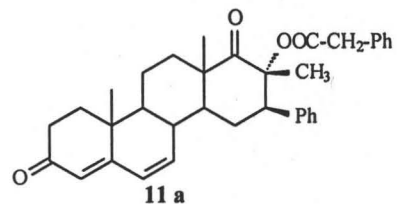
USA1
10/SEPTIEMBRE/2004
Dr. Eugenio Bratoeff / Mayeli Toran
Est-1 / CDCl3
1H 300.2 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-1
nib

Espectro 27

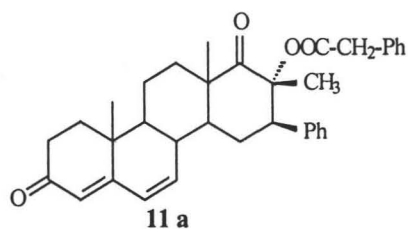


Espectro 28

USA1
10/SEPTIEMBRE/2004
Dr. Eugenio Bratoeff / Mayeli Toran
Est-1 / CDCl3
13C 75.5 MHz
Ref. CDCl3 77 ppm
300-1
nib



USAI
19/SEPTIEMBRE/2008
Dr. Eugenio Briceño / Mycell Teran
Est-1 / CDG13
13C 75.3 MHz
Ref. CDG13 77 ppm
398-1
n1b



CH3 carbons

CH2 carbons

CH carbons

all protonated carbons

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

16β-fenil-17α-(2-fluorofenilacetoxi-17β-metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona

[Mass Spectrum]

RT : 1.47 min

Scan# : (36,40)-k((99,109))[k=1.0¹

Ion Mode : EI+

Int. : 203.88

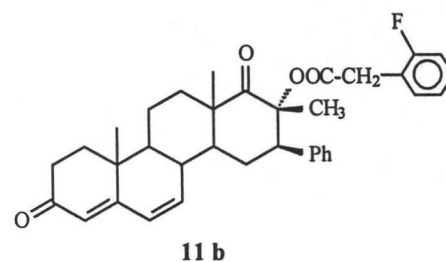
2137855

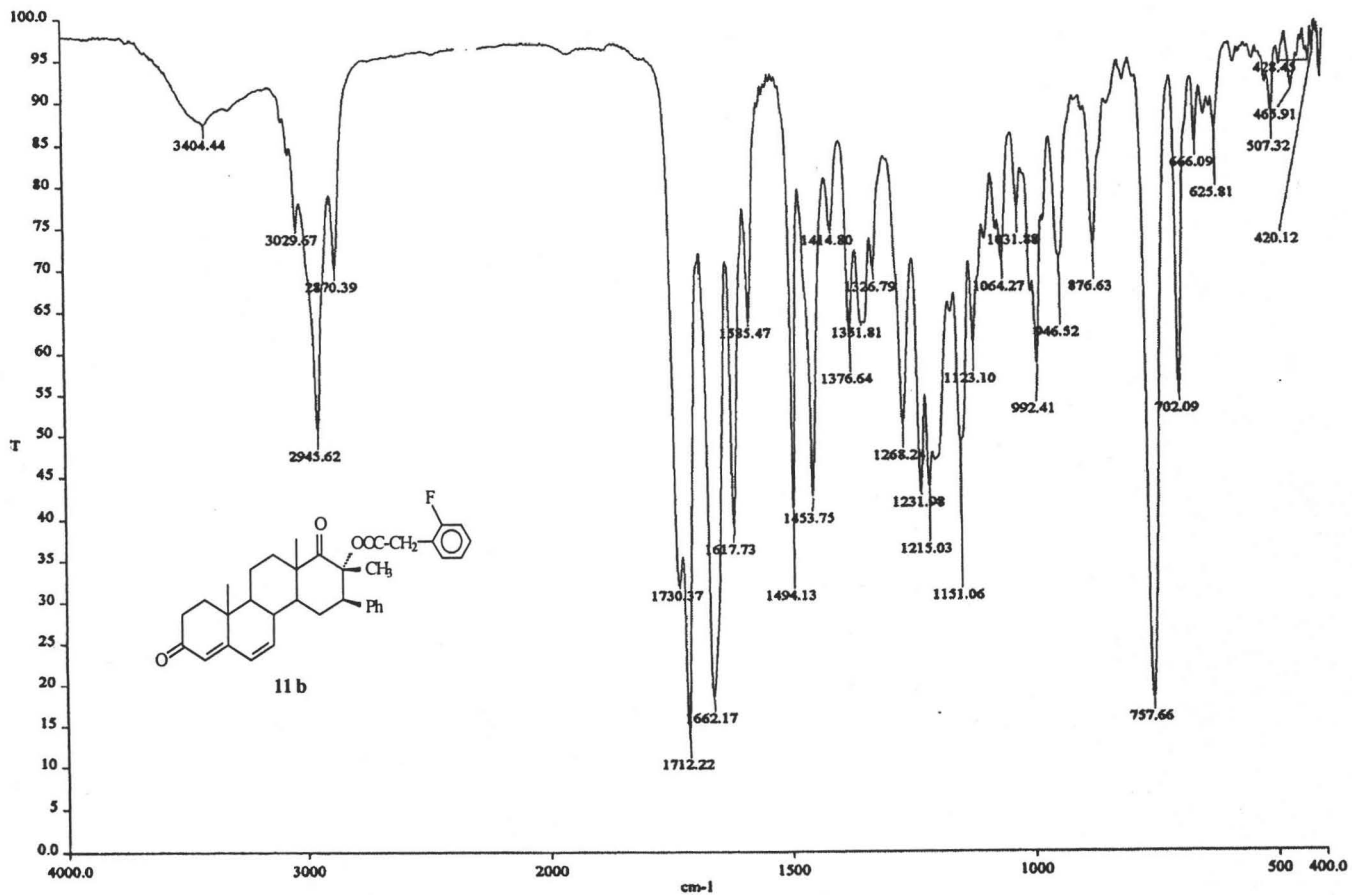
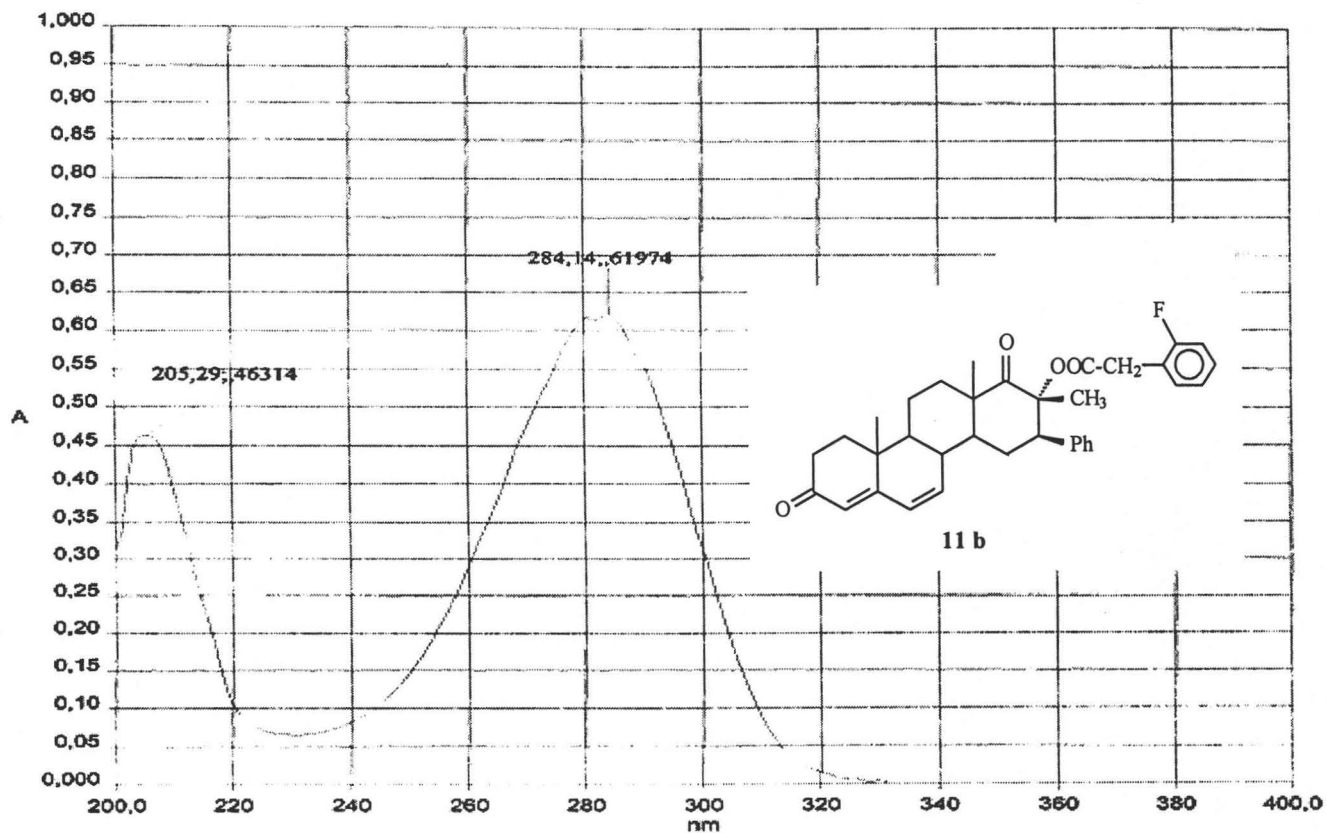
100

50

0

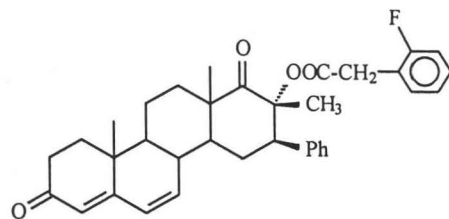
50 100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 600 m/z



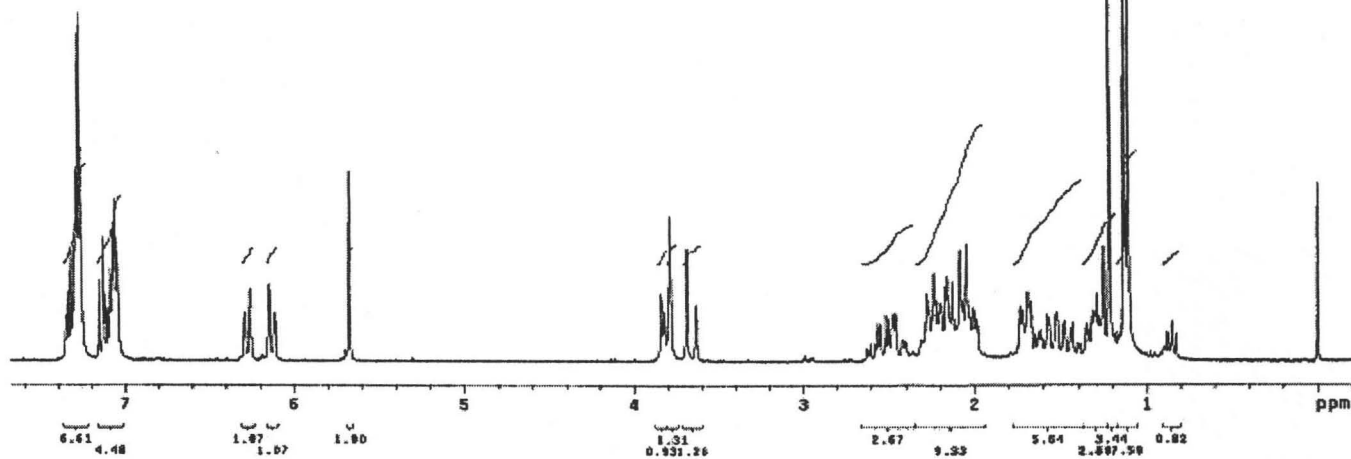


USA1
 99-11-04
 Dr. Eugene Bratoeff/Mayell Terán
 Ester-OF / CDCl₃
 1H 300.2 MHz
 Ref. TMS 0 ppm
 JDD-2
 VMAS

Pulse Sequence: s2pu1

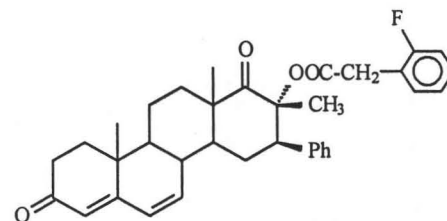


11 b

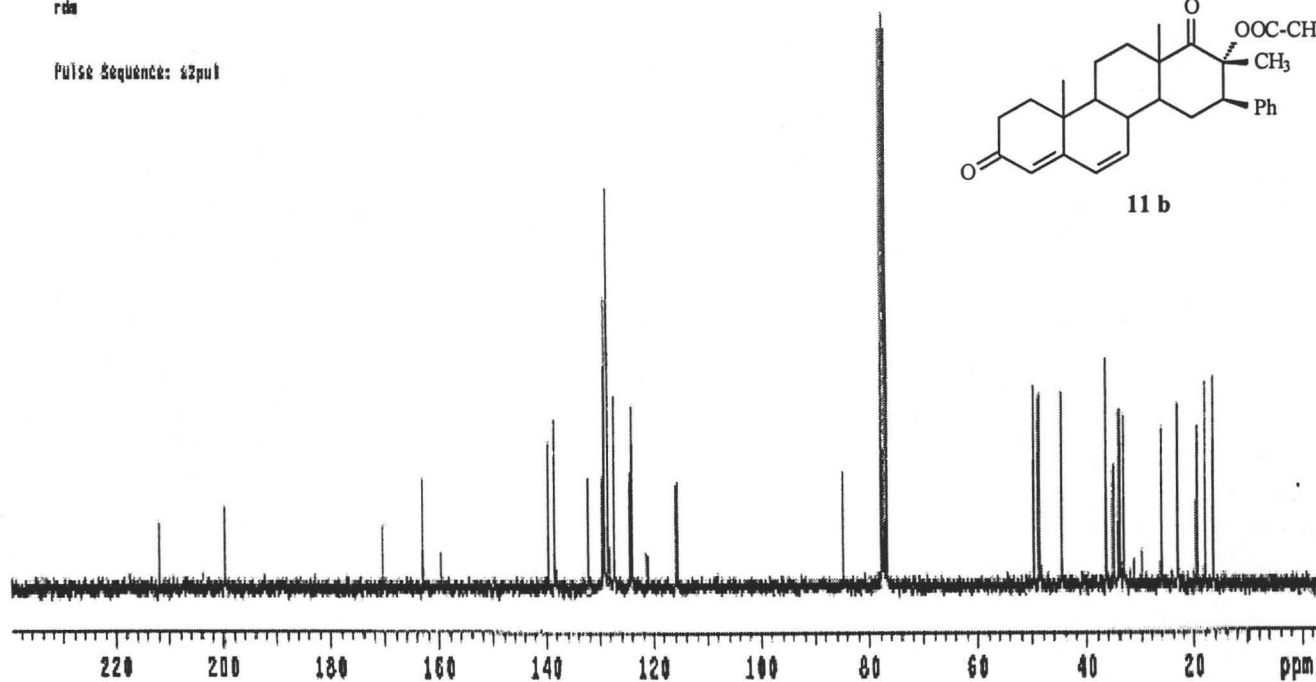


USA1
 17/MAY/JUNE/2004
 Dr. Eugene Bratoeff / Mayell Terán
 Ester-OF / CDCl₃
 13C 75.3 MHz
 Ref. CDCl₃ 77 ppm
 JDD-2
 rdm

Pulse Sequence: s2pu1

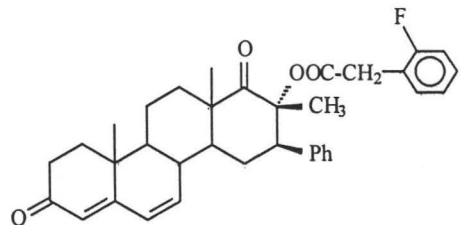


11 b



USA7
 02-11-04
 Dr. Eugenio Bratoeff / Mayel Teran
 Ester-O2/CDC13
 13C 75.5 MHz
 Ref. CDC13 77 ppm
 JDU-1
 VNAS/RDH

Espectro 35



11 b

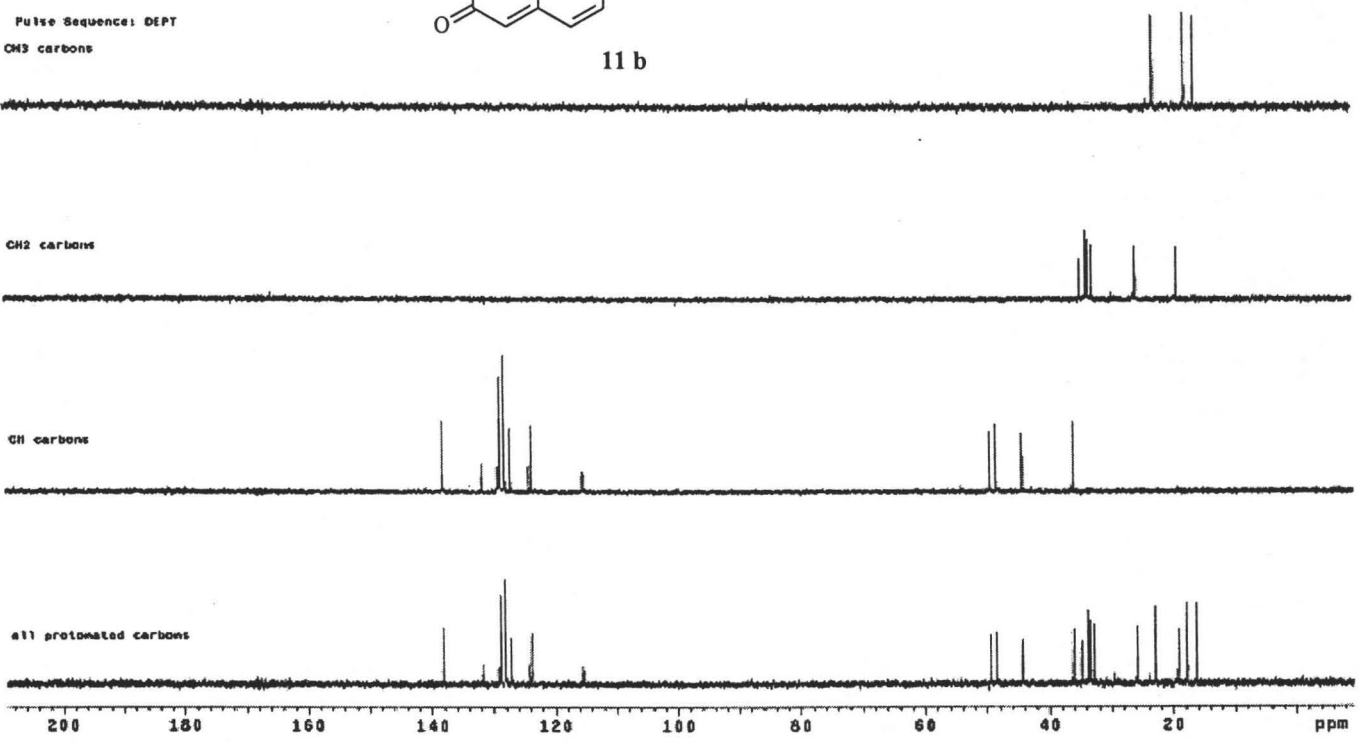
Pulse Sequence: DEPT

CH3 carbons

CH2 carbons

CH carbons

all protonated carbons



16β-fenil-17α-(3-fluorofenilacetoxi-17β-metil-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona

Espectro 36

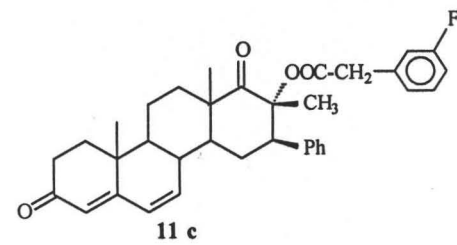
[Mass Spectrum]

RT : 0.75 min

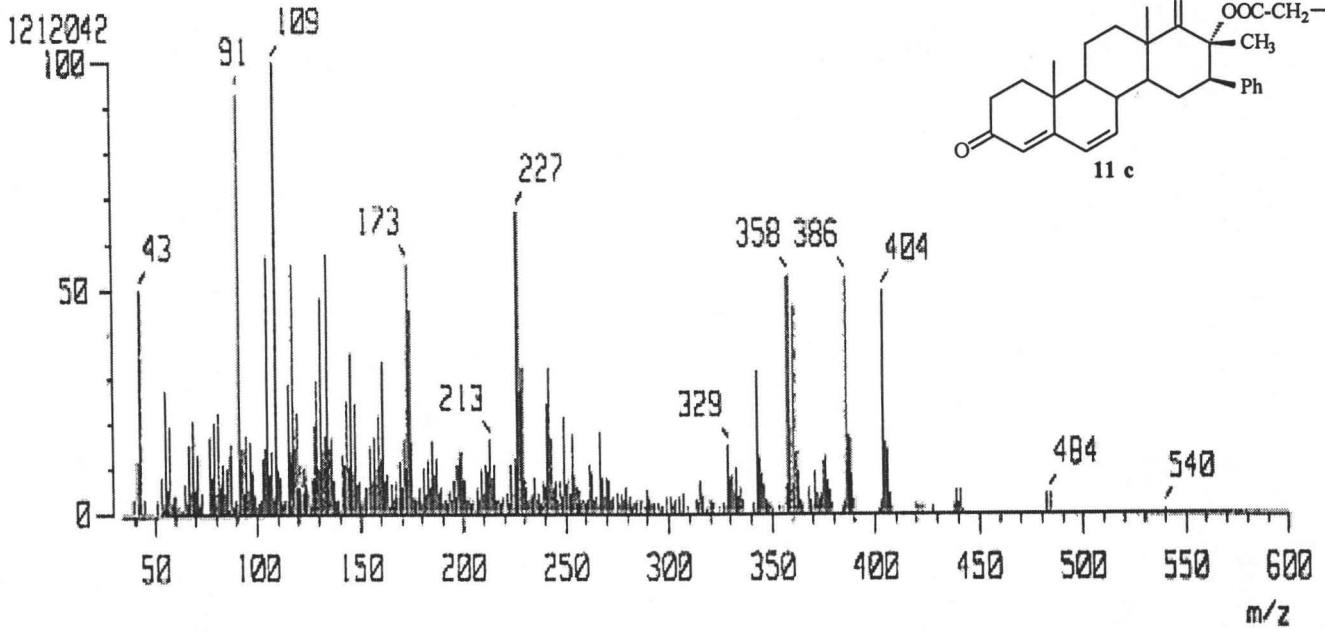
Scan# : (28,29)-k((136,151))[k=1.0]

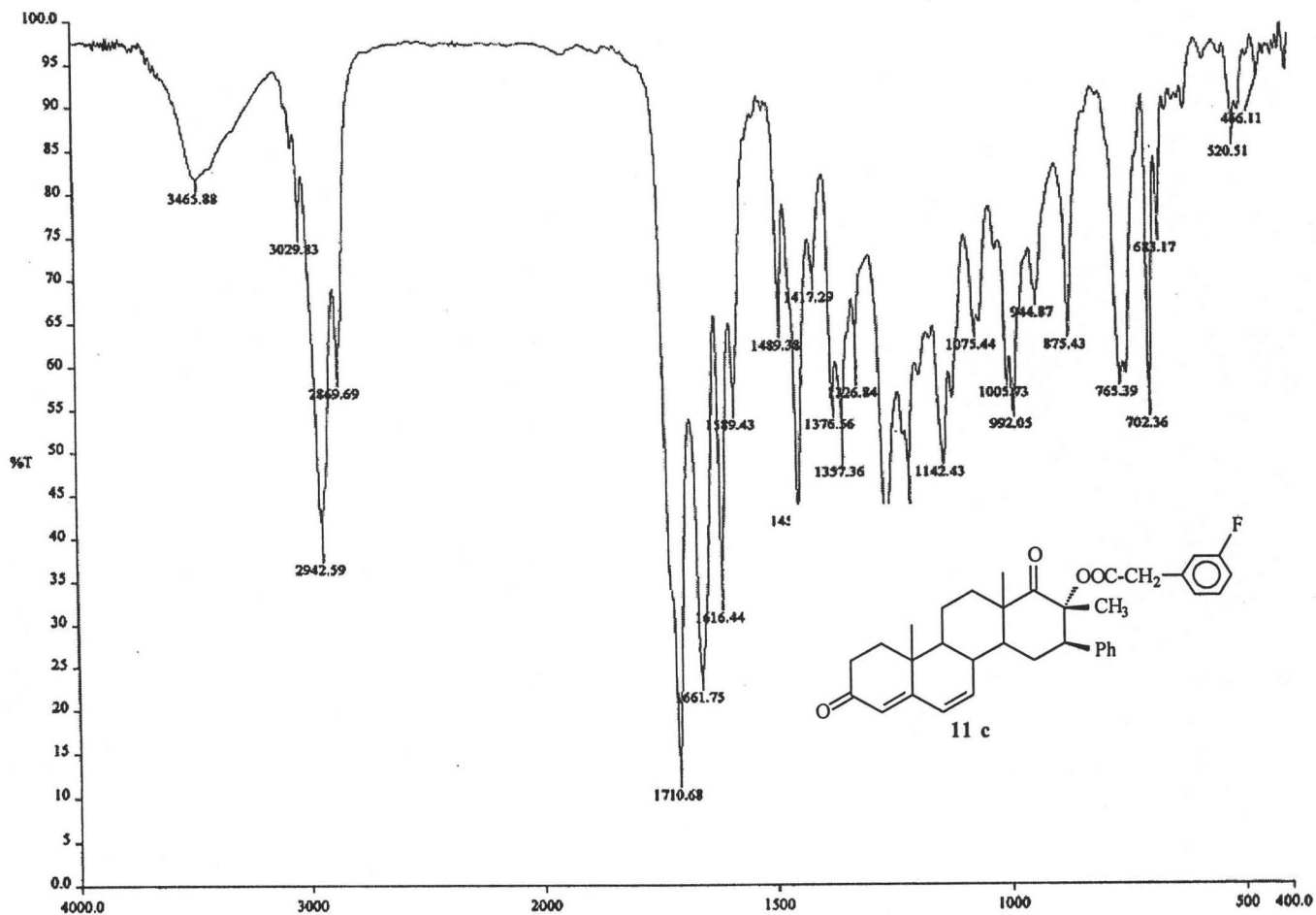
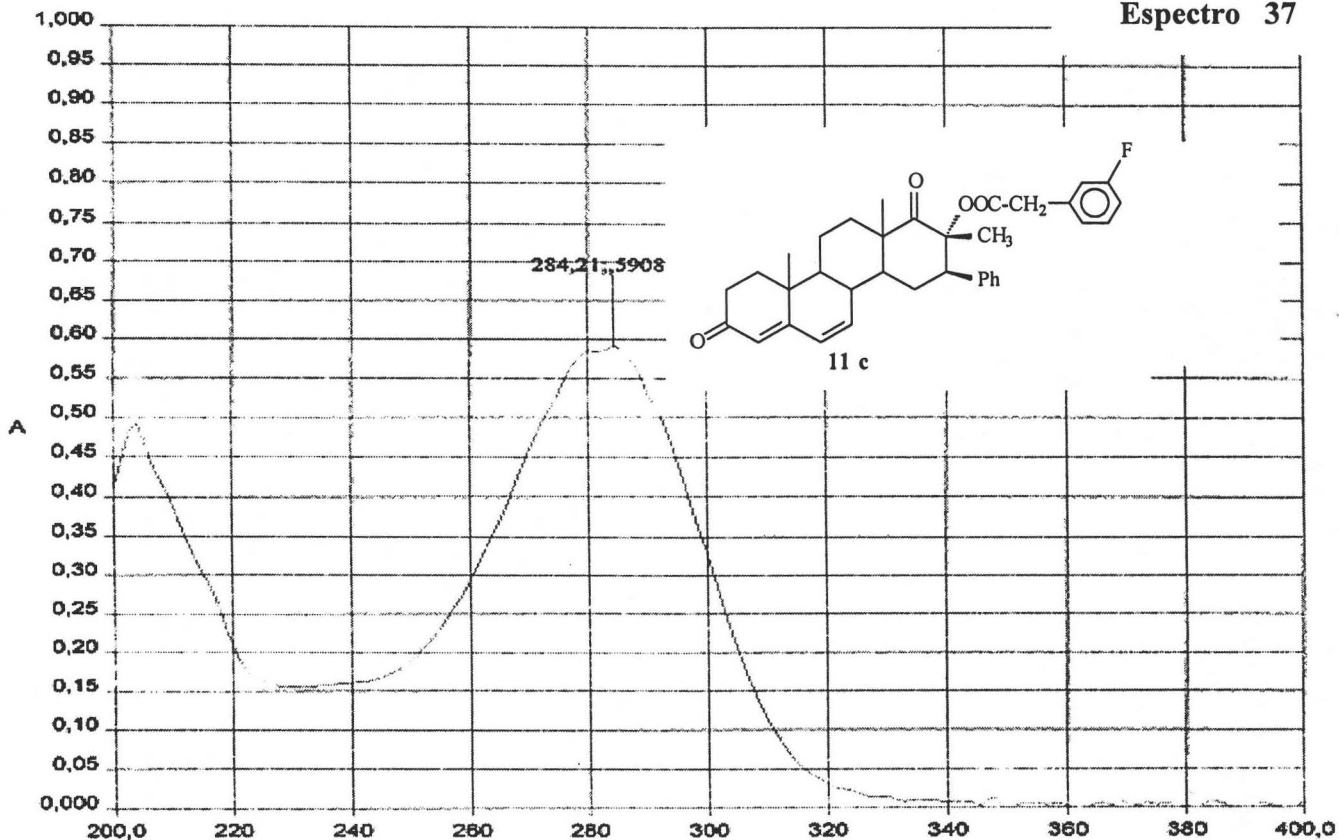
Ion Mode : EI+

Int. : 115.59



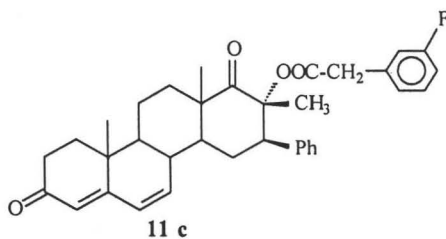
11 c



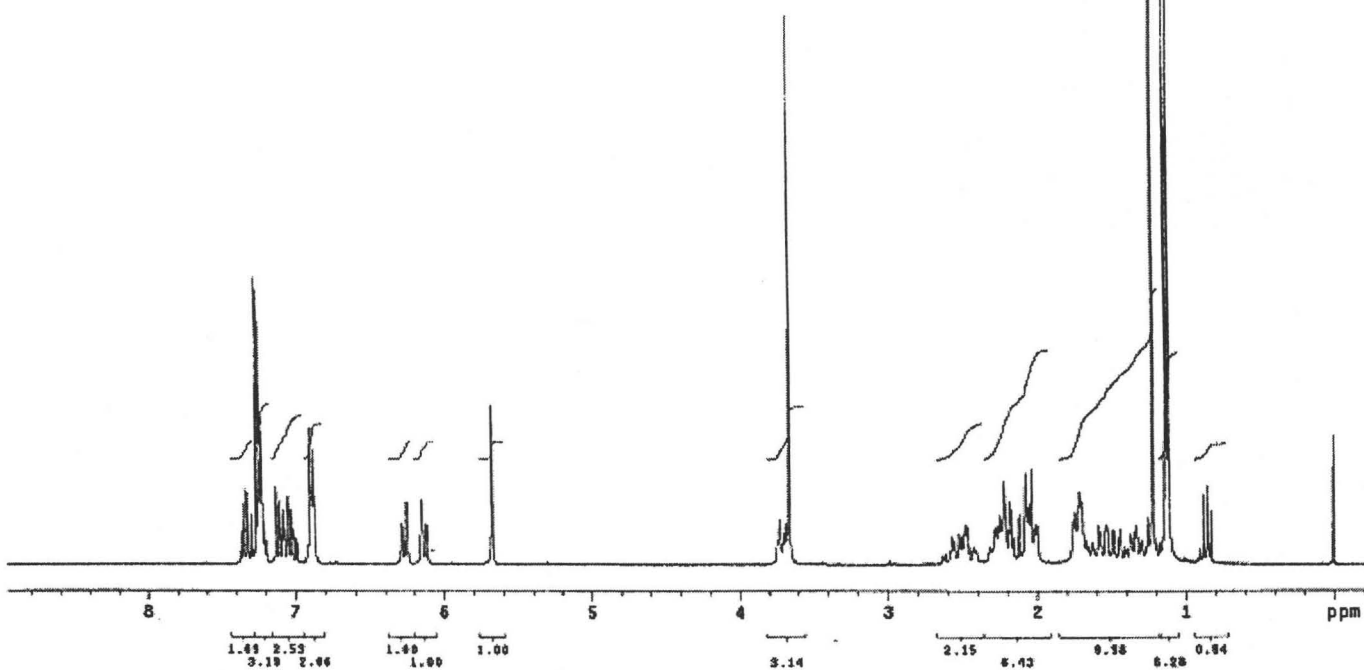


Espectro 39

USNT
11/NOVIEMBRE/2004
Dr. Eugenio Bratoeff / Nayeli Terán
Ester-NF / CDCl₃
1H 299.7 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-2
rdm

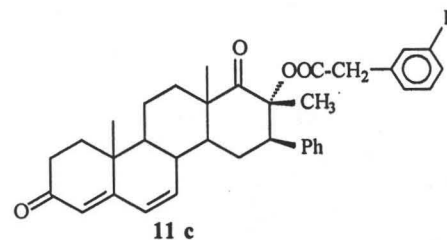


Pulse Sequence: s2pul

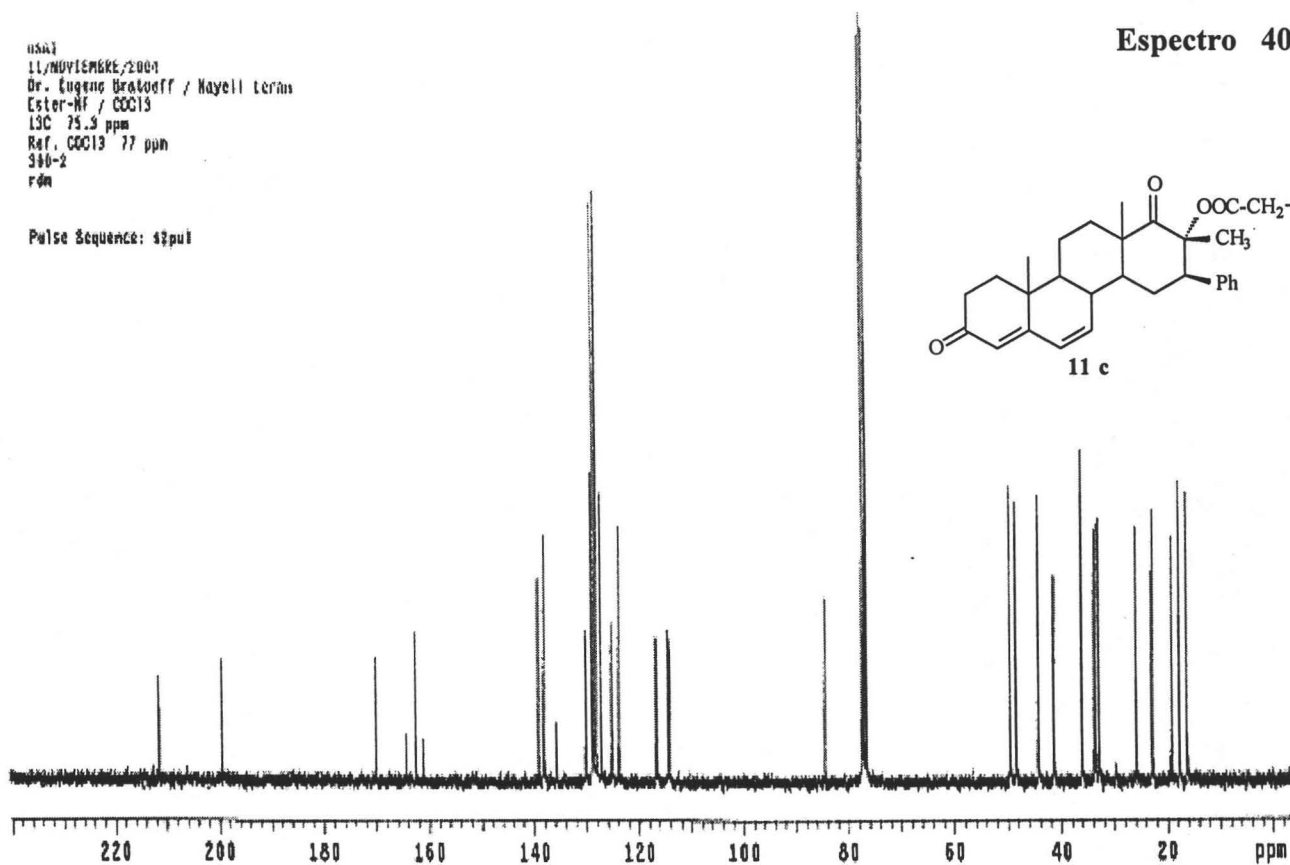


Espectro 40

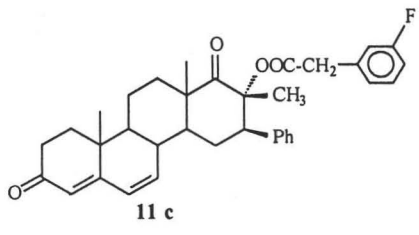
USNT
11/NOVIEMBRE/2004
Dr. Eugenio Bratoeff / Nayeli Terán
Ester-NF / CDCl₃
13C 75.3 ppm
Ref. CDCl₃ 77 ppm
300-2
rdm



Pulse Sequence: s2pul



05/11
31/ND/11/HRRE/2004
Dr. Eugene Shtroeff / Mayelis Moran
Ester-MF / CDCl3
13C 75.3 ppm
Ref. CDCl3 77 ppm
300-2
rdb



Pulse Sequence: hapt

CH3 carbons

CH2 carbons

CH carbons

all protonated carbons

