



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

72/551
76/002
76/002

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

INFORME DE INVESTIGACION SÍNTESIS Y EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE COMPUESTOS ANTIANDROGÉNICOS

INFORME PARA OPTAR POR EL GRADO DE **MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

NOMBRE DEL ALUMNO
CALDERON GUZMAN DAVID



TUTOR: BRATOEFF TITEFF EUGENE A.

AÑO: 2005





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

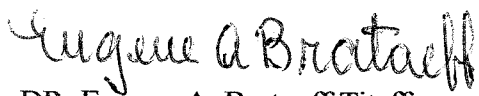
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

INFORME DE INVESTIGACIÓN

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE COMPUESTOS ANTIANDROGÉNICOS


DR. Eugene A. Bratoeff Titeff
TUTOR


QFB. David Calderón Guzmán
SUSTENTANTE

Indice

Contenido	Página
Resumen -----	4
Abstract -----	4
Objetivos -----	4
Introducción -----	5
Esquema 1. Antiandrógenos esteroideos sintéticos -----	8
Esquema 2. Ruta general de síntesis -----	9
Material y métodos -----	10
Métodos de síntesis y determinación de constantes Físicas y Espectroscópicas --	10
Ensayo de actividad antiandrogénica <i>in vitro</i> -----	21
Discusión y resultados de la síntesis -----	23
Discusión y resultados del ensayo farmacológico <i>in vitro</i> -----	29
Conclusiones -----	31
Referencias -----	32

Resumen

En el presente estudio, se describe la síntesis y evaluación farmacológica *in vitro* de 10 compuestos esteroidales, acetato de 16-dehidropregnenolona (V), 16 α -17 α -epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (VI), 3 β -acetoxi-16 α -17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (VII), 3 β -acetoxi-16 α -17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-pregnen (VIII), 20-etilendioxi-3 β -17 α -dihidroxi-16 β -metil-5-pregnen (IX), 3 β -17 α -dihidroxi-16 β -metil-5-pregnen-20-diona (X), 17 α -hidroxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (XI), 17 α -acetoxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (XII), 17 α -acetoxi-6 α -7 α -epoxi-16 β -metil-4-pregnen-3-ona (XIII), 6-bromo-17 α -acetoxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (XIV). El ensayo farmacológico *In vitro* se llevó a cabo con ratas adultas macho de la cepa Wistar, de las cuales se extrajo la próstata, para evaluar el compuesto final y sus intermediarios obtenidos durante el proceso de síntesis, mediante la evaluación de la enzima 5 α -reductasa. El compuesto final XIV, mostró mayor actividad antiandrogénica al inhibir la enzima 5 α -reductasa con respecto a los compuestos comerciales de referencia, acetato de ciproterona III y finasterid IV, así como también del resto de los intermediarios sintéticos V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII y XIII. Los resultados indican que el bromo y el acetoxi insertados en la molécula esteroideal en los carbonos 6 y 17, respectivamente, son indispensables para inducir el efecto antiandrogénico.

Abstract

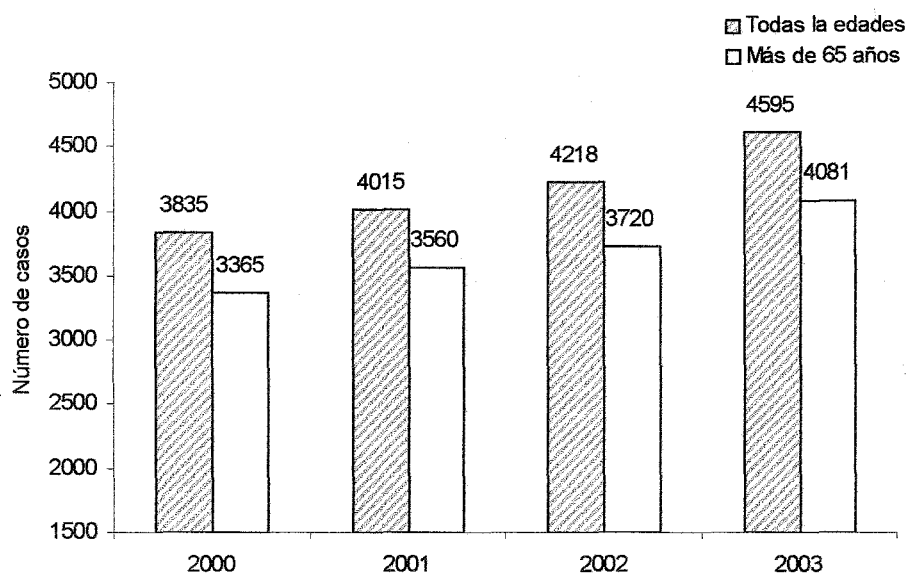
In the present study, we describe the synthesis and pharmacological evaluation *in vitro* of ten pregnane derivatives 16-dehydropregnanolone acetate (V), 16 α -17 α -epoxy-3 β -hydroxy-5-pregnan-20-one (VI), 3 β -acetoxi-16 α -17 α -epoxy -5-pregnan-20-one (VII), 3 β -acetoxi-16 α -17 α -epoxy-20-etilendioxy-5-pregnan (VIII), 20-etilendioxy-3 β -17 α -dihydroxy-16 β -metyl-5-pregnan (IX), 3 β -17 α -dihydroxy-16 β -metyl-5-pregnan-20-dione (X), 17 α -hydroxy-16 β -metyl-4,6-pregnadien-3,20-dione (XI), 17 α -acetoxi-16 β -metyl-4,6-pregnadien-3,20-dione (XII), 17 α -acetoxi-6 α -7 α -epoxy-16 β -metyl-4-pregnan-3-one (XIII), 6-bromo-17 α -acetoxi-16 β -metyl-4,6-pregnadien-3,20-dione (XIV). These compounds were evaluated as antiandrogens on 5 α -reductase enzyme of prostate gland in Wistar adult male rats. The pharmacological data in this study indicate that compound XIV, showed the highest antiandrogenic activity as 5 α -reductase inhibitor as compared to the commercially available cyproterone acetate III and finasteride IV. These results suggest that the bromine atom at C-6 and acetoxi moiety at C-17 are required for the presence of high antiandrogenic activity. The intermediates V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII and XIII, didn't show antiandrogenic activity.

Los objetivos que se plantean para el presente trabajo son los siguientes:

1. Sintetizar el compuesto 6-bromo-17 α -acetoxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona.
2. Evaluar *in vitro* la actividad antiandrogénica del compuesto sintetizado a través de su capacidad de inhibir la actividad de la enzima 5 α -reductasa.

Introducción

Los antiandrógenos son sustancias de origen natural (1,2) o sintéticos, usados en el tratamiento de enfermedades androgenodependientes, tales como hirsutismo, alopecia androgénica, hiperplasia prostática y cáncer de próstata (3). Las enfermedades de la próstata son una de las principales causas de mortalidad en México, debido a que miles de muertes se registran cada año, como lo reportan las autoridades de salud (4), dado que en el año de 1993 había 2708 casos de muertes registradas, y 10 años después esta cifra se ha incrementado en 59%, al registrarse 4595 casos, como lo muestra la gráfica siguiente.



Gráfica 1. Mortalidad en hombres mexicanos por tumor maligno de la próstata.

En la gráfica anterior se presentan los registros de mortalidad más recientes, reportados por la Secretaría de Salud, se muestran dos grupos de edad, el primer grupo incluye a individuos de todas las edades, y el segundo grupo que abarca solo a individuos mayores de 65 años de edad, lo cual deja claro que las enfermedades relacionadas con la próstata no son exclusivas de las personas de la tercera edad.

En la actualidad no existe un estudio sobre las deficiencias genéticas en humanos, que muestre las lesiones bioquímicas ocasionadas por los fármacos antiandrogénicos. Las consecuencias fenotípicas en la deficiencia genética de 5α -reductasa, sin embargo, ofrecen una estrategia para el desarrollo de nuevos fármacos que pueden ser útiles en el tratamiento de las enfermedades androgenodependientes (5). Por otra parte, el desarrollo de nuevos fármacos para combatir el cáncer de próstata además de inhibir la enzima 5α -reductasa, actualmente buscan inhibir el citocromo P450, y las enzimas 17α -hidroxilas y C17,20 liasas (6-9), que participan en el metabolismo de los andrógenos endógenos.

La noticia de que la glándula prostática esta sujeta a la estimulación por la dihidrotestosterona (DHT), y no por la clásica hormona testicular llamada testosterona, ha sido descubierta por estudios recientes. Por ejemplo, la unión de la DHT al núcleo prostático es más evidente que para la testosterona. Sin embargo, la presencia en la próstata de una enzima nucleótido-dependiente capaz de convertir la testosterona en DHT fué demostrado en 1968 por Bruchovsky y Wilson (10). Anderson y Liao (11) demostraron que la cromatina nuclear de la próstata, pero no de otros tejidos insensibles a andrógenos, contienen un receptor androgénico que retiene selectivamente la DHT. Se ha visto que la testosterona y la DHT forman un receptor común, y es importante mencionar que el efecto de la DHT no se ve minimizado por la testosterona. Por el contrario, la DHT amplifica la respuesta androgénica como resultado de su varias veces mayor afinidad por el receptor androgénico (12).

La conversión local de testosterona a DHT por la enzima 5α -reductasa probablemente sirve como un amplificador del mecanismo androgénico. Tal amplificación puede ser menos crítica en tejidos en donde la testosterona se encuentra en cantidades suficientes para su efecto androgénico, pero esencial para los tejidos que dependen de la presencia de DHT (por ejemplo: próstata, vesículas seminales y glándulas sebáceas). La DHT es por lo tanto, esencial para la diferenciación de los genitales externos masculinos, incluyendo la próstata (13). La disminución de los niveles de DHT puede ofrecer consecuencias terapéuticas positivas sin ocasionar efectos secundarios adversos, sobre los caracteres sexuales masculinos mediados por la testosterona.

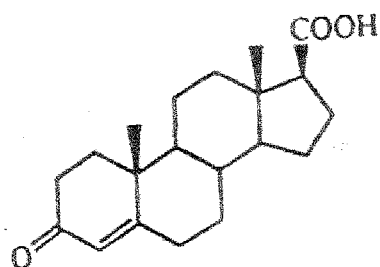
Se han encontrado diferentes especies de 5α -reductasa entre ratas, perros y humanos, esto se evidencia con la utilización de una serie de inhibidores, conteniendo diferentes sustituyentes en la posición C-17. Estos inhibidores muestran semejantes resultados entre las enzimas de ratas y de humanos. Ciertos inhibidores que contienen un sustituyente en C-17 β , son más potentes con la enzima de las ratas, siendo solamente 15-20% y 0.2-0.4% tan efectivos contra la actividad derivada de los perros y humanos, respectivamente (14). Otros estudios más recientes han evaluado la enzima 5α -reductasa en caldo de *Penicillium Crustosum*, obtenido de maíz fermentado, demostrando que la enzima tiene comportamiento competitivo (15). En resumen, existen diferentes métodos para evaluar la actividad antiandrogénica de los compuestos sintéticos o naturales, y todos han demostrado ser confiables (16,17)

Los primeros inhibidores de 5α -reductasa se reportaron en los años 70's 1 y 2 (18,19). De estos compuestos esteroideos el acetato de ciproterona 3 ha sido empleado como fármaco de elección para combatir las enfermedades androgenodependientes en humanos durante mucho tiempo (20), este fármaco se activa mediante la reducción del grupo ceto en C-3, seguido por la sulfonación del

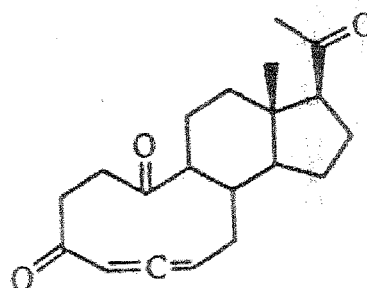
hidroxiesteroide que a su vez genera un sulfoconjugado inestable, todo este proceso metabólico se origina por la presencia de reductasas provenientes del metabolismo del citosol (21). Además, el acetato de ciproterona ha sido relacionado con casos de hepatotoxicidad (22) y de mutagenesis en ácido desoxiribonucleico (ADN) (23). Este es un motivo por el cual, es necesario continuar con la búsqueda de nuevos compuestos y alternativas terapéuticas que permitan combatir las enfermedades androgenodependientes en forma segura y efectiva. Esta búsqueda a través del tiempo ha demostrado que la sustitución apropiada de grupos funcionales en C-4 y C-17 es de particular importancia en el diseño de inhibidores de 5α -reductasa, como lo sugieren los estudios realizados por Bratoeff y otros investigadores (24-28).

Actualmente en el laboratorio de Química Farmacéutica, del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, a cargo del Dr. Eugene Bratoeff, se han sintetizado infinidad de compuestos homólogos del acetato de ciproterona (29-33), como inhibidores de la enzima 5α -reductasa; para llevar a cabo esto, se partió de un producto natural con características esteroideas seleccionadas, llamado acetato de 16-dehidropregnenolona (DPA) V, para sintetizar el compuesto 6-bromo-17 α -acetóxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona, afín al acetato de ciproterona.

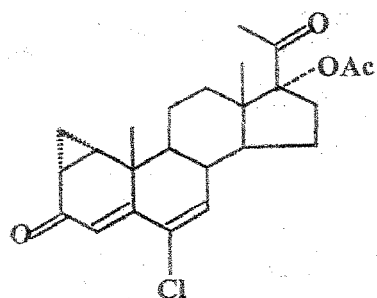
Esquema 1. Antiandrógenos esteroideos sintéticos



1

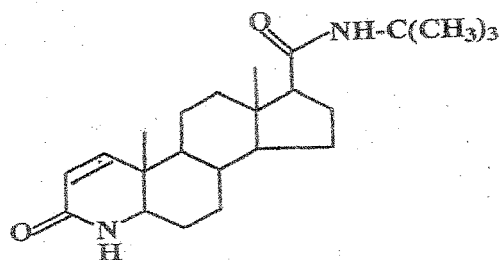


2



ACETATO DE CIPROTERONA

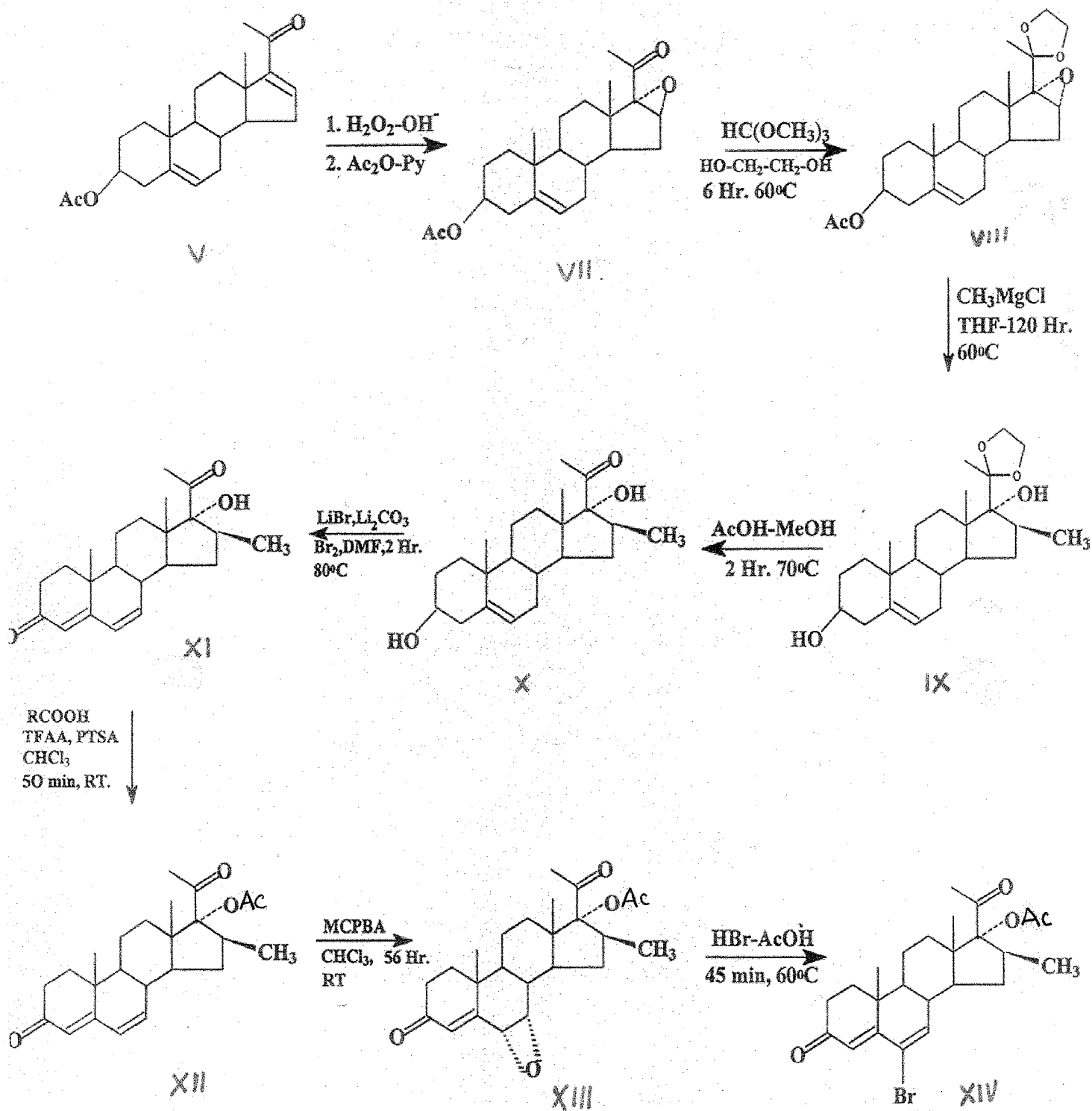
3



PROSCAR

4

Esquema 2. Diagrama general de síntesis.



Material y métodos:

Equipo:

1. Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato Fisher-Johnes
2. Los espectros de ultravioleta (UV), se obtuvieron por barridos de los compuestos disueltos en metanol en un espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer 202 y Perkin Elmer Lambda 2.
3. Los espectros de infrarrojo (IR), se realizaron sobre pastillas de bromuro de potasio o en solución, en un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer modelo 337
4. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (^1H RMN) y de carbono 13 (^{13}C RMN), se determinaron en un espectrofotómetro varian EM390 y varian UxR-3005, utilizando como referencia interna el tetrametil silicio (TMS).

Tabla 1.
Propiedades físicas y espectroscópicas de 16-DPA V.

pf	170-172 °C
P.M.	356 uma
UV λ_{max} 240 nm	cetona α , β insaturada en C-20
IR 1662 cm^{-1} 1730 cm^{-1}	cetona α , β insaturada en C-20 carbonilo de éster sobre C-3
^1H RMN 1.0 ppm 1.2 ppm 2.2 ppm 2.3 ppm 4.3 ppm 5.4 ppm 6.8 ppm	s (3H, metilo en C-18) s (3H, metilo en C-19) s (3H, metilo en C-21) s (3H, metilo del éster en C-3) m (1H, base del acetoxi en C-3) d (1H, protón vinílico en C-6) t (1H, protón vinílico en C-16)

Síntesis de 16 α -17 α -epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona VI. Para iniciar la síntesis, se parte de acetato de 16-DPA V, el cual es una materia prima disponible comercialmente. Para la formación del epóxido se siguieron las condiciones de reacción previamente reportadas (34). En un matraz de bola de 150 ml conteniendo 40 ml de metanol con temperatura de 55°C, se agregaron 2 ml de solución de NaOH 4N, 4 ml de H₂SO₄ al 30% y 1g de DPA; la mezcla se mantuvo con agitación constante durante 4 horas. A temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se refrigeró a 4°C y se filtró en embudo buckner, posteriormente se realizaron 3 extracciones con 100 ml de CHCl₃ cada una, la fase orgánica se lavó con agua abundante hasta obtener un pH de 7.0, inmediatamente después, se secó con Na₂SO₄, se decantó y evaporó a sequedad. El sólido resultante se pesó y se obtuvo un rendimiento constante del 99.0%.

Tabla 2.

Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto VI

pf	180-185°C
P.M.	330 uma
IR 3462 cm ⁻¹ 2934 cm ⁻¹ 1692 cm ⁻¹ 1653 cm ⁻¹ 1360 cm ⁻¹ 806 cm ⁻¹	Alcohol en C-3 CH ₃ - y CH ₂ - Carbonilo en C-20 doble ligadura en C-5 CH ₃ - alargamiento para epoxido en C-16 α , C-17 α
¹ HRMN 1.1 ppm 1.2 ppm 2.1 ppm 2.2 ppm 3.3 ppm 3.6 ppm 5.3 ppm	s (3H, metilo en C-18) s (3H, metilo en C-19) s (3H, metilo en C-21) s (1H, alcohol en C-3) s (1H, base del epoxido C-16) s (1H, base del alcohol en C-3) d (1H, protón vinílico en C-6)

Síntesis de 3 β -acetoxi-16 α -17 α -epoxi-4-pregnen-20-ona VII. La acetilación del alcohol en C₃ se realizó por una acetilación convencional con anhídrido acético y piridina: En un matraz de 50 ml se adicionaron 10 ml de (CH₃CO)₂, 10 ml de piridina y 1g del epóxido VI. La mezcla de reacción se mantuvo 5 horas con agitación a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se virtió lentamente sobre 30g de hielo picado, y el precipitado que se formó se extrajo con 50 ml de CHCl₃ en tres ocasiones; posteriormente la fase orgánica se lavó con solución de HCl al 8% (p/v), y por último, se lavó con agua abundante hasta obtener un pH neutro. Después de esto, se secó con Na₂SO₄, se decantó y se evaporó a sequedad, el sólido resultante se pesó obteniéndose un rendimiento del 100%.

Tabla 3.
Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto VII

pf	157-159°C
P.M.	372 uma
IR 2954 cm ⁻¹ 1732 cm ⁻¹ 1698 cm ⁻¹ 850 cm ⁻¹	CH ₃ - y CH ₂ - carbonilo del éster en C-3 cetona en C-20 epóxido en C-16 α , C-17 α
¹ HRMN 1.1 ppm 2.0 ppm 3.7 ppm 4.6 ppm 5.3 ppm	s (6H, metilo en C-18 y C-19) s (6H, metilo en C-21 y metilo de acetilo en C-3) s (1H, base del epóxido C-16) m (1H, base del acetilo en C-3) d (1H, protón vinílico en C-6)

Síntesis de 3 β -acetoxi-20-etilendioxi-16 α -17 α -epoxi-5-pregнено VIII. La protección del carbonilo en C-20 se realizó con modificaciones a la técnica de Shering (35). En un matraz de 50 ml, se disolvieron 6 ml de tolueno, 3 ml de etilenglicol, 4 ml de ortoformiato de trimetilo, 20 mg de ácido para-toluensulfónico (pTSA) y 1g de compuesto VII (todos los reactantes deben ser anhídros),. La reacción se mantuvo por 6 horas, a 60°C, con agitación constante y en atmósfera de nitrógeno. Transcurrido el tiempo, se agregaron 7 mg de acetato de sodio y se procedió a extraer 3 veces con 50 ml de CHCl₃ cada una; posteriormente, la fase orgánica se lavó con agua abundante hasta llevarlo a pH neutro, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se decantó y se evaporó a sequedad. El sólido resultante se cristalizó añadiendo metanol y dejando enfriar a 4°C, obteniendo un rendimiento del 65%.

Tabla 4.
Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto VIII

pf	194-196°C
P.M.	415 uma
IR 2900 cm ⁻¹ 1720 cm ⁻¹	CH ₃ - y CH ₂ - carbonilo del éster en C-3
¹ HRMN 1.0 ppm 1.1 ppm 1.5 ppm 2.1 ppm 3.3 ppm 3.9 ppm 4.6 ppm 5.3 ppm	s (3H, metilo en C-18) s (3H, metilo en C-19) s (3H, metilo en C-21) s (3H, metilo del acetilo C-3) s (1H, base del epóxido C-16) s (4H, dioxolano en C-20) m (1H, base del acetilo en C-3) d (1H, protón vinílico C-6)

Síntesis de 20-etilendioxi-3 β , 17 α -dihidroxi-16 β -metil-5-pregнено IX. Para la inserción del metilo en C-16 se utilizó reactivo de grignard (35). En un matraz de bola de 50 ml se adicionó 1g. del compuesto VIII, 11 ml de cloruro de metilmagnesio 3M en tetrahidrofurano y 300 mg de yoduro de cobre. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante y reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 5 días. Transcurrido este tiempo, se adicionó lentamente una solución saturada de cloruro de amonio hasta neutralización total; seguido de esto se extrae 3 veces con cantidades iguales de 100 ml de CHCl₃, posteriormente se lavó con agua (medir con papel indicador el pH) hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se decantó y se evaporó a sequedad. El sólido resultante se cristalizó con 5 a 10 ml de metanol mantenido a 4°C, obteniéndose un rendimiento de 70%.

Tabla 5.
Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto IX

pf	162-165°C
P.M.	390 uma
IR 3576 cm ⁻¹ 3416 cm ⁻¹	alcohol en C-17 α alcohol en C-3 β
¹ HRM 0.87 ppm 0.98 ppm 1.17 ppm 1.37 ppm 3.5 ppm 4.0 ppm 5.4 ppm	s (3H, metilo en C-18) s (3H, metilo en C-19) d (3H, metilo en C-16 β) s (3H, metilo en C-21) m (1H, base de alcohol en C-3) m (4H, dioxolano en C-20) d (1H, protón vinílico en C-6)

Síntesis de 3 β -17 α -dihidroxi-16 β -metil-5-pregnen-20-ona X. Para eliminar la protección del carbonilo se llevó a cabo la hidrólisis en medio ácido con ácido acético a reflujo. En un matraz de 50 ml se adicionó 1g del compuesto metilado IX, 4.5 ml de metanol, 10 ml de ácido acético glacial y 10 ml de agua. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación durante un tiempo de 4 horas, transcurrido ese tiempo, se refrigeró a temperatura de 4°C por un mínimo de 5 horas. El precipitado obtenido se filtró y se secó a temperatura ambiente, y el sólido resultante se cristalizó en metanol, obteniéndose un rendimiento del 75%.

Tabla 6.

Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto X

pf	228-230°C
P.M.	346 uma
IR 1696 cm ⁻¹ 3462 cm ⁻¹	carbonilo en C-20 alcoholes en C-3 β y C-17 α
¹ HRMN 1.1 ppm 1.2 ppm 1.3 ppm 2.1 ppm 3.5ppm 5.3 ppm	d (3H, metilo en C-16 β) s (3H, metilo en C-18) s (3H, metilo en C-19) s (3H, metilo en C-21) m (1H, base de alcohol en C-3) d (1H, protón vinílico en C-6)

Síntesis de 17 α -acetoxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona XII. Para llevar a cabo la esterificación en C-17 α se tomaron en cuenta las referencias para esterificar alcoholes impedidos estéricamente (37,40,46). En un matraz de bola de 25 ml se adicionó 1g de compuesto oxidado XI, 10 ml de ácido acético anhidro recién destilado, 5 ml de anhídrido trifluoroacético y 100 mg de pTSA. La reacción se llevó a cabo con agitación, a temperatura ambiente durante 5 min, después de lo cual, la mezcla se virtió sobre 5 ml de una solución acuosa de Na₂CO₃ al 10% (p/v), y se extrajo 3 veces con 20 ml de acetato de etilo cada una. La fase orgánica se lavó con agua corriente hasta llevarlo a pH neutro (medido con papel indicador), se secó con Na₂SO₄ anhidro, y el disolvente se evaporó a sequedad, obteniéndose un rendimiento del 60%.

Tabla 8.
Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto XII.

Pf	212-214 °C
P.M.	380 uma
UV λ_{max} 284 nm $\epsilon=31,167$	cetona $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ conjugada en C-3
IR 1728 cm ⁻¹ 1664 cm ⁻¹	carbonilo en C-20 carbonilo en C-3
¹ HRMN 0.8 ppm 1.1 ppm 0.9 ppm 1.9 ppm 3.6 ppm 5.6 ppm 6.2 ppm	s (3H, metilo en C-18) s (3H, metilo en C-19) d (3H, metilo en C-16 β) s (3H, metilo en C-21) m (DMSO, disolvente) s (1H, protón en C-4) s (2H, protones en C-6 y C-7)

Síntesis de 17 α -acetoxi-6 α -7 α -epoxi-16 β -metil-4-pregnen-3,20-diona XIII. Para la epoxidación de la doble ligadura en C6-C7, se utilizó la técnica con ácido metacloroperbenzóico (MCPBA) (37,44). En un matraz de 25 ml se adicionaron 100 mg del compuesto XII, disuelto en 10 ml de CHCl₃ anhidro y 400 mg de MCPBA, lentamente. La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo con agitación durante 18 horas en condiciones anhidras. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción se lavó 5 veces con porciones de 50 ml de solución acuosa de Na₂CO₃ saturada. Posteriormente la fase orgánica se lavó con agua destilada hasta pH neutro y se secó con Na₂SO₄ anhidro en reposo. Después de lo cual se evaporó el disolvente a sequedad, obteniéndose un rendimiento del 60%.

Tabla 9.
Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto XIII.

pf	213-215 °C
P.M.	396 uma
UV λ_{max} 239 nm	cetona $\alpha,\beta\text{-}\gamma,\delta$ conjugada en C-3
IR 1728 cm ⁻¹ 3428 cm ⁻¹	carbonilo en C-20 alcohol en C-17 α
¹ HRMN 0.8 ppm 1.1 ppm 1.4 ppm 1.0 ppm 1.9 ppm 2.3 ppm 3.3 ppm 3.5 ppm 6.1 ppm	s (3H, metilo en C-18) s (3H, metilo en C-19) d (3H, metilo en C-16 β) t (3H, metilo de éster C-17 α) s (3H, metilo en C-21) t (2H, metileno del éster en C-17 α) d (1H, protón en C-7 β) d (1H, protón en C-6 β) s (1H, protón en C-4)

Síntesis de 6-bromo-17 α -acetoxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona XIV. La introducción del halógeno en C-6 se realizó mediante la técnica de formación de la halohidrina correspondiente y su posterior deshidratación (37,44). En un matraz se colocaron 0.8 g del compuesto epóxido esteroideal XIII y 8 ml de ácido acético glacial. La mezcla se puso en agitación y una vez disuelto todo el compuesto, se añadieron gota a gota 2.5 ml de solución de ácido bromhídrico (HBr) al 28% en ácido acético glacial. Se puso en agitación a temperatura ambiente, durante 2 horas, después de lo cual se incrementó la temperatura de la mezcla a 40°C durante 45 minutos. La mezcla de reacción se enfrió en baño de hielo y se neutralizó con solución de NaHCO₃ al 5% (p/v) y se extrajo 3 veces con porciones de acetato de etilo cada una. La fase orgánica se lavó con agua y se secó con Na₂SO₄ anhidro en reposo. Se filtro y el disolvente se evaporó a sequedad, obteniéndose un rendimiento del 47%.

Tabla 10.

Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto XIV.

pf	212-215 °C
P.M.	463 (M+1=464)
UV $\lambda_{\max}$ 285 nm	cetona $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada
IR 1714 cm ⁻¹ 1730 cm ⁻¹ 1662 cm ⁻¹	cetona en C-20 carbonilo de éster cetona $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada
¹ HRMN 0.8 ppm 1.2 ppm 1.4 ppm 1.7 ppm 1.8 ppm 2.0 ppm 2.1 ppm 2.6 ppm 6.3 ppm 6.6 ppm	s (3H, metilo en C-18) s (3H, metilo en C-19) d (3H, metilo en C-16 β) m (2H, metileno en C-2) m (1H, protón en C-8) s (3H, metilo en C-21) s (3H, metilo en C-2) d (1H, protón en C-4) s (1H, protón en C-7) d (1H, protón en C-8)

Asignaciones de desplazamiento químico del compuesto final XIV en $^{13}\text{CRMN}$.

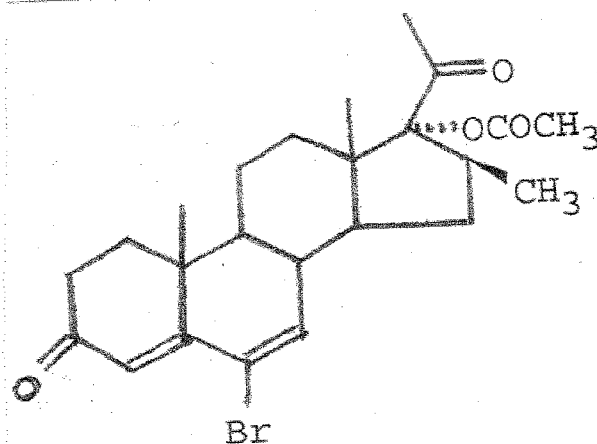


Tabla 11.

Carbon No.	δ Químico	Carbon No.	δ Químico
1	34.53	13	48.34
2	34.23	14	49.60
3	199.10	15	28.21
4	126.66	16	39.75
5	121.48	17	95.11
6	159.37	18	16.43
7	142.82	19	19.59
8	123.79	20	204.0
9	46.32	21	21.41
10	33.90	16 β	14.87
11	19.69	1'	171.12
12	34.11	2'	38.42

Procedimiento para obtener la próstata de rata.

A. Disección y extracción de próstata. Los animales fueron sedados con pentobarbital sódico por vía intravenosa en dosis de 25 mg/Kg de peso, realizando la asepsia y antisepsia habituales. El animal se colocó en posición ventral incidiendo la pared abdominal infra-supra umbilical a lo largo de la línea media, se localizó la vejiga en su parte posterior, el cuello de la próstata se disectó cuidadosamente y se extrajo, procediendo a pesar y homogeneizar el tejido obtenido, posteriormente se congeló a -20°C hasta su análisis.

Ensayo de actividad antiandrogénica *in vitro*

El ensayo de actividad enzimática se realizó mediante una modificación del método propuesto por Bratoeff y cols (24). Se utilizaron 5 ratas adultas machos, de la cepa Wistar con un peso promedio de 400g. Se realizó la disección de la próstata (Procedimiento A), para posteriormente pesarse y homogeneizarse, usando 10 ml de la solución descrita en la sección B (abajo). La homogeneización y sonicado se realizó con embolo de teflon, marca Bodine Electric Co., y un sonicador ultrasónico de alta velocidad, 50-watt model, respectivamente. Este último se realizó por 5 ocasiones con alícuotas de 10 ml, colocadas en un tubo inmerso en hielo, por periodos de 5 segundos, con intervalos de 15 seg. El homogenado fue centrifugado a $25,000 \times g$ a 4°C por 20 min. El sobrenadante se descartó y el botón se resuspendió en la solución descrita en la sección C (abajo), con el volumen necesario para obtener 400 μg por ml de solución. Esta suspensión se agitó en vortex, y las alícuotas se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

B. Preparación de la solución para homogeneizar. Se pesó 60.25 g de sacarosa y 33.3 mg de cloruro de calcio y todo fue agregado a un matraz aforado de 200 ml para su aforo.

C. Preparación de la solución Buffer. Se pesó 3.62 g de Na_2HPO_4 y se disolvió en agua, para ajustar a pH de 7.4 con 1N de HCl, y se aforó a 250 ml.

D. Mezcla de Incubación: Se añadió en un tubo de ensayo 650 μl de solución buffer Tris-HCl 250 mM pH 7.0, 250 μl de testosterona 4 mM, 250 μl de solución de NADPH 0.8 mM, 500 μl de suspensión de proteínas (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y 250 μl de solución del esteroide problema 4 mM (acetato de ciproterona,

finasterid, intermediarios y el compuesto final, se disolvieron en una mezcla de acetato de etilo:Metanol:Etanol 60:20:20).

- E. Procedimiento de Incubación: Después de añadir las cantidades mencionadas en la sección D, se realizó el experimento por cuadruplicado, preparando el blanco que omitió el esteroide problema. La mezcla de incubación se colocó en un baño Dubnoff-Labconco durante 30 min, con agitación permanente, y se detuvo la reacción enzimática al añadir 150 µl de ácido tricloroacético 40% (p/v).
- F. Determinación Espectrofotométrica: Terminada la reacción, se centrifugó a 1000 x g durante 10 min, y se procedió a determinar la variación de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640.

Discusión y resultados de la síntesis

La ruta de síntesis, tal como esta resumida en el esquema 2, se inició usando como materia prima el acetato de 16-dehidropregnenolona (16-DPA) V, el cual posee las características químicas adecuadas para la formación del compuesto objetivo. Antes de iniciar la ruta de síntesis, la materia prima se identificó mediante sus constantes físicas y espectroscópicas (tabla 1), donde se muestra el grupo cromóforo con λ_{max} 240 nm correspondiente a la cetona α,β -insaturada en C16-en-20-ona. Por su parte, el espectro de IR registró la existencia de 2 señales en la zona de carbonilos en 1662 cm^{-1} y 1730 cm^{-1} correspondientes a la cetona α,β -insaturada en C-20 y al carbonilo del acetoxi sobre C-3 respectivamente. Mientras tanto, el espectro de $^1\text{HRMN}$ de este compuesto, denotó señales intensas en 1.0 ppm (3H) y 1.2 ppm (3H) asignadas a los metilos angulares en C-18 y C-19, respectivamente, así como dos señales en 2.1 ppm (3H) y 2.3 ppm (3H) pertenecientes a los metilos en C-21 y C-3, este último en posición α -carbonilo del éster. Además, se observa un multiplete en 4.3 ppm (1H) asignado al protón base del acetoxi en C-3. En la zona de protones vinílicos se presentó un doblete en 5.4 ppm (1H) perteneciente al protón vinílico en C-6, así como también un multiplete en 6.8 ppm (1H) asignado al protón vinílico en C-16.

El primer paso de la ruta sintética implicó la epoxidación de la insaturación en C-16, la cual es parte de un sistema cetona α,β -insaturada, el método de elección para este caso es la epoxidación con H_2O_2 en medio básico, reacción que se favorece por la conjugación del carbonilo en C-20 (36,37). La reacción transcurre en una transformación cuantitativa hacia el epóxido deseado VI, compuesto que se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas que se resumen en la tabla 2. El IR de este compuesto presenta una señal intensa correspondiente al epóxido en 805 cm^{-1} , también se puede observar la señal de carbonilo perteneciente a la cetona en C-20 en 1692 cm^{-1} . Como resultado de las propiedades nucleofílicas de la solución de hidróxido de sodio (NaOH) utilizada en esta reacción; ocurre la hidrólisis del acetoxi en C-3, confirmada por la ausencia de la señal del carbonilo de éster y la aparición de una señal intensa para el alcohol en 3462 cm^{-1} . El espectro de $^1\text{HRMN}$ muestra evidencia de la reacción en función de la presencia de dos señales de protones base oxigenados, el primero correspondiente al protón en C-16 con un singulete en 3.3 ppm (1H) y el segundo la base del alcohol en C-3 con un singulete en 3.6 ppm (1H), además de la desaparición de la señal del protón vinílico, correspondiente a la insaturación en C-16. El espectro de $^1\text{HRMN}$ muestra en presencia de D_2O una señal intercambiable correspondiente al alcohol en C-3 con un desplazamiento de 2.2 ppm (1H). En este

mismo espectro se registran las señales correspondientes a los metilos angulares en 1.1 ppm (3H) y 1.2 ppm (3H) asignadas a los metilos C-18 y C-19, respectivamente, asimismo la señal del metilo alfa a la cetona en C-20 en 2.1 ppm (3H).

El siguiente paso de la síntesis consistió en la acetilación del alcohol en C-3 del compuesto VI, el cual estando en orientación ecuatorial favoreció la obtención de buenos rendimientos. El método empleado consistió en una acetilación convencional mediante una mezcla de anhídrido acético y piridina. El producto acetilado VII se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la tabla 3. El espectro de IR indica la presencia de una señal en 1732 cm^{-1} asignada al carbonilo del acetoxi y una señal en 1698 cm^{-1} , correspondiente al carbonilo de cetona en C-20; la ausencia de la señal del alcohol confirma la acetilación realizada. Por su parte la $^1\text{HRMN}$ mostró un singulete en 1.0 ppm (6H) correspondiente a los metilos en C-18 y C-19. El singulete en 2.1 ppm (6H) se asignó al metilo del grupo acetilo sobre C-3 y al metilo en C-21 alfa a la cetona en C-20. La señal aguda en 3.7 ppm (1H) se asignó al protón base del epóxido en C-16. El multiplete en 4.5 ppm corresponde al protón base del acetóxi en C-3. El doblete en 5.3 ppm (1H) se asignó al protón en C-6.

El siguiente paso de síntesis implicó la protección del carbonilo en C-20 del compuesto VII, ya que el próximo paso involucra la apertura del epóxido con un reactivo de Grignard, que podría ocasionar la introducción del grupo metilo al atacar el grupo carbonilo. Esta reacción se llevó a cabo empleando etilenglicol, orto-formiato de metilo, tolueno como disolvente y cantidades catalíticas de ácido para-toluensulfónico para la formación del dioxolano (38). El cetal formado VIII se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la tabla 4. El espectro de IR de este compuesto refleja la desaparición de la señal correspondiente al carbonilo cetónico en C-20, mostrando únicamente una señal intensa en 1720 cm^{-1} perteneciente al carbonilo del éster sobre C-3. El espectro de $^1\text{HRMN}$ del compuesto VIII muestra dos singuletes en 1.0 ppm (3H) y 1.1 ppm (3H) correspondientes a los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente. También se observa un singulete en 1.5 ppm (3H) asignado al metilo en C-21. Se registra además, un singulete en 2.1 ppm (3H), perteneciente al metilo del acetoxi sobre C-3. En 3.3 ppm (1H) el espectro muestra un singulete correspondiente al protón base del epóxido en C-16. Como evidencia de la formación del grupo funcional etilendioxi deseado se presenta un multiplete en 3.9 ppm (4H) asignado al dioxolano sobre C-20. En 4.6 ppm (1H) se registra un multiplete perteneciente al protón base del acetoxi en C-3. En la zona de los protones vinílicos se encontró un doblete en 5.3 ppm (1H) que se asignó al protón en C-6.

El siguiente paso de la síntesis consistió en la inserción del metilo en C-16 β en el compuesto VIII, reacción que representó el mayor obstáculo, así como el tiempo tan largo del presente trabajo. La

posición beta del metilo resulta del mecanismo de la reacción, el cual se trata de un mecanismo de sustitución nucleofílica alifática de 2° orden (SN_2) en la apertura del epóxido que necesariamente debe ser una sustitución transdiaxial (39). El compuesto metilado obtenido IX, se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la tabla 5. El espectro de IR de este compuesto evidenció la presencia de una señal intensa en la zona de alcoholes en 3416 cm^{-1} correspondiente al hidroxilo que aparece como resultado de la hidrólisis del acetilo en C-3 por acción del reactivo de Grignard (cloruro de metilmagnesio), también se observa una señal aguda en esta zona, característica de alcoholes terciarios en 3576 cm^{-1} correspondientes al hidroxilo en C-17, que se generó con la apertura del epóxido en C-16, C-17. El espectro de $^1\text{HRMN}$ presenta dos singuletes en 0.87 ppm (3H) y 0.98 ppm (3H) correspondientes a los metilos angulares C-18 y C-19, respectivamente; un doblete en 1.17 ppm (3H, $J=1.5\text{ Hz}$), asignado al metilo adicionado en C-16 β ; el doblete resulta del acoplamiento de este metilo con el protón en C-16. El singulete en 1.37 ppm (3H) corresponde al metilo alfa al dioxolano sobre C-20. En 3.5 ppm (1H) se presenta un multiplete perteneciente al protón base del alcohol en C-3. El multiplete en 4.0 ppm (4H) pertenece a los metilenos del grupo etilendioxi sobre C-20. Finalmente, en la zona de protones vinílicos se observa un doblete en 5.4 ppm (1H) asignado al protón vinílico en C-6. La siguiente reacción consistió en la hidrólisis del dioxolano del compuesto IX para regenerar el carbonilo en C-20. Esta reacción se llevó a cabo mediante un reflujo moderado en medio ácido, vigilando el tiempo y la temperatura de la reacción, en virtud de la labilidad del alcohol terciario en C17 α , que por tener una configuración axial, fácilmente podría sufrir una reacción de eliminación en el medio ácido de la hidrólisis. Este compuesto hidrolizado obtenido X, se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la tabla 6. El espectro de IR de este compuesto denota una señal intensa en 1696 cm^{-1} asignada al carbonilo de la cetona, que se regeneró por la hidrólisis del cetal, también se observó una señal intensa en la zona de alcoholes en 3642 cm^{-1} , correspondientes a los grupos oxidrilos en C-3 β y C-17 α . Por otro lado, el espectro de $^1\text{HRMN}$ evidenció la ausencia del multiplete en 4 ppm que correspondía a los metilenos del dioxolano previamente hidrolizado. Los metilos en C-16 y C-18 aparecen como dos singuletes sobrepuestos en 1.1 ppm (6H), también se observa un singulete en 1.3 ppm (3H) correspondiente al medio angular C-19, en 2.1 ppm (3H) se presenta un singulete perteneciente al metilo C-21. Por otro lado, el multiplete en 3.5 ppm (1H) se asignó al protón base del alcohol en C-3; La señal en 5.3 ppm (1H) es característica para el protón vinílico en C-6.

El siguiente paso de la ruta sintética implicó la formación del sistema 4,6-dien-3-ona del compuesto XI, cetona conjugada que se obtuvo oxidando el alcohol en C-3 β . Esta reacción evitó pasos adicionales de síntesis que serían necesarios en caso de proceder primero a oxidar el sistema 5-en-3-ol mediante la oxidación de Oppenauer para formar la función 4-en-3-ona (40), y la posterior introducción de la doble ligadura en C-6 por una deshidrogenación con cloranilo (41,42). La reacción de bromación-dehidrobromación utilizada se implementó con bromo como agente oxidante, así como el carbonato de litio, base que abstrae el protón alílico en C-4, obteniéndose como producto el sistema deseado 4,6-dien-3-ona (40), llegando a un rendimiento del 85%. El compuesto oxidado que se obtuvo XI, y sus constantes físicas y espectroscópicas se enlistan en la tabla 7. La formación del cromóforo 4,6-dien-3-ona se confirmó por la presencia de un máximo de absorbancia en 284 nm. Por su parte, el espectro de IR denotó la existencia de dos señales en la zona de carbonilos, una de ellas en 1662 cm⁻¹ asignada al carbonilo α - β , γ - δ insaturado en C-3, y otro en 1702 cm⁻¹ correspondiente al carbonilo de cetona en C-20; Asimismo, se observa una señal en el área de alcoholes en 3498 cm⁻¹ asignada al hidroxilo en C-17 α . La ¹H RMN de este compuesto mostró señales asignables al compuesto esperado, dos singuletes en 0.7 ppm (3H) y 0.9 ppm (3H), fueron asignados a los metilos C-18 y C-19, respectivamente, así como un doblete en 1.1 ppm (3H, J=1.5 Hz) correspondiente al metilo en C-16 β . La señal intensa en 2.1 ppm (3H) se asignó al metilo en C-21. En el espectro se observa también una señal intensa en 3.9 ppm originado del dimetilsulfóxido (DMSO) empleado como disolvente para el compuesto. En la zona de protones vinílicos se registró una señal en 5.3 ppm (1H) perteneciente al protón vinílico en C-6, Un singulete en 5.6 ppm (1H) asignada al protón vinílico en C-4 y una señal muy desplazada a 6.2 ppm (1H, J=1.5 Hz) asignada al protón en C-7, el triplete observado con este desplazamiento se acopla con el protón en C-8 y la desprotección registrada es producto de la resonancia habitual de este sistema multiconjugado con la cetona en C-3.

El siguiente paso de la síntesis constituyó la esterificación del alcohol en C-17 α para obtener el compuesto 17 α -acetoxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona XII, reacción que se llevó a cabo mediante la formación *in situ* del anhídrido mixto con anhídrido trifluoroacético y el ácido acético (37,40). Esta reacción requirió de cuidados especiales en virtud de la acidez que se generaba con la producción del ácido trifluoroacético, capaz de catalizar la eliminación del alcohol terciario en C-17 α como agua o bien como ácido acético. Esta condición fue controlada regulando el tiempo de reacción, el cual resultó óptimo en 5 minutos, este momento se estableció considerando el máximo rendimiento del éster deseado y el mínimo de formación de productos secundarios. El éster acético esperado XII, se

identificó analizando sus propiedades físicas y espectroscópicas, tabla 8. El espectro de UV registró un máximo de absorbancia con λ_{max} de 283.3 nm, correspondiente al cromóforo de la cetona α - β -insaturada. El espectro de IR registro una señal intensa en la zona de carbonilos, en 1666.0 cm^{-1} característica de carbonilo de éster, que evidencia la reacción esperada. También se observa una señal de carbonilo de cetona en 1664 m^{-1} correspondiente a la cetona en α , β - γ , δ -insaturada en C-3; Asimismo, se distingue la desaparición de la señal del alcohol en C-17 α en la zona de hidroxilos. Por su parte, el espectro de $^1\text{HRMN}$ reflejó señales asignadas al compuesto esterificado, en 0.8 ppm (3H) y 1.1 ppm (3H), que presentan los singletes correspondientes a los metilos en C-18 y C-19 respectivamente. En 0.9 ppm (3H, $J=3 \text{ Hz}$) el doblete asignado al metilo en C-16 β , el singlete en 1.9 ppm (3H) es característico para el metilo en C-21 (3H). La señal intensa en 3.6 ppm es característica para los metilos del DMSO empleado para la disolución del compuesto; En la zona de los protones vinílicos se encuentra un singlete en 5.6 ppm (1H) asignado al protón en C-4. Finalmente el singlete en 6.2 ppm (2H) es característico para los protones en C-6 y C-7.

El siguiente paso de la ruta sintética constituyó la formación del epóxido en C6 α -C7 α XIII. La configuración alfa del epóxido resulta del impedimento estérico de los metilos angulares C-18 y C-19; Pese a todo, se obtiene un 5% del epóxido con configuración beta.; Sin embargo, la necesidad de la conformación alfa del epóxido para orientar la sustitución de C-6 en la reacción posterior, determinó el empleo del perácido sobre el peróxido. Esta reacción también sirvió para eliminar las impurezas acumuladas previamente. Se llevó a cabo la oxidación selectiva de la insaturación C-6 α -C-7 α mediante el reactivo del perácido m-cloroperbenzoico (MCPBA) (37,43,44). Esta reacción requirió condiciones anhidras extremas. El compuesto epoxidado XIII, y las constantes físicas y espectroscópicas se enlistan en la tabla 9. El espectro de UV evidenció la existencia de un máximo de absorbancia en λ_{max} de 239 nm, correspondiente al cromóforo de la cetona α - β -insaturada, así como la desaparición del cromóforo de la cetona mencionada, en 284 nm. El espectro de IR de este compuesto indica la presencia del carbonilo del éster en 1728 cm^{-1} y la señal intensa del alcohol en 3428 cm^{-1} , posiblemente indica la transformación del epóxido a un hidroxiéster. En tanto el espectro de $^1\text{HRMN}$ demuestra la presencia de un singlete en 0.8 ppm (3H) y otro en 1.1 ppm (3H) asignados a los metilos C-18 y C-19, respectivamente; así como el doblete en 1.4 ppm (3H) perteneciente al metilo en C-16 β . El triplete en 1.0 ppm (3H, $J=1.5 \text{ Hz}$) se asignó al metilo terminal del éster acético acoplado con el metilo en posición beta. El metilo en C-21 muestra un singlete en 1.9 ppm (3H). Se distingue un triplete en 2.3 ppm (2H, $J=2 \text{ Hz}$), perteneciente al metileno en posición alfa al éster acético. La presencia del epóxido se confirma

por las señales de dobletes en 3.3 ppm (1H, J=1.5 Hz) y 3.5 ppm (1H, J=1.5 Hz) correspondientes a los protones en C-7 β y C-6 β , respectivamente. En el área de los protones vinílicos se presenta un singulete en 6.1 ppm (1H) asignada al protón en C-4.

La última reacción de la ruta sintética, representó la inserción del halógeno bromo en C-6. El primer paso de esta reacción es la formación de la halohidrina que en el medio de la reacción se deshidrata y forma el compuesto final deseado 6-bromo-17 α -acetoxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona XIV. Esta reacción requirió modificaciones en la mezcla de reacción recomendada (37,45,46), ya que se identificó que un exceso de ácido bromhídrico da lugar a la formación de derivados bromados no deseados. La posición en C-6 del bromo resulta de la configuración alfa del epóxido XIII utilizado; En razón de que al representar una sustitución transdixil, es necesario que el nucleófilo se aproxime por la posición axial, siendo este el C-6. El compuesto bromado final XIV, se identificó mediante sus constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la tabla 10. El espectro de UV de este compuesto reveló la regeneración del cromóforo de la cetona $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ -insaturada con un máximo de absorbancia de 284 nm; en tanto que el IR indicó la presencia los carbonilos en C-3, C-20 y carbonilo de éster con 1660 cm⁻¹, 1690 cm⁻¹ y 1772 cm⁻¹, respectivamente. El espectro de ¹HRMN registró un singulete en 0.7 ppm (3H) correspondiente al metilo en C-18, el triplete en 0.9 ppm (3H) se asignó al metilo terminal del éster acético. La señal en 1.1 ppm (3H) corresponde al metilo en C-19. El metilo en C-16 β mostró un doblete en 1.4 ppm (3H, J=1.5 Hz), debido a la interacción con el protón en C-16. Los protones del éster acetoxi mostraron las siguientes señales: el metileno alfa al carbonilo dió en 2.3 ppm (2H, J=2 Hz), un triplete debido a la interacción con el metileno en C-3. El multiplete en 1.7 ppm (2H) corresponde a los protones en C-3, el metilo de C-4 dio un triplete en 1.0 ppm (3H, J=1.5 Hz) debido a la interacción con el metileno en C-3. El doble de dobles en 1.8 ppm (1H) se asignó al protón en C-8. Los protones en C-2 alfa al carbonilo en C-3 dieron una señal multiple en 2.5 ppm (2H). El singulete agudo en 2.0 ppm (3H) se asignó al metilo en C-21. En la zona de protones vinílicos se distinguen dos singuletes en 6.3 ppm (1H) y 6.6 ppm (1H), correspondientes a los protones en C-7 y C-4, respectivamente, desplazados a campo bajo como resultado de la influencia del bromo en C-6. Por otra parte, al discernir y evaluar los valores que se encuentran en la tabla 11 y los espectros de ¹³CRMN, y masas, permitieron dilucidar la identidad química del compuesto final.

Discusión y resultados de la actividad farmacológica “In Vitro”

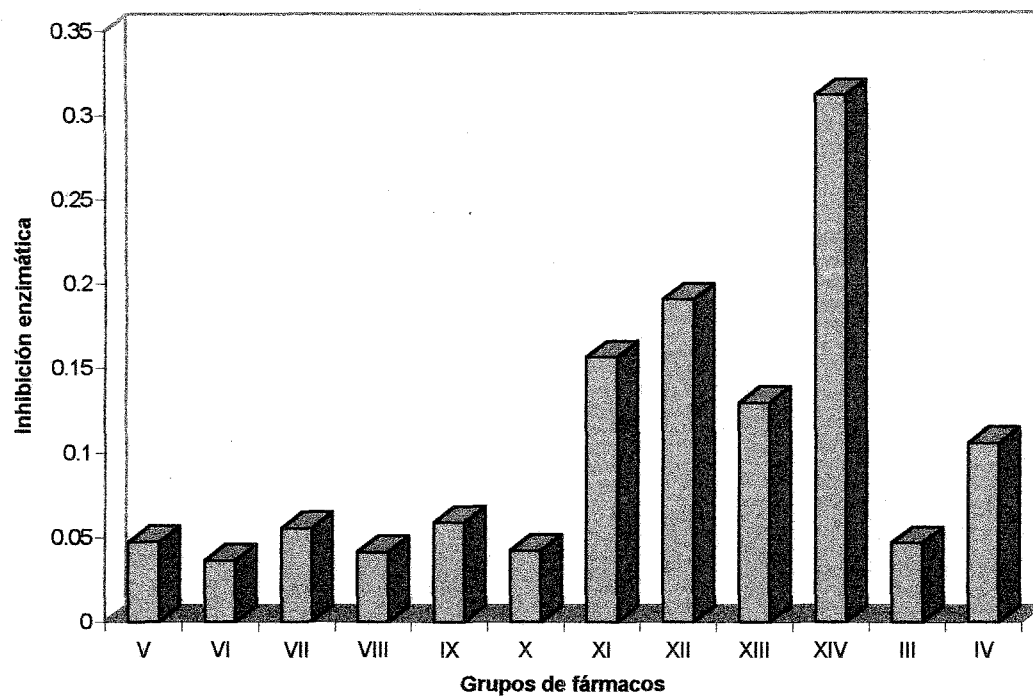
El estudio *in vitro* se realizó con todos productos de la síntesis (V-XIV), en próstata de ratas machos de la cepa Wistar, con un peso promedio al momento de la disección de 1.0 g, se empleó el extracto crudo de este órgano, en virtud de ser el principal sitio de biosíntesis de testosterona y andrógenos relacionados, evaluando la actividad de la enzima 5 α -reductasa como indicador bioquímico de actividad antiandrogénica (42).

En la gráfica 2 se observa el comportamiento que presentaron los fármacos sintéticos con posible actividad antiandrogénica. El valor mayor se presentó en el derivado bromado en C-6 XIV, el segundo lugar lo ocupó el compuesto acetilado en C-17 XII, el tercer sitio para el compuesto oxidado XI y el cuarto lugar para el compuesto epoxidado en C-6 y C-7, mientras que los demás compuestos intermediarios presentaron valores por abajo del finasterid **4**, entre estos se incluye a los compuestos V, VII y IX, todos los compuestos presentaron valores por arriba del 100%, mientras que el resto de compuestos VI, VIII y X presentaron valores que van de 20 a 50%, por abajo del mostrado por el acetato de ciproterona; todos los porcentajes presentados son con respecto al acetato de ciproterona **3**, usado como grupo control. Al realizar el análisis de Varianza (ANOVA), se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), entre los grupos de esteroides sintéticos y comerciales. Estos resultados sugieren que las modificaciones estructurales propuestas en los objetivos del presente trabajo, son adecuadas para lograr obtener compuestos sintéticos alternativos con actividad antiandrogénica potencial.

Por otra parte, es importante recalcar que los compuestos antiandrogénicos buscan los receptores esteroidales debido a su afinidad específica, pero estos también se fijan a otros receptores debido a su regulación por retroalimentación con el sistema nervioso central (47), esto desencadena diversas respuestas del metabolismo que están ligadas con mecanismos antioxidantes de los esteroides endógenos (48-50), lo anterior, es para hacer notar la probable participación de los antiandrógenos en el estrés oxidativo celular del sistema nervioso central, y que en el futuro serán evaluados.



QUÍMICA
D.E.P.G.



Gráfica 2. Evaluación de la inhibición enzimática de 5 α -reductasa en extracto crudo de próstata de ratas adultas (estudio *in vitro*), en presencia de nuevos fármacos esteroidales sintéticos y comerciales. Valores promedio. ($p < 0.05$)

Conclusiones

1. La ruta de síntesis sugerida resultó ser la mejor alternativa para la obtención del compuesto final XIV (6-bromo-17 α -acetoxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona).
2. En el estudio *in vitro* el derivado esteroideal sintético XIV 6-bromo-17 α -acetoxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona, demostró ser más activo que el acetato de ciproterona y el finasterid.
3. Los resultados de la evaluación *in vitro* del producto final y sus intermediarios, confirman la relación estructura actividad tomada como base, demostrando que la presencia del éster acético en C-17 α , el halógeno bromo en C-6, y las insaturaciones en C-4 y C-6 en la molécula esteroideal, aumentan la actividad antiandrogénica de los compuestos esteroideales sintetizados.

Bibliografía

1. Le HT, Schaldach CM, Firestone GL, Bjeldanes LF. Plant-derived 3,3'-Diindolylmethane is a strong androgen antagonist in human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278(23):21136-21145.
2. Rhodes L, Primka RL, Berman C, Vergult G, Gabriel M, Pierre-Malice M, Gibelin B. Comparison of finasteride (Proscar), a 5alpha reductase inhibitor, and various commercial plant extracts in *in vitro* and *in vivo* 5alpha reductase inhibition. *Prostate* 1993; 22(1):43-51.
3. Flores E, Bratoeff E, Cabeza M, Ramírez E, Quiroz A, Heuze I. Steroid 5alpha-reductase inhibitors. *Mini Rev Med Chem*. 2003; 3(3):225-237.
4. <http://www.salud.gob.mx>. Principales causas de mortalidad en hombres. Tumor maligno de la próstata.
5. Imperato-McGinley, J., Guerrero, L., Gautier, T., Peterson, R.E. *Science* 1974; 186:1213-1215.
6. Njar VC, Kato K, Nnane IP, Grigoryev DN, Long BJ, Brodie AM. Novel 17-azolyl steroids, potent inhibitors of human cytochrome 17alpha-hydroxylase-C17,20-lyase (P450(17)alpha): potential agents for the treatment of prostate cancer. *J Med Chem* 1998; 41(6):902-912.
7. Nnane IP, Kato K, Liu Y, Lu Q, Wang X, Ling YZ, Brodie A. Effects of some novel inhibitors of C17,20-lyase and 5alpha-reductase *in vitro* and *in vivo* and their potential role in the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 1998; 58(17):3826-3832.
8. Long BJ, Grigoryev DN, Nnane IP, Liu Y, Ling YZ, Brodie AM. Antiandrogenic effects of novel androgen synthesis inhibitors of hormone-dependent prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60(23):6630-6640.
9. De Coster R, Wouters W, Bruynseels J. P450-dependent enzymes as targets for prostate cancer therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 56(1-6):133-143.
10. Bruchovsky N, Wilson JD. *J Biol Chem* 1968; 243:2012-2021.
11. Anderson KM, Liao S. *Nature* 1968; 219:277-279.
12. Kovacs WJ, Griffin JE, Weaver DD, Carlson BR, Wilson JD. *J Clin Invest* 1984; 73:1095-1104.
13. Peterson RE, Imperato-Mcginley J, Gautier T, Sturla E. *Am J Med* 1977; 62:170-191.
14. Liang T, Cascieri MA, Cheung AH, Reynolds GF, Rasmusson GH. *Endocrinology* 1985; 117:571-579.
15. Flores E, Cabeza M, Quiroz A, Bratoeff E, García G, Ramírez E. Effect of a novel steroid (PM-9) on the inhibition of 5alpha-reductase present in *Penicillium crustosum* broths. *Steroids* 2003; 68(3):271-275.

16. Faredin I, Toth I, Oszlanczy J, Scultety S. In vitro study of rat prostate 5 α -reductase activity and its inhibition. *Int Urol Nephrol* 1992; 24(2):145-154.
17. Korner W, Vinggaard AM, Terouanne B, Ma R, Wieloch C, Schlumpf M, Sultan C, Soto AM. Interlaboratory comparison of four in vitro assays for assessing androgenic and antiandrogenic activity of environmental chemicals. *Environ Health Perspect* 2004; 112(6):695-702.
18. Hsia SL, Voigt WJ. *Invest Dermatol*. 1974; 62:224-227.
19. Robaire B, Covey DF, Robinson CH, Ewing LL. *Steroid Biochem* 1977; 8:307-310.
20. Hinkel A, Berges RR, Pannek J, Schulze H, Senge T. Cyproterone acetate in the treatment of advanced prostatic cancer: retrospective analysis of liver toxicity in the long-term follow-up of 89 patients. *Eur Urol* 1996; 30(4):464-470.
21. Werner S, Kunz S, Wolff T, Schwarz LR. Steroidal drug cyproterone acetate is activated to DNA-binding metabolites by sulfonation. *Cancer Res* 1996; 56(19):4391-4397.
22. Rabe T, Feldmann K, Heinemann L, Runnebaum B. Cyproterone acetate: is it hepato- or genotoxic?. *Drug Saf* 1996; 14(1):25-38.
23. Krebs O, Schafer B, Wolff T, Oesterle D, Deml E, Sund M, Favor J. The DNA damaging drug cyproterone acetate causes gene mutations and induces glutathione-S-transferase P in the liver of female Big Blue transgenic F344 rats. *Carcinogenesis* 1998; 19(2):241-245.
24. Cabeza M, Quiroz A, Bratoeff E, Murillo ME, Ramírez E, Flores G. Synthesis and pharmacological evaluation of 4-halo progesterone derivatives as antiandrogen. *Chem Pharm Bull* 1999; 47(9):1232-1236.
25. Cabeza M, Gutierrez E, Miranda R, Heuze I, Bratoeff E, Flores G, Ramírez E. Synthesis and pharmacological effect of 6-halo-16 beta-methyl-pregnane derivatives. *Proc West Pharmacol Soc* 1998; 41:87-88.
26. Ramirez E, Cabeza M, Heuze I, Gutierrez E, Bratoeff E, Membrillo M, Lira A. Synthesis and pharmacological evaluation of new 16-methyl pregnane derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2002; 50(1):15-20.
27. Fuhrmann U, Hess-Stumpp H, Cleve A, Neef G, Schwede W, Hoffmann J, Fritzemeier KH, Chwalisz K. Synthesis and biological activity of a novel, highly potent progesterone receptor antagonist. *J Med Chem* 2000; 43(26):5010-5016.
28. Bratoeff E, Ramirez E, Murillo E, Flores G, Cabeza M. Steroidal antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors. *Curr Med Chem* 1999; 6(12):1107-1123.

29. Bratoeff E, Trejo A, Hernández J, Sánchez P. Síntesis de derivados del pregnano con un grupo metilo en posición C-16. *Rev Mex Cienc Farmac* 1992; 22(6):14-18.
30. Soriano-García M, Ramírez E, Bratoeff E, Cabeza M, Aguirre-Hernández G. Crystal structure and Synthesis of 17alpha-(5-chlorovaleroyloxy)-16beta-methylpregna-4,6-diene-3,20-dione. *Anal Sci* 2003; 19(4):639-640.
31. Soriano-García M, Ramírez E, Bratoeff E, Cabeza M, Aguirre-Hernández G. Crystal structure and synthesis of 17alpha-acetoxy-4-bromopregna-4-ene-3,20-dione. *Anal Sci* 2002; 18(8):963-964.
32. Soriano-García M, Ramírez E, Bratoeff E, Cabeza M, Aguirre-Hernández G. Crystal structure and synthesis of 17alpha-hexanoyloxy-16beta-methylpregna-4,6-diene-3,20-dione. *Anal Sci* 2001; 17(10):1245-1246.
33. Soriano-García M, Ramírez E, Bratoeff E, Cabeza M, Aguirre-Hernández G. Crystal structure and synthesis of 17alpha-(5-bromovaleroyloxy)-16beta-methylpregna-4,6-diene-3,20-dione. *Anal Sci* 2001; 17(7):911-912.
34. Loken B, Kaufmann S, Rosenkranz G, Sondheimer F. *J Am Chem Soc* 1956; 78:1738.
35. Dauben H, Loken B, Ringold. *J Am Chem Soc* 1954; 76:1359.
36. Ringold HJ, Batres E, Bowers A, Edwards J, Zderic J. *J Am Chem Soc* 1959; 81:3485-3486.
37. Shapiro EL, Weber L, Harris H, Miskowics C, Neri R, Herzog HL. Synthesis and biological activity of 17-esters of 6-dehidro-16-methylene-17 α -hydroxiprogesterones. *J Med Chem* 1972; 15:716-720.
38. Jarman M, Barrie SE, Houghton J, Rowlands MG, Mann J, Haase-held M, Hatzis M. Evaluation of some 4-fluoro and 4-cyano derivatives of delta⁴-3-ketosteroids as inhibitors of testosterone 5 α -reductase. *J Enzym Inhib* 1994; 8(1):17-23.
39. Li J, Li Y, Son C, Brodie AM. Inhibition of androgen synthesis by 22-hydroximino-23,24-bisnor-4-cholen-3-one. *Prostate* 1995; 26(3):140-150.
40. Shapiro E, Legatt T, Weber L, Steinberg M, Watnick A, Eisler M, Gilmore M, Coniglio HC, Charney C, Oliveto EP. 16-Alkylated progesterones. *J Med Pharm Chem* 1962; 5:975-988.
41. Petrow V, Wang Y, Lack L. Prostatic Cancer. I. 6-Methylene-4-pregnen-3-ones as irreversible inhibitors of rat prostatic. Delta⁴-3 ketosteroids 5 α -reductase. *Steroids* 1981; 38(2):121-140.
42. Grower D. The role of cytochrome p-450 in steroidogenesis and properties of some of the steroid transforming enzymes. *Biochemistry of Steroids Hormones*, edit. Makin, H.L., Balckwell Sci. Pub. 2nd. Edition 1984:230-292.

43. Shering A. 6-chloro-16-alfa-methyl-4,6-pregnadien-17-alfa-ol-3,20-diona acetate, Belg patent 621,981 (1963), Chem Abs. 59:10186a.
44. Shering A. 1,2-alfa-16,17 alfa-dimethylenepregna-4,6-dienes, Brit patent 1,095,958 (1967), Chem Abs. 69: 27645a
45. Shibata K, Takegawa s. Antiandrogen I. 2-Azapregnane and 2-oxapregnane steroids. Chem Pharm Bull 1992; 40(4):935-941.
46. Akagi S, Tsuda K. Bromo derivatives of colesterol. Chem Pharm Bull 1961; 9:464-466.
47. Oh-ishi S. Pharmacological mechanism of action and development of anti-steroid hormones. Nippon Rinsho 1994; 52(3):679-684.
48. Chainy GB, Samantaray S, Samanta L. Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. Andrologia 1997; 29(6):343-349.
49. Vedder H, Anthes N, Stumm G, Wurz C, Behl C, Krieg JC. Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. J Neurochem 1999; 72(6):2531-2538.
50. Roof RL, Hall ED. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. J Neurotrauma 2000; 17(5):367-388.
51. García CR. Manual para el manejo de animales de bioterio. Unidad de Investigación en Salud Infantil, INP-SSA. México. 1992.
52. Castilla-Serna L. Estadística Simplificada para la Investigación en Ciencias de la Salud. 2º edición. Editorial Trillas. México, D.F. 1999.
53. Silverstein RM, Bussler GC, Morrill TC. Spectrophotometric Identification of Organic Compounds, 3rd Ed., John Wiley and Sons. Inc., USA. 1974.



BIÓL. FRANCISCO INCERA UGALDE

Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado

Presente

Me es grato informarle que el alumno **DAVID CALDERÓN GUZMÁN**, con número de cuenta 93807337 y expediente 5931089, presentará por segunda ocasión su examen para optar por el grado de Maestro en Farmacia (Química Farmacéutica), via **Examen General de Conocimientos** quien defenderá el proyecto de investigación titulado: **"Síntesis y evaluación farmacológica de compuestos antiadrogénicos"**, ante el siguiente jurado:

Presidente	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo	Instituto de Química, UNAM
Primer Vocal	Dr. Rafael Castillo Bocanegra	Facultad de Química, UNAM
Segundo Vocal	Dr. Guillermo Eduardo Delgado Lamas	Instituto de Química, UNAM
Tercer Vocal	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano	FES- Cuautitlán, UNAM
Secretario	Dra. María Isabel Aguilar Laurents	Facultad de Química, UNAM
Primer Suplente	Dra. María Josefa Bernad Bernad	Facultad de Química, UNAM
Segundo suplente	Dr. Samuel Enoch Estrada Soto	UAEM Morelos

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, D.F. a 01 de Marzo del 2006.

Atentamente.

DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS
Coordinador del Programa

c.c.p. Integrantes del Jurado
Interesado
Expediente
Sección Escolar de la Coordinación de Posgrados, Facultad de Química

Recibi Original
David Calderón Guzmán
01-210-06



Universidad Nacional Autónoma de México

Secretaría General

Dirección General de Administración Escolar

Unidad de Administración del Posgrado

CAAP

H i s t o r i a A c a d é m i c a

ALUMNO(A): CALDERON GUZMAN DAVID

Nº Cta.: 93807337

ENTIDAD : 5 FACULTAD DE QUIMICA

PROGRAMA : 470 MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS (FARM-QUIM-FARMACEU)

Año	Semes- tre	Enti- dad	Asig- natura	Grupo	Califi- cación	Crédi- tos	Folio	Nombre de la Asignatura	Nombre del Tema
1993	1	5	7007	0001	MB	6	1011438	FISICOQUIMICA AVANZADA	
1993	1	5	7008	0001	NP	10	1011440	QUIMICA ORGANICA I	
1993	1	5	7010	0001	NA	6	1011444	SEM TEM SEL DE FARMACIA I	
1993	2	5	7001	0001	MB	6	10104040	PRODUCTOS NATURALES	
1993	2	5	7004	0001	B	6	10104046	FARMACOLOGIA MOLECULAR	
1994	1	5	7005	0001	MB	8	10106621	LABORATORIO I	
1994	1	5	7008	0001	B	10	10106625	QUIMICA ORGANICA I	
1994	1	5	7011	0001	B	6	10106629	QUIMICA FARMACEUTICA	
1994	2	5	7002	0001	S	6	10110618	QUIM ORGANICA II	
1994	2	5	7003	0001	NA	4	10110619	SEM D TEM SEL D FARMACIA II	
1994	2	5	7006	0001	MB	13	10110626	LABORATORIO II	
1995	1	5	7009	0001	NP	9	10113281	ESPECTROSCOPIA I	
1995	1	5	7012	0003	MB	4	10113286	SEM TEM SEL DE FARMACIA III	
1995	1	5	7018	0001	MB	6	10113288	DISEÑO DE EXPERIMEN BIOLOGI	
1996	1	5	7009	0011	S	9	25207	ESPECTROSCOPIA I	
1996	1	5	9902	0001	AC	0	5	INGLES TRADUCCION	
1997	1	5	7003	0001	MB	6	10127876	SEM D TEM SEL D FARMACIA II	
1997	1	5	7010	T001	S	6	10127886	SEM TEM SEL DE FARMACIA I	MASAS
2005	2	5	9962	0001	AC	15	5	TESIS DE MAESTRIA	

Biól. Francisco Javier Incera Ugalde

Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado

Ciudad Universitaria D.F. a 1 de Marzo del 2006

Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

Coordinador del Programa de Posgrado de

Ciencias Químicas