



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Efecto de nuevos compuestos esteroidales como inhibidores de la**

**actividad de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

***BIÓLOGA***

**PRESENTA**

**MARISOL GUADALUPE BRAVO RUIZ**

**Directora de Tesis: Dra. Marisa Cabeza Salinas**

*Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco*

*Laboratorio de hormonas*

**Asesora Interna: M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez**

**Investigación financiada por CONACYT CB-2011/165049**

**México, CDMX.**

**06 de Junio de 2017**





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.

---

*An orchestra is a group of individuals harmoniously loyal to their higher control and playing with a common purpose towards a common end -the best possible interpretation of the piece of music in front of them. In the endocrine system is a group of individual organs, with much more complicated relationships and with controls which although complex, are yet unified, working with a common purpose toward a common end- the maintenance of homeostasis in the body.*

*Sir Douglas Hubble (1960) "The Fourth Langdon Brown Lecture on the Endocrine Orchestra".*

*"L' essentiel est invisible pour les yeux"*

(Saint-Exupéry A. 1900-1944)

---

## **Agradecimientos**

A la Dra. Marisa Cabeza Salinas por su confianza, conocimiento y permitirme ser parte de su equipo de investigación. Por ser un ejemplo profesional de dedicación y compromiso.

A la Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco por las instalaciones prestadas en especial al Laboratorio de Hormonas.

A la M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez de la Facultad de Estudios Superiores- Zaragoza por su conocimiento, asesoramiento, apoyo en este trabajo y durante todo el proceso.

A la Dra. Patricia Rosa Saucedo, la Dra. María Elena Ayala Escobar y la Dra. Juana Monroy Moreno por sus observaciones en este escrito.

A la Facultad de Química de la UNAM por los compuestos proporcionados para este estudio en especial al Dr. Eugene A. Bratoeff (Q.E.P.D.), al M. en C. Juan Francisco Cortés B., Mariana Garrido y José Gutiérrez.

A la MVZ Yvonne Heuze y su equipo de colaboradores de la UAM-X por su apoyo con los ejemplares del bioterio y el trabajo realizado en conjunto para la experimentación *in vivo*.

A la Q.F.B Isabel Moreno de la UAM-X por su apoyo en la experimentación *in vivo* y todo el conocimiento brindado.

A los integrantes de la UAM-X por hacer un momento agradable cada día.

A Blanquita Zavala de la UAM-X por hacer más fácil este proceso con su ayuda.

Al CONACYT por el financiamiento del proyecto CB-2011/165049.

---

## **Dedicatoria**

A mis padres Marta Ruiz y Javier Bravo por ayudarme a llegar tan lejos, apoyarme, y darme su confianza en cada meta que me propongo. Por ser mi motivación y soporte para hacer lo que realmente quiero.

A mi hermano Andrés Bravo por ser el mejor, escucharme siempre, darme consejos y su apoyo incondicional.

A toda mi familia abuelos, tíos, primos, cuñada que de igual manera me han motivado y han contribuido con cada paso académico que he desempeñado.

A mis amigos Tania Márquez y Damián Acevedo que siempre han estado a mi lado en muchos momentos, por escucharme y aconsejarme en tantas ocasiones.

A mis compañeros de la facultad Mariell Morán, Karina López, Sarai Villeda, Christian Aguirre, Sarah Zenón y Victor Chávez por acompañarme durante 4 bellos años.

A mis compañeras de laboratorio Isabel Moreno, Angélica Gómez y Lucero Bautista por todo; su amistad, cariño, apoyo y conocimiento.

A mis amigos y profesores de la UAM X que son bastantes, y han estado en todo este proceso y han contribuido día a día para que logre dar este gran paso.

A mi pequeño sobrino Christopher Bravo por existir y hacerme muy feliz.

## CONTENIDO

1. Resumen .....	6
2. Introducción .....	8
3. Marco Teórico .....	9
3.1 Andrógenos .....	9
3.2 Eje hipotálamo- hipófisis- gonadal .....	10
3.3 Andrógenos suprarrenales .....	16
3.4 Testosterona y Dihidrotestosterona .....	21
3.5 Enzima 5 $\alpha$ - Reductasa .....	23
3.6 Glándula prostática.....	25
3.7 Hiperplasia prostática benigna .....	33
3.8 Cáncer de próstata .....	39
3.9 Estudios previos en inhibidores de 5 $\alpha$ -R.....	42
4. Planteamiento del problema .....	59
5. Hipótesis .....	59
6. Objetivo General .....	59
7. Materiales y métodos.....	60
8. Resultados .....	68
9. Discusión .....	77
10. Conclusiones .....	81
11. Perspectivas .....	82
12. Referencias.....	83

## 1. Resumen

La enzima 5 $\alpha$  Reductasa de tipo 2 (5 $\alpha$ R-2) se asocia con enfermedades androgénicas que aquejan al género masculino de edad avanzada, en las que se encuentran el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna (HPB). Ambas son consecuencia de la acumulación de la dihidrotestosterona (DHT), metabolito reducido que se forma a partir de la Testosterona (T) por acción de la 5 $\alpha$ -R. Esta acumulación genera la división celular de las células epiteliales y estromales de la glándula prostática, provocando un crecimiento de ésta, que puede llevar a complicaciones en el aparato urogenital o al desarrollo de un carcinoma metastásico.

En la actualidad existen algunos fármacos en el mercado como la finasterida y la dutasterida que disminuyen los síntomas de estas patologías, pero que generan en el paciente efectos secundarios como disfunción eréctil, ginecomastia, trastornos de la eyaculación y depresión, entre otros. El mecanismo de acción de estos fármacos es vía la inhibición de la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -R.

Varios estudios han demostrado que algunos derivados de pregnano tienen una actividad en el efecto antiproliferativo en diferentes líneas celulares de cáncer y en la inhibición de la 5 $\alpha$ -R.

Dadas las consideraciones anteriores, el objetivo de este estudio es el de contribuir a la búsqueda de un tratamiento farmacéutico analizando el efecto *in vivo* e *in vitro* de nuevos compuestos esteroidales, que puedan disminuir los efectos colaterales antes mencionados.

Por lo que se determinó la actividad biológica de diferentes derivados del pregnano **S3C-S7C**, **FBC7**, **FCB 11**, **FCB16- FCB32**, **AM3- AM7**, **AM10**, **AM12**, **JT1- JT6**, **PAC1-PAC3**, **PAC5**, **PAC8**, **PAC12**, **PAC13**, **PAC 17** y **PAC 18**, los cuales fueron sintetizados por el grupo del Dr. Eugene Bratoeff de la Facultad de Química de la UNAM.

Para demostrar la actividad *in vitro* de los esteroides como inhibidores de la 5 $\alpha$ -R2. Éstos se agruparon tomando en cuenta los grupos funcionales para lograr una relación entre su estructura y su actividad.

Posteriormente, se incubaron con diferentes concentraciones, se les agregó 2 nM de T marcada con tritio y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). La reacción se inició añadiendo una alícuota de la fracción membranal de próstata humana con actividad de 5 $\alpha$ -R-2.

---

Los compuestos resultantes de la reacción se extrajeron con diclorometano, aplicando el extracto obtenido a partir de este proceso, a una placa cromatográfica que más tarde se eluyó con una mezcla de solventes. Los compuestos radiactivos formados, se identificaron utilizando el Bioscan y comparándolos con su estándar de referencia.

Los resultados indicaron que los esteroides **S3C-S7C** son inactivos sobre la actividad de la 5 $\alpha$ -R2, por lo que se observó formación de DHT.

Mientras que **FCB25- FCB32, JT3, AM3- AM7, AM10** y **AM12** fueron activos como inhibidores de la actividad de la 5 $\alpha$ R-2.

De éstos compuestos activos *in vitro*, se escogieron 9 (**FCB16- FCB24**) para determinar su actividad farmacológica en hámsteres gonadectomizados y tratados con T. Se mantuvieron tres grupos de comparación: el primero tratado únicamente con el vehículo, el segundo con T y el tercero con T + finasterida.

Los hámsteres se sacrificaron a los 6 días de tratamiento y se midieron el diámetro de los órganos del flanco y además, se pesaron la próstata y las vesículas seminales. Se demostró que los compuestos **FCB16- FCB22** y **FCB24**, fueron activos *in vivo* y no mostraron toxicidad durante el tiempo de tratamiento.

Estos datos indican que **FCB16 - FCB22** podrían tener potencial terapéutico, para las enfermedades andrógeno-dependientes, ya que son activos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Con base en los resultados obtenidos se podría concluir que los derivados del pregnano con un grupo ceto en el C-3 pueden ser una clave para la interacción con la 5 $\alpha$ -R2, así como el doble enlace en el C-4 que es esencial para competir con el sustrato natural (la T) y el radical en C-17 que es importante para potenciar la actividad de inhibición y para darles una mayor vida media en el organismo.



---

## 2. Introducción

La T juega un rol importante en el desarrollo de la HPB y cáncer de próstata. El principal metabolito de la T es la DHT, un andrógeno que tiene mayor afinidad por el receptor que la misma T y otros andrógenos presentes en la próstata. La DHT estimula la proliferación de las células estromales y epiteliales de esta glándula (Yik *et al.*, 2004).

El cáncer de próstata es el segundo con más incidencias en el mundo después del cáncer de pulmón; se han estimado en más de un 30% en 100,000 casos y una mortalidad menor del 10% (GLOBOCAN, 2012). En México es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos con un 16% de incidencia (IMSS, 2013).

La HPB es un cambio patológico asociado a la edad y a la función del músculo detrusor, que ocurre en la próstata por una interrupción en el equilibrio normal entre los andrógenos y factores de crecimiento que estimulan la proliferación de las células estromales y epiteliales de este tejido (Campbell-Walsh, 2008), que provoca principalmente un alargamiento que puede llevar a una obstrucción uretral (Rij y Gilling, 2015). Su desarrollo y progresión depende de la presencia de andrógenos (Zhu y Sun, 2005). Los tratamientos actuales suelen tener efectos secundarios no deseados (Campbell-Walsh, 2008; Clark *et al.*, 2004; Roehrborn *et al.*, 2002; Smith, 2009).

La mayor parte de la DHT presente en la próstata se forma a partir de la de T por acción de la 5 $\alpha$ -R (Mendoza, 2008). El desarrollo de nuevos inhibidores de las enzimas que participan en las vías de síntesis de las hormonas esteroides y los antagonistas de los receptores a las hormonas esteroides podría mejorar las terapias actuales contra el cáncer (Silva-Ortiz *et al.*, 2015), por lo que, el objetivo de este trabajo es determinar el efecto *in vivo* e *in vitro* de nuevos compuestos esteroidales con tales efectos.

---

### 3. Marco Teórico

#### 3.1 Andrógenos

Los andrógenos promueven el balance positivo de nitrógeno,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y retención de  $\text{H}_2\text{O}$ . Estos efectos son más pronunciados en mujeres y niños que en varones adultos normales (Mendoza, 2008).

Pueden actuar a nivel de la membrana celular produciendo **respuestas rápidas** que se han caracterizado como mecanismos **no genómicos**. De esta forma, son capaces de estimular una cascada de eventos que desencadenan segundos mensajeros ampliamente descritos: por estímulo de las quinasas conocidas con las siglas MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos), mediante la activación de la tirosina quinasa; la estimulación de producción de AMPc (adenosín monofosfato cíclico), PKA (proteína quinasa A) y PKC (proteína quinasa C) que activarán la transcripción del receptor nuclear para andrógenos, eventos relacionados con la unión a proteínas G que incrementan los niveles intracelulares de calcio. La elevación de calcio unido a la calmodulina, induce la activación de la cascada de transducción de señales, incluyendo MAPK, PKA y PKC (Mendoza, 2008).

Los andrógenos se unen a un RA que está presente en el citoplasma de los tejidos diana para estas hormonas esteroidales. El complejo RA formado se transloca al núcleo celular, en donde se une al elemento de respuesta a andrógenos que se encuentra en el ADN (**respuesta genómica**). Una proteína activadora de la ARN-polimerasa presente en el núcleo se adhiere al complejo antes dicho y se transcribe el ARNm de los genes indicados por esta señal. El ARNm así codificado se transcribe en los ribosomas citoplasmáticos para la formación de proteínas que regulan las respuestas fisiológicas y los procesos de desarrollo dirigidos por los andrógenos (Mendoza, 2008).

### 3.1.1. Regulación de la secreción de andrógenos

La actividad androgénica encabezada por la T es producido principalmente en las células de Leydig en los testículos y se lleva a cabo vía eje hipotálamo-hipófisis- gonadal (Dorantes *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

En menor cantidad se secretan en la corteza suprarrenal dando lugar a la esteroidogénesis (síntesis de las hormonas esteroideas responsables de la diferenciación y la maduración sexuales). Su secreción se encuentra bajo control de la hormona adrenocorticotrópica hipofisiaria (Mendoza, 2008).

La secreción de andrógenos es necesaria para el desarrollo del fenotipo masculino, así como, la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis (generación de los gametos masculinos) (Dorantes *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

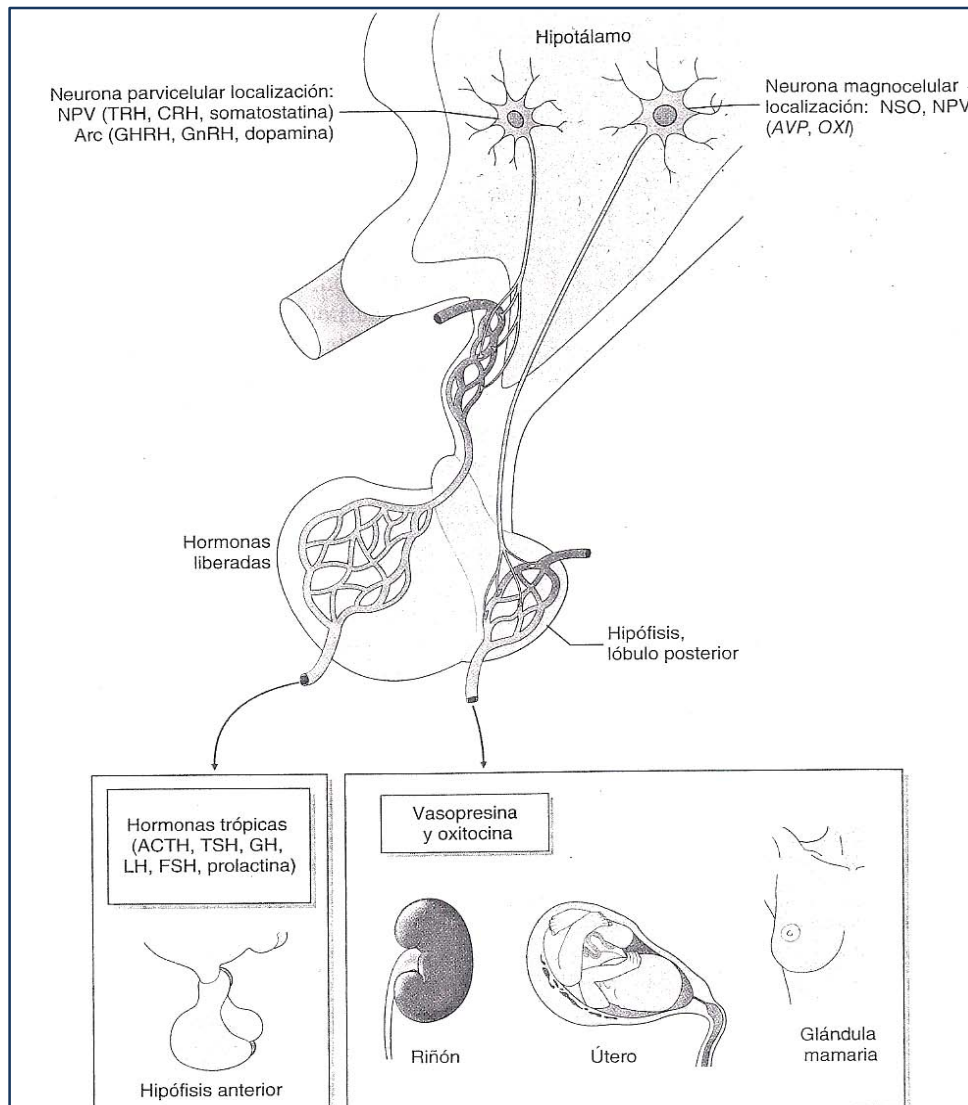
### 3.2 Eje hipotálamo- hipófisis- gonadal

El hipotálamo constituye un centro integrador esencial para la supervivencia de un organismo. Cada parte del sistema nerviosos central comunica con el hipotálamo y está sujeta a su influencia. Además, comunica con los órganos periféricos mediante señales enviadas por vía sanguínea y responde a sus estímulos aferentes (Arce, 2006). Se localiza entre el quiasma óptico, el tallo infundibular y los cuerpos mamilares; se sitúa en un plano dorsal respecto a estas estructuras. Su organización anatómica se puede dividir en tres áreas longitudinales y a su vez, en cuatro niveles o grupos nucleares dispuestos a lo largo del eje rostro-caudal del hipotálamo; estas divisiones longitudinales corresponde a las zonas conocidas como periventricular, medial y lateral (Arce, 2006; Yen *et al.*, 2002).

Al interior del hipotálamo se encuentran el sistema vascular de la lámina terminal, la eminencia media y el lóbulo posterior. Otras dos regiones, el área

postrema y el órgano subfornical, que tienen conexiones con los órganos periféricos. Las neuronas hipotalámicas ejercen esta regulación mediante la liberación de péptidos que alcanzan vasos y entran en la circulación sistémica. El tallo infundibular es esencial para esta regulación; a través de éste, los axones de las neuronas hipotalámicas alcanzan el lóbulo posterior de la hipófisis, mientras que los vasos sanguíneos infundibulares abarcan el lóbulo anterior de la hipófisis (Arce, 2006; Yen *et al.*, 2002).

Una gran variedad de neuronas parvocelulares constituyen parte del núcleo paraventricular y del núcleo arqueado. Estas neuronas son capaces de producir péptidos como la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), entre otras hormonas (**Figura 1**) (Arce, 2006; Yen *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Eje hipotálamo-hipófisis-órganos blanco. Neuronas del hipotálamo y hormonas secretadas. NPV, Núcleo paraventricular; TRH, Hormona liberadora de tirotropina; CRH, Hormona liberadora de Corticotropina; Arc, Núcleo arcuato; GHRH, Hormona liberadora de gonadotropinas; NSO, Núcleo supraóptico; ACTH; Hormona adrenocorticotropa; TSH; Hormona liberadora de somatotropina; GH, Hormona del crecimiento; LH, Hormona leutenizante; FSH, Hormona folículo estimulante (Tomada de Conti, 2010).

La hipófisis o glándula pituitaria está situada en una depresión de la cara superior del hueso esfenoides denominada silla turca o fosa hipofisiaria. En humanos, la hipófisis se divide en dos porciones: adenohipófisis y neurohipófisis. La primera constituye el 80% del total de la glándula y se divide a su vez en dos partes denominadas *pars distalis* y *pars tuberalis*. El conjunto del infundíbulo y la porción superior de la *pars tuberalis* conforma el tallo hipofisiario que constituye la unión anatómica entre la hipófisis y el hipotálamo. La mayor parte de los núcleos hipotalámicos implicados en el control de la secreción de hormonas adenohipofisiarias se localizan en la región supraóptica y en el hipotálamo medio. Los axones de estas neuronas proyectan sobre la eminencia media donde liberan las hormonas hipofisiotrópicas (Arce, 2006).

La adenohipófisis está conectada con el hipotálamo por medio de un complejo sistema vascular denominado sistema portal hipotálamo hipofisiario. Este sistema consta de dos plexos capilares conectados entre sí por los denominados vasos portales largos que recorren el tallo hipofisiario en sentido descendente. En el sistema porta hipotálamo-hipofisiario el flujo de sangre es de hipotálamo a la hipófisis (Arce, 2006)

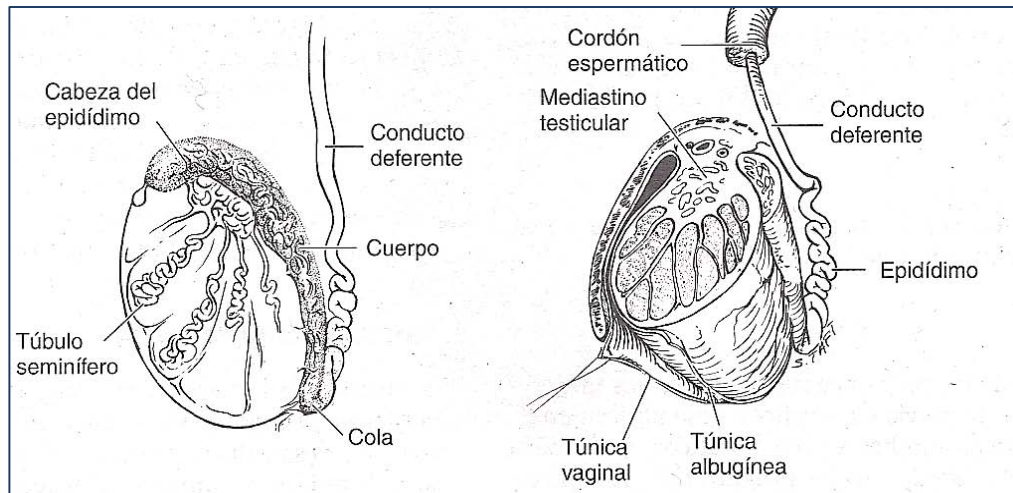
Esta disposición permite que los factores liberados en la eminencia media lleguen con facilidad a las células adenohipofisiarias. El denominado plexo primario se distribuye alrededor de la eminencia media, su función es recoger las

---

hormonas liberadoras por las terminales nerviosas que proyectan sobre esta región hipotalámica. Los capilares de este plexo primario confluyen hasta formar los vasos portales largos, que al llegar a la parte inferior del tallo hipofisario, se ramifican dando origen a la segunda red de capilares (el plexo secundario). El plexo secundario se distribuye en la parte distal de la adenohipófisis, permitiendo que los factores hipotalámicos se unan a sus receptores de membrana localizados en las células adenohipofisiarias. El plexo secundario es el encargado de recoger las hormonas producidas en la adenohipófisis para transportarlas a la circulación general (Arce, 2006).

La GnRH se une a sus receptores de membrana localizados en las células gonadotropas de la adenohipófisis y estimula la secreción de las gonadotropinas [hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH)]. Éstas son liberadas a la circulación y al llegar a los testículos se unen a sus receptores de membrana donde regulan la función de los testículos (Conti, 2010; Mendoza, 2008; Yen *et al.*, 2002).

Los testículos tienen forma cilíndrica, se extienden desde la membrana basal hasta la superficie luminal del túbulo seminífero. Entre las células de Sertoli adyacentes se establecen uniones herméticas que dividen la pared del túbulo en dos compartimentos que albergan células meióticamente activas cerca de la superficie luminal o espermatogonias en las proximidades de la membrana basal (**Figura 2**) (Patton y Thibodeau, 2013).



**Figura 2.** Corte transversal del testículo (Tomada de Smith, 2009).

Las uniones herméticas entre las células de Sertoli forman la barrera hematotesticular. Esta estructura aísla las células espermáticas en desarrollo que presentan antígenos de superficie activos distintos de los de las células somáticas del organismo en el sistema inmunitario. Si dichos antígenos escapan del epitelio del túbulo y pasan a la circulación sanguínea atravesando la membrana basal puede registrarse una reacción autoinmunitaria (Patton y Thibodeau, 2013).

En el curso de la vida fetal, junto a la hipófisis y a las gónadas, las neuronas hipotalámicas constituyen un eje funcional, activo aun después del nacimiento hasta los primeros años de vida (uno o tres años). En este punto, el sistema va hacia una fase de pausa funcional que muestra una actividad reducida (Conti, 2010).

La FSH estimula la síntesis de proteínas específicas de unión a andrógenos y la espermatogénesis en las células de Sertoli, mientras que la LH en las células de Leydig, la secreción de la testosterona por aumento de la síntesis de monofosfato de adenosina cíclico, que resulta del enlace del receptor con LH y la activación de la proteína G (Conti, 2010; Mendoza, 2008). Esta

---

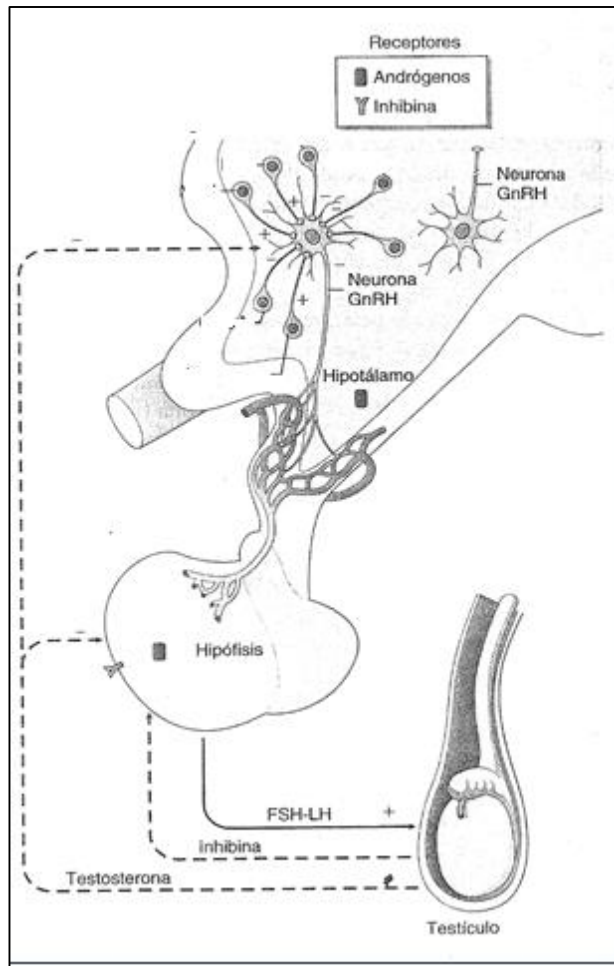
activación determina un incremento de la síntesis de colesterol y activación de la proteincinasa A, con conversión del colesterol en pregnenolona (Conti, 2010).

Cuando se alcanzan ciertas concentraciones de T en la sangre, ocurre un proceso de retroalimentación negativa de la secreción de LH por la adenohipófisis (Conti, 2010; Mendoza, 2008), como consecuencia de esto disminuye la liberación de LH. Cuando las concentraciones de T regresan a los valores normales, la GnRH vuelve a estimular a la adenohipófisis completándose el ciclo (Patton y Thibodeau, 2013).

Por otra parte, el aumento de las concentraciones de inhibina en la sangre, disminuye la secreción de GnRH por el hipotálamo y por consecuencia disminuye también la secreción de FSH, reduciéndose así la producción de espermatozoides. La inhibina es una hormona producida por las células de Sertoli de los testículos (**Figura 3**) (Patton y Thibodeau, 2013).

Las células de Sertoli sintetizan estrógenos, que están presentes en el líquido de los túbulos seminíferos y también es posible medirlas en el plasma sanguíneo. Sus funciones son la regulación de la espermatogénesis, la inhibición de la retroalimentación de FSH y LH y el favorecimiento de la conducta sexual (Patton y Thibodeau, 2013).



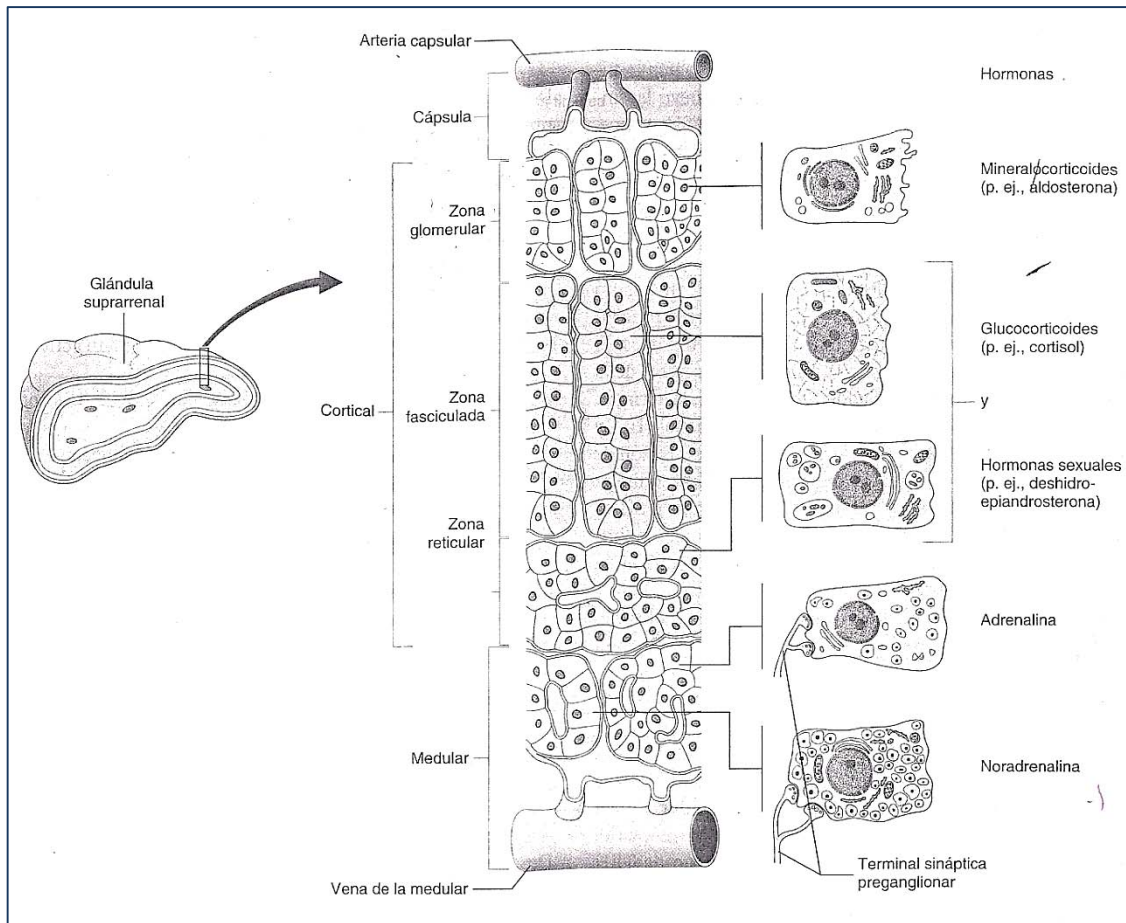


**Figura 3.** Eje hipotálamo- hipófisis- testículo (Tomada y modificada de Conti, 2010).

### 3.3 Andrógenos suprarrenales

Las glándulas suprarrenales, ubicadas encima del polo superior del riñón, se presentan en forma de pirámide y están formadas por dos unidades distintas desde el punto de vista morfológico y funcional: la corteza y la médula. En la corteza se reconocen tres zonas, que del exterior al interior son: la glomerular, la fasciculada y la reticular. La zona exterior delgada (glomerular) se caracteriza por células pequeñas con cursos tortuosos hasta organizarse en forma de glomérulos; en la zona subyacente a la anterior (fascicular), las células de dimensiones mayores con respecto a las anteriores, toman un aspecto bastante

regular; están dispuestas en columnas lineales y en sentido perpendicular con respecto a la cápsula. En la zona más interna (reticular) las células se organizan en cordones y tienen la típica disposición de red (Smith, 2009; Ross y Pawlina, 2008). Por su parte, las células de la médula suprarrenal están organizadas en grupos ovoides y cordones anastomados cortos sintetizan adrenalina y noradrenalina (Ross y Pawlina, 2008) (**Figura 4**).

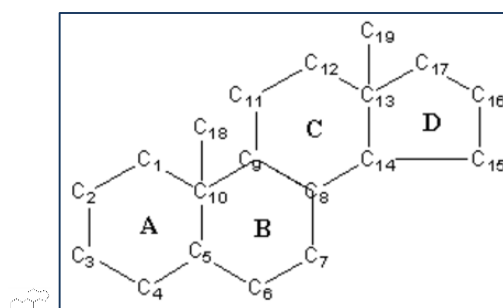


**Figura 4.** Anatomía de las glándulas suprarrenales (Tomada de Conti, 2010).

Las hormonas esteroideas son factores de transcripción que se forman en tejidos específicos; se dividen para su estudio en dos tipos: las hormonas sexuales y progestacionales, y las hormonas suprarrenales. Todas ellas se sintetizan a partir

del colesterol y requieren de la formación de un intermediario, la  $\Delta^5$ -pregnenolona para su síntesis en los tejidos diana (Devlin, 2004).

La estructura de las moléculas esteroides se integra a partir de varias uniones isoprenoides dando como resultado la formación del anillo ciclopentanoperhidrofenantreno (**Figura 5**). Esta estructura es químicamente muy estable y las células de los mamíferos no pueden catabolizarlo. La conversión de hormonas activas en formas menos activas o inactivas implica la alteración de los sustituyentes presentes en el esqueleto esteroideal más que de la alteración de esta estructura anular en sí (Devlin, 2004).



**Figura 5.** Anillo ciclopentanoperhidrofenantreno (Tomada y modificada de Smith, 2009).

El colesterol proveniente de la dieta se une a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la sangre y más tarde este complejo colesterol-LDL se une a los receptores presentes en células glandulares. Estas células expresan los enzimas encargadas de sintetizar las hormonas esteroides a partir del colesterol o de la Acetil-CoA (Koolman y Röhn, 2004).

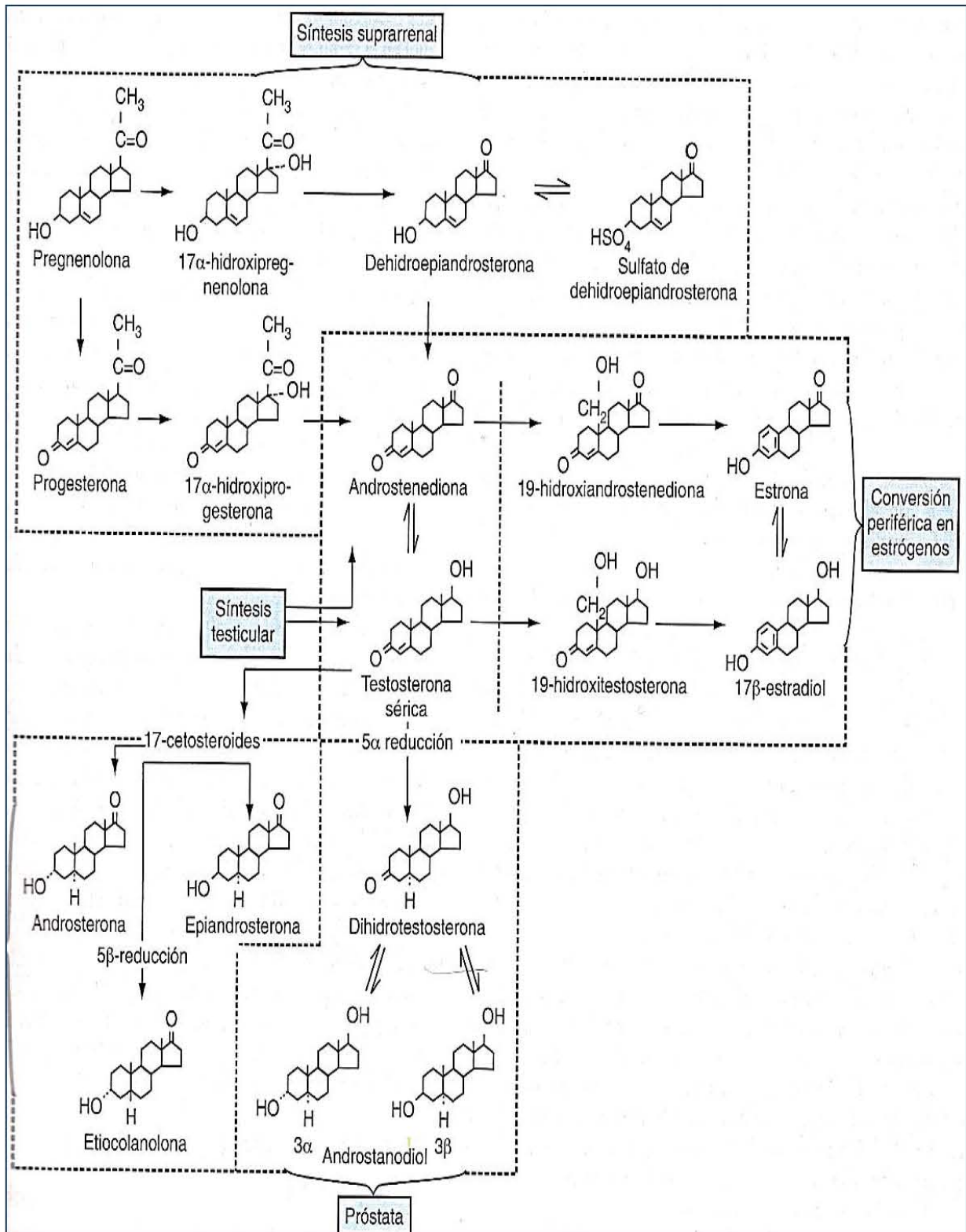
Las vías metabólicas por las que se producen las hormonas esteroides son reacciones de hidroxilación catalizadas por monooxigenasas específicas, hidroxilasas, de la familia citocromo P450. Además se producen hidrogenaciones y deshidrogenaciones dependientes del NADPH o del  $\text{NADP}^+$  así como reacciones de rompimiento de cadena e isomerizaciones. Los estrógenos son los únicos que poseen un anillo A aromático. La síntesis de este anillo es catalizada

---

por la enzima *aromatasa*; reacción en la que se pierde el grupo metilo angular (en el carbono 19) (Koolman y Röhn, 2004).

Un producto intermedio en la biosíntesis de las hormonas esteroides es la  $\Delta^5$ -pregnenolona, que salvo por su cadena lateral acortada y oxidada es idéntica al colesterol. La pregnenolona se forma en tres pasos por hidroxilaciones y un rompimiento en la cadena lateral. La deshidratación del grupo hidroxilo en el C-3 y el desplazamiento del doble enlace de C-5 a C-4 producen el gestágeno progesterona (Devlin, 2004).

En la síntesis del andrógeno testosterona a partir de la progesterona, se separa totalmente la cadena lateral. La ya mencionada aromatización del anillo A produce finalmente el estradiol (**Figura 6**) (Koolman y Röhn, 2004).



**Figura 6.** Síntesis y metabolismo de la testosterona (Tomada de Campbell-Walsh, 2008).

### 3.4 Testosterona y Dihidrotestosterona

La T es responsable de la libido el cual es un impulso o deseo sexual mediado por hormonas, que implica la coordinación y regulación de una serie de eventos que pueden calificarse de variada forma (Conti, 2010).

El efecto de la T se ve mediado por el RA, el cual es codificado por el gen *NR3C4*. Este receptor es una proteína que se localiza en el núcleo y citoplasma de las células de Leydig, en las células mioideas peritubulares, en el músculo liso de arteriolas y en el endotelio vascular (Herakec *et al.*, 2008).

La interacción de la T con su RA tiene la función de mantener la barrera hematotesticular durante la espermatogénesis así como la de facilitar la adhesión de las espermátidas a las células de Sertoli y la liberación espermática (Herakec *et al.*, 2008).

La concentración de T en la vena espermática es de 40 a 50  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ , unas 75 veces más, que el nivel detectado en el suero venoso periférico; de unos 600  $\text{ng}/100\text{ mL}$ . Otros andrógenos también salen por la vena espermática, androstanodiol, androstanodiona (3  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ), dehidroespiandrosterona (7 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ) y DHT (0,4  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ). Las concentraciones de estos andrógenos son muy inferiores en la vena espermática, respecto de la concentración de T, con valores menores al 15% de esta última (Campbell-Walsh, 2008).

El total de T que ingresa en el plasma se denomina tasa de producción de T sanguínea y en los seres humanos es de 6 o 7mg/día (Campbell-Walsh, 2008).

La concentración promedio de T en el varón adulto es de unos  $611 \pm 186$   $\text{ng}/100\text{ mL}$  con un rango normal de 300 a 1000 que equivale a 10,4 a 34,7  $\text{nmol}/\text{L}$ . Las concentraciones de esta hormona en el suero no muestran relación importante con la edad entre 25 y 70 años. Se sabe que la concentración plasmática de T tiene amplias variaciones en una persona durante un día

---

cualquiera y refleja variaciones episódicas y diurnas en la tasa de producción de este andrógeno (Campbell-Walsh, 2008).

El 2% del total de T sérica no está ligada en el plasma; lo que corresponde a una concentración de unos 15 ng/100 mL o menos de 1 nM. Esta T libre está disponible para su captación por el hígado y los intestinos, sobre todo para formar 17-cetosteroides. Los andrógenos metabólicos luego son secretados como 17-cetosteroides por la orina como conjugados hidrosolubles de glucorónido o sulfato (Campbell-Walsh, 2008).

Si bien la T es el principal andrógeno plasmático que induce el crecimiento de la glándula prostática y otros tejidos sexuales accesorios, también funciona como prohormona, dado que la forma más activa del andrógeno en la próstata no es la T sino la DHT (Campbell *et al.*, 2008; Smith, 2009).

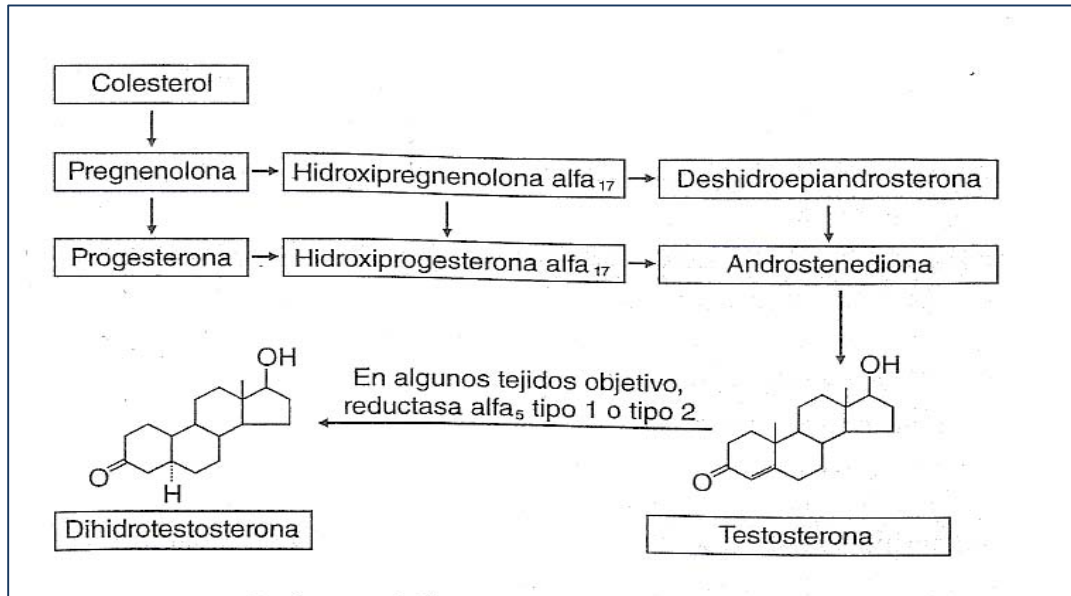
La concentración de DHT en el plasma de varones normales es baja, de 56±20 ng/100 mL, en comparación con la T que es 11 veces mayor (Campbell-Walsh, 2008).

Se ha observado durante la embriogénesis que la T es capaz de influir en la transformación en sentido masculino de los conductos de Wolff, la presencia de DHT es necesaria para la virilización de los genitales externos (Conti, 2010).

En el varón se observan picos neonatales de testosterona entre los 2 y los 3 meses de edad. Durante este periodo las concentraciones de testosterona en el suero aumentan hasta 60 veces los prepúberes normales (Campbell-Walsh, 2008).

El envejecimiento del varón se asocia a la disminución de la función testicular, con la disminución de la concentración de testosterona plasmática y del número de células de Leydig. Paralelamente, se observa el incremento en la concentración de LH y FSH plasmática, lo que indica la presencia de factores testiculares que afectan la producción de esta hormona. Este proceso no ocurre en todos los hombres y en los que se produce, existe una variabilidad interindividual (Cruz, 2012).

La baja concentración plasmática de T y su estrecha unión a proteínas del plasma disminuyen su importancia directa como andrógeno circulante que influye sobre el crecimiento de la próstata y la vesícula seminal. Pero al ser catalizado a DHT se es la principal forma de andrógeno hallado dentro de la glándula prostática (5 ng/g de peso neto de tejido) y es cinco veces superior a la T (Campbell-Walsh, 2008). **(Figura 7)** (Mendoza, 2008).



**Figura 7.** Formación de la DHT a partir de la T por la 5 $\alpha$ R (Tomada de Conti, 2010).

### 3.5 Enzima 5 $\alpha$ - Reductasa

La enzima 5 $\alpha$ -R está presente en muchos tejidos, incluyendo la próstata, las neuronas del hipotálamo anterior y los huesos. Esta enzima cataliza la conversión de T a DHT (Yik *et al.*, 2004).

Las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -R son proteínas microsomales dependientes del NADPH que reducen el doble enlace presente entre la posición C-4 y C-5 de los esteroides de 19 y 21 carbonos (Beato, 1989). Tanto en humanos como en animales, existen dos tipos de isoenzimas de la 5 $\alpha$ -R, la de tipo 1 (*codificada por*



el gene *SRD4A1*) y la de tipo 2 (codificada por el gene *SRD5A2*). Las mutaciones presentes en el gene que codifica para la isoenzima tipo 2 disminuyen la actividad enzimática lo que puede causar la presencia pseudohermafroditismo en varones desde el nacimiento (Zhu y Sun, 2005).

La isoenzima tipo 2 tiene su actividad máxima a un pH ácido, cuando se realizan ensayos enzimáticos, mientras que el tipo 1 muestra un pH óptimo alcalino (Anderson *et al.*, 1991).

Al nacer, la isoenzima de tipo 1 se detecta en hígado y piel no genital, y está presente durante toda la vida; sin embargo su expresión en tejidos embriogénicos es baja. En los adultos, se expresa en la piel no genital, hígado y ciertas regiones del cerebro; mientras que su presencia es baja en la próstata, piel genital, epidídimo, vesícula seminal, testículo, adrenales y riñón (Thigpen *et al.*, 1993).

La isoenzima de tipo 2 se expresa en tejidos externos genitales tempranos en la gestación. En los adultos, esta expresión en próstata, piel genital, epidídimo, vesícula seminal e hígado es relativamente alta, y baja en otros tejidos. También aparece expresada en el ovario y folículos del cabello (Eicheler *et al.*, 1994).

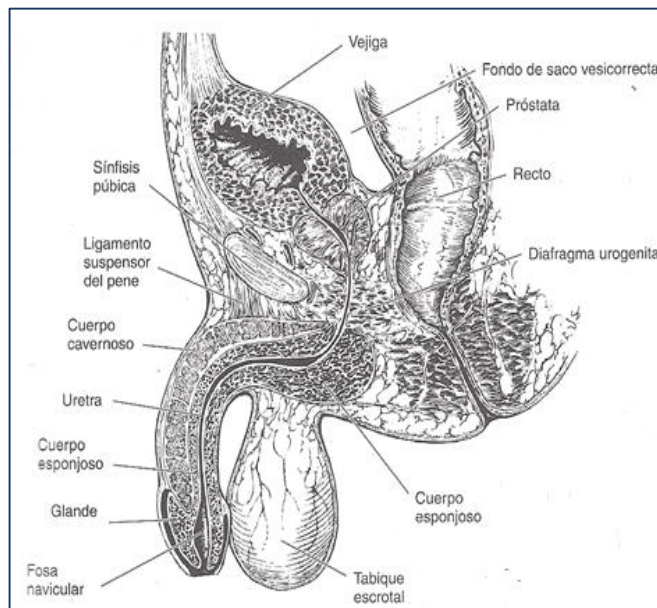
Recientemente con el desarrollo del análisis de perfil de expresión génica de amplificación de genoma, se identificó un tercer isotipo de la enzima 5 $\alpha$ -R en las células de cáncer de próstata hormono-refractario (“HRPC” por sus siglas en inglés). Esta enzima también convierte la T a DHT en células de HRPC en una forma similar que la enzima tipo 1. Su función se ha descrito como una enzima ubiquitinizadora; está presente en tejidos humanos como el páncreas, cerebro, líneas celulares de cáncer de próstata, piel y tejido adiposo (Aggarwal *et al.*, 2010)

En la próstata humana, ambas isoenzimas (tipo 1 y 2) se han identificado tanto en las células epiteliales como en las estromales. También están presentes en algunas patologías andrógeno-dependientes como en la HPB (Silva-Ortiz *et*

*al.*, 2015), y en células tumorales de próstata; tanto benignas como malignas (Zhu y Sun, 2005).

### 3.6 Glándula prostática

Es un túbulo alveolar que se localiza inmediatamente por debajo de la vejiga y que tienen forma de rosquilla (**Figura 8**). El hecho de que la uretra pase a través del pequeño orificio del centro de la próstata tiene una notable significación clínica en el caso de la HPB. Secreta un líquido acuoso, de aspecto lechoso y ligeramente ácido que constituye el 30% del volumen del líquido seminal. El citrato que se encuentra en el líquido prostático sirve como nutriente para los espermatozoides. Otros componentes son enzimas como la hialuronidasa y el antígeno prostático. El líquido prostático desempeña una importante función en la activación, la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides (Patton y Thibodeau, 2013).



**Figura 8.** Aparato reproductor masculino (Tomada de Smith, 2009).

### **3.6.1 Tipos de células prostáticas**

El epitelio prostático humano se compone de dos tipos principales de células, las células epiteliales y las células del estroma. El compartimiento epitelial de la próstata consiste en células madre, células epiteliales basales, células amplificadoras transitorias, células neuroendocrinas y células epiteliales secretoras luminarias con diferenciación terminal. Por su arquitectura, el compartimiento estromal tiene función de sostén estructural y consiste sobre todo de tejido conectivo, células musculares lisas y fibroblastos (Campbell-Walsh, 2008).

El estroma no celular y el tejido conjuntivo de la próstata componen lo que se denomina la sustancia basal y la matriz extracelular que desempeñan un papel importante en la función y la enfermedad de la próstata. Durante mucho tiempo se ha reconocido que la matriz extracelular es uno de los componentes importantes inductivos durante el desarrollo normal de muchos tipos diferentes de células en la próstata (Campbell-Walsh, 2008).

El desarrollo y el mantenimiento de la anatomía normal zonal de la próstata tienen lugar a través de la morfogénesis tisular dependiente de andrógeno y es regulada en los procesos que incluyen la diferenciación, la proliferación y la apoptosis de las células epiteliales. La comunicación a través de numerosas interacciones extracelulares está dirigida al citoesqueleto intracelular y luego a la matriz nuclear, la cual en última instancia regula diversas funciones celulares de transcripción que controlan el tamaño y la forma de la célula, la motilidad celular, el recambio y la proliferación, así como la diferenciación de las células epiteliales (Campbell-Walsh, 2008).

### 3.6.2 Implicaciones de la 5 $\alpha$ -R en la próstata

Las glándulas sexuales accesorias difieren en su origen embrionario y el tipo de esteroides que inducen su crecimiento (Campbell-Walsh, 2008).

Los conductos de Wolf se transforman en vesículas seminales, epidídimo, conducto deferente ampolla y conducto eyaculador, y el crecimiento de este grupo de glándulas es estimulado por la T fetal y no por la DHT. El crecimiento de las glándulas sexuales accesorias deriva de la 13<sup>a</sup> semana. La próstata recién aparece y empieza a formarse a partir del seno urogenital durante el tercer mes del desarrollo fetal y es dirigido sobre todo por la DHT. Esta última es producida por conversión metabólica de la T fetal por acción de la 5 $\alpha$ -R que se localiza del seno urogenital (Campbell-Walsh, 2008).

Se forman cinco brotes epiteliales apareados sobre el lado posterior del seno urogenital, a ambos lados del colículo seminal, y luego invaden el mesénquima para formar la próstata. Los pares de brotes superiores forman la zona interna de la próstata y parecen tener origen mesodérmico; los brotes inferiores forman la zona externa de la próstata y en apariencia tienen origen endodérmico. Estas dos zonas evolucionan como círculos concéntricos alrededor de la uretra. Los largos conductos ramificados ubicados en el exterior de esta zona forman la gruesa capa externa de la glándula prostática. La porción central de la próstata contiene glándulas mucosas y submucosas y los conductos eyaculadores así como los pequeños remanentes del conducto de Müller; el origen del pequeño utrículo prostático. La próstata está bien diferenciada hacia el cuarto mes del desarrollo. Forma acinos y conductos colectores por ramificación de la uretra; el crecimiento tiene lugar en las puntas, a medida que los conductos se extienden y se ramifican durante el desarrollo (Campbell-Walsh, 2008).

Hacia los tres meses y medio de desarrollo fetal (14 semanas), la próstata ha desarrollado unas 70 estructuras de conductos, rodeadas por componentes del estroma que se originan a partir de los mesénquimas mesonérfico y

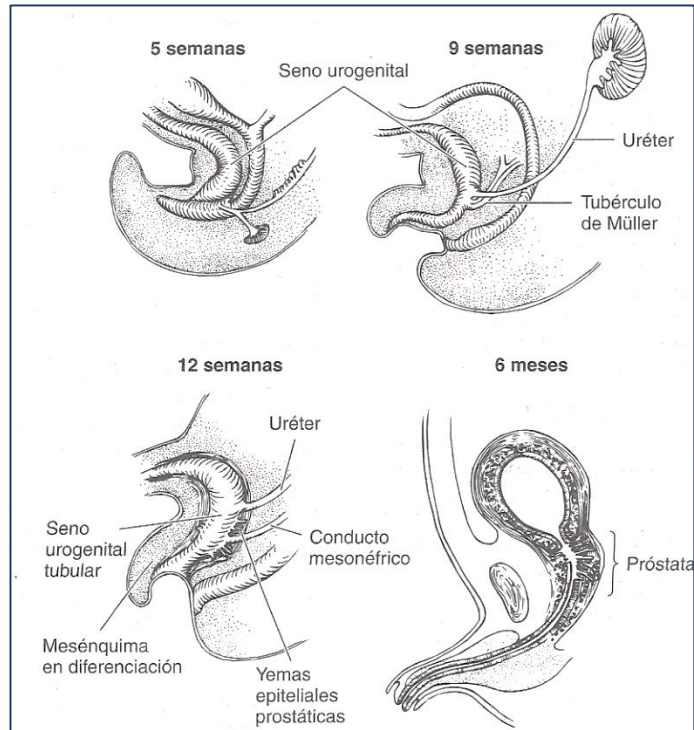
---

paramesonefrico. A las 5 semanas de desarrollo comienza a aparecer una extensa metaplasia de células pavimentosas y de las secreciones correspondientes después del nacimiento conduce a la disminución del tamaño de la próstata fetal a los 3 meses de vida. Durante el desarrollo intrauterino el feto depende de los andrógenos formados por las células de Leydig que se activan durante el segundo mes de gestación y alcanzan un pico al cuarto mes (Campbell-Walsh, 2008).

Durante el desarrollo a partir del seno urogenital hay una estrecha interacción recíproca entre los componentes tisulares del estroma y epiteliales. El epitelio y el mesénquima producen DHT a partir de T. Para el desarrollo adecuado de esta glándula se requieren los RA del mesénquima (Campbell-Walsh, 2008).

Se ha sugerido que tiene lugar una acción recíproca, por la cual la DHT es generada en las células epiteliales y se difunde al RA en los núcleos del estroma de las células mesenquimáticas, las cuales luego producen un factor de inducción desconocido que impulsa la morfogénesis de las células epiteliales. Se cree que esto ocurre en parte debido a la inducción, por DHT, de factores de crecimiento solubles específicos tales como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de queranocitos, los factores de crecimiento similar a la insulina, el factor de crecimiento de fibroblastos y los factores de crecimiento transformador, además de alteraciones de los componentes insolubles de la matriz extracelular que se encuentran en la interfaz de las células del estroma y epiteliales (Campbell-Walsh, 2008).

Al nacer, la mayoría de los acinos prostáticos están revestidos por epitelio que se caracteriza por una extensa metaplasia pavimentosa. Se cree que la estimulación del desarrollo posnatal está bajo el control de esteroides maternos residuales tales como los estrógenos y hay una fase de involución prostática posnatal que se observa durante los primeros 5 meses posteriores al nacimiento (**Figura 9**) (Campbell-Walsh, 2008).



**Figura 9.** Diferenciación del seno urogenital en los hombre (Tomada de Smith, 2009).

### 3.6.3 Factores de crecimiento en la próstata

Los factores de crecimiento (**Cuadro 1**) se fijan a receptores específicos que son proteínas transmembrana, en donde la porción intracelular del receptor posee actividad enzimática que es activada por la unión del receptor al factor de crecimiento. Una vez fijados, estos factores de crecimiento pueden formar dímeros u oligómeros, o de otro modo alterar su topología de manera que estimulan la internalización o un conjunto de señales de segundos mensajeros que inician una cascada de efectos posteriores (**Figura 10**). Estas señales incluyen la activación de proteincinas (tipo A y C), fosfolipasas de membrana (tipo A, B o C) que convierten los lípidos en señales y vías de proteína como Ras, Rho o Rac (Campbell-Walsh, 2008).

---

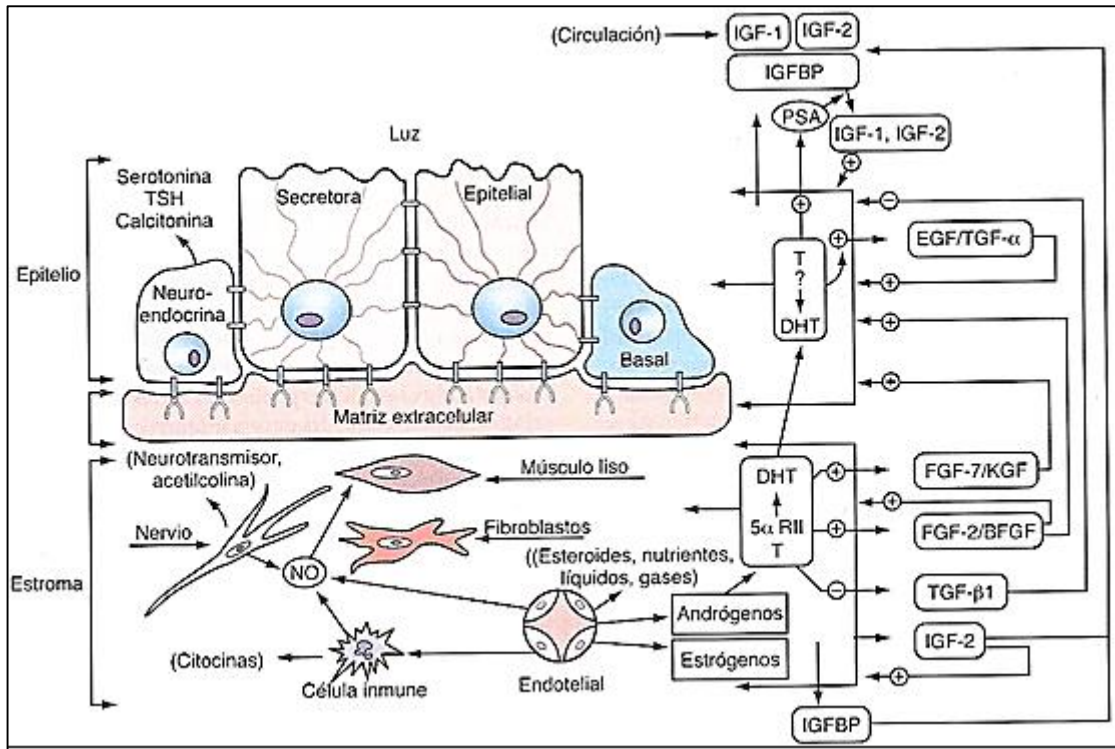
La T juega un rol importante en el desarrollo de la HPB y cáncer de próstata. El principal andrógeno prostático es la DHT e induce la hiperproliferación de las células estromales y epiteliales en la próstata. Las complejas interacciones entre las citocinas y los factores de crecimiento de diversas fuentes, quizá células inflamatorias infiltradas, pueden ser una de las causas del desarrollo de estas enfermedades (Aggarwal *et al.*, 2010).



**Cuadro 1.** Propiedades de los factores de crecimiento (Tomada de Campbell-Walsh, 2008)

Abreviatura	Nombre	Tamaño	Comentario
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico (factor de crecimiento prostático, factor de crecimiento endotelial, factor de angiogénesis tumoral, factor osteoblástico) Oncogén <i>int-2</i> relacionado	155 aminoácidos 17,6 kD  27 kD	Presente en la próstata normal Elevado en la hiperplasia prostática benigna En tejidos de origen mesodérmico, elementos del estroma La expresión en exceso produce hiperplasia epitelial prostática, pero no hiperplasia glandular en ratones transgénicos
EGF	Factor de crecimiento epidérmico; urogastrona	Cadena única de 67 kD	Controvertido en próstata humana normal, pero elevado en cáncer Frecuente en la próstata ventral de rata
TGF- $\alpha$	Factor de crecimiento transformador $\alpha$ 30% similar a EGF, no relacionado con TGF- $\beta$	5,6 kD	Concentraciones bajas en la próstata humana La expresión en exceso en ratones transgénicos causa hiperplasia epitelial
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento de transformador $\beta$ Dos genes (1 + 2), tres combinaciones, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3	25 kDa	Inhibidor de crecimiento epitelial Estimula el crecimiento de fibroblastos TGF- $\beta$ 2 elevado en hiperplasia prostática benigna Relacionado con MIS y con inhibina y activina
MIS	Sustancia inhibidora de los conductos de Müller	Dímero de 140 kD con dos unidades idénticas de 70 kD	Causa represión de los conductos de Müller
IGF	Factor de crecimiento símil insulina 1 y 2 Familia de somatomedinas	Cadena única de 7,5 kD	Relacionado con proinsulina
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	Dímero de 30 kD	Mitógeno para las células del tejido conjuntivo





**Figura 10.** Se muestra los tipos de interacciones entre el estroma y el epitelio sobre la transferencia y la regulación de información dentro de la próstata. La T y los factores de crecimiento interactúan sobre el estroma y las células epiteliales y entre ellas. La producción de los factores es estimulada o inhibida por los andrógenos. Los factores pueden actuar sobre la misma células o diferentes. Se forma óxido nítrico (NO) en las células nerviosas epiteliales y prostáticas: neuroendocrinas, secretoras y basales. IGF, Factor de crecimiento símil insulina 1 y 2; IGFBP, Factor de crecimiento símil insulina unido a proteína; PSA, Antígeno prostático específico; EGF, Factor de crecimiento epidérmico; TGF, Factor de crecimiento transformador; FGF, Factor de crecimiento de fibroblastos; KGF, Factor de crecimiento de queranocitos; BFGF, Factor de crecimiento de fibroblastos básico. (Tomada de Campbell-Walsh, 2008).

### 3.7 Hiperplasia prostática benigna

El alargamiento de la próstata puede llevar a una obstrucción uretral (Rij y Gilling, 2015) y debido a esto, tiene una considerable morbilidad. Evidencias histológicas informan que esta enfermedad la padecen un 50% de hombres a los 50 años y un 90% de ellos a los 80 años. Su desarrollo es dependiente de andrógenos ya que no ocurre en hombres castrados en la pubertad (Zhu y Sun, 2005).

Contribuye al desarrollo de síntomas del tracto urinario inferior debido a la disfunción del detrusor inducida por la obstrucción, junto con alteración de la función del sistema nervioso y la vejiga relacionadas con el envejecimiento (Campbell *et al.*, 2008), lo que afecta su llenado (frecuencia, urgencia, nocturia) y vaciado (disminución de la frecuencia del chorro miccional, uso de prensa abdominal, chorro intermitente, residuo elevado) (Cruz, 2012). El cuadro sintomático asociado en general se conoce con el nombre de prostatismo (Campbell-Walsh, 2008).

Existe una estrecha relación de los síntomas del tracto urinario con la disfunción sexual que no ha quedado dilucidado fisiológicamente, pero se ha sugerido que estén implicadas con el óxido nítrico, la hiperactividad autonómica, la actividad rho- cinasa y la arteriosclerosis pélvica (Cruz, 2012).

La HPB se caracteriza por el aumento de las células epiteliales y del estroma en el área periuretral de la próstata. En condiciones normales la neoformación de glándulas epiteliales sólo se observa durante el desarrollo fetal y es la base del concepto del despertar del potencial inductivo de las células del estroma. Es posible que el aumento sea consecuencia de la proliferación de las células epiteliales del estroma, o de una alteración del proceso de muerte celular programada que conduce a una acumulación de células, donde participan andrógenos, estrógenos y neurotransmisores; sea de forma aislada o mediante acciones conjuntas (Campbell-Walsh, 2008).

Aunque los andrógenos y los factores de crecimiento estimulan la proliferación celular en modelos de experimentación, el papel de la proliferación

---

celular en el desarrollo de la HPB del ser humano aún no se ha dilucidado por completo. Los andrógenos no sólo son necesarios para los procesos de proliferación y diferenciación celulares normales de la próstata sino que además inhiben en forma activa el proceso de muerte celular (Campbell-Walsh, 2008).

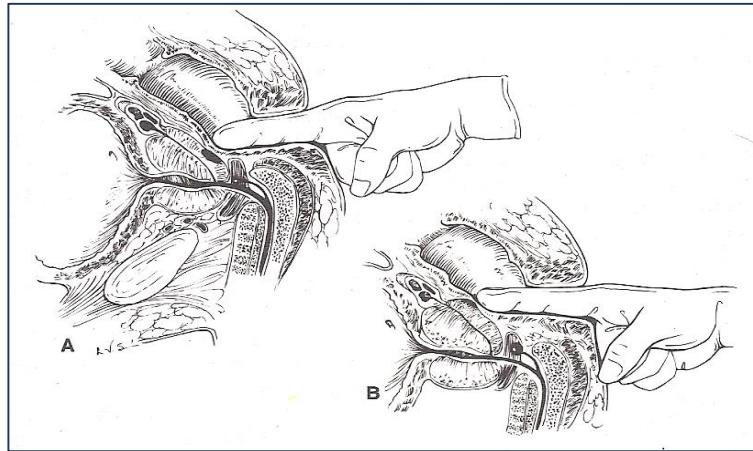
La HPB puede considerarse una enfermedad de las células troncales. Se presume que rara vez se dividen en la próstata pero cuando ello sucede darán origen a un segundo tipo de célula de proliferación transitoria capaz de sintetizar DNA y proliferar, lo que mantendría constante la cantidad de células en la próstata. Una vez que las células proliferativas maduran mediante un proceso de diferenciación terminal se mantienen viables durante un lapso determinado y luego experimentan un proceso de muerte celular programada. El proceso de envejecimiento bloquearía este proceso de maduración con una reducción de la progresión hacia el estadio de diferenciación terminal y la disminución resultante de la tasa de muerte celular global (Campbell-Walsh, 2008).

La velocidad del aumento de volumen glándulo estromal de la próstata es variable en cada persona, lo mismo que la relación entre volumen prostático y obstrucción (Michel y Vrydag, 2006).

Un mayor volumen glandular en general se asocia a un mayor nivel de obstrucción, pero no existe una relación matemática entre ambas entidades. Por otro lado, tradicionalmente se ha pensado que la existencia de crecimiento prostático en sí, no está relacionada a la presencia de síntomas y que las molestias relacionadas a este fenómeno estarían en su mayoría ocasionadas por la presencia de obstrucción, lo cual se ha puesto en duda cada vez con mayor énfasis. Vale la pena destacar que la expresión de RA $\alpha$  tanto prostáticos como del cuello vesical y otras ubicaciones se encuentra aumentada en pacientes con HPB, complementando la teoría anatómica con un factor bioquímico activo (Michel y Vrydag, 2006).

Se debe hacer una anamnesis detallada para identificar causas distintas de disfunción miccional o comorbilidades que pueden complicar el tratamiento; tacto rectal (**Figura 11**), así como examen neurológico focalizado, análisis de

orina, determinación del nivel sérico de creatinina, nivel sérico de antígeno prostático específico (Campbell-Walsh, 2008; Smith, 2009).



**Figura 11.** Diagnóstico diferencial de los ganglios prostáticos. A) Un área inflamada se levanta sobre la superficie de la glándula, la induración disminuye en forma gradual en su periferia. B) El nódulo canceroso no se levanta; existe un cambio abrupto de la consistencia de los bordes (Tomada de Smith, 2009).

El antígeno prostático específico (PSA) es una glucoproteína producida por el epitelio prostático en forma exclusiva, lo que lo ha distinguido como marcador no invasivo, sensible y específico de enfermedad de la glándula prostática, incluyendo el cáncer prostático, sin embargo la HPB así como la prostatitis también elevan el nivel del antígeno (Campbell-Walsh; 2008; Smith, 2009). Su medición está indicada en pacientes mayores de 40 años (con antecedentes familiares directos de cáncer de próstata y en todos aquellos mayores de 45 años) con HPB para el diagnóstico diferencial del cáncer prostático (Campbell-Walsh, 2008).

## 3.7.1 Tratamiento

### 3.7.1.1 Con bloqueantes $\alpha$ - adrenérgico

Se basa en la hipótesis de que la fisiopatología de esta afección se debe en parte a la obstrucción del tracto de salida vesical mediada por RA  $\alpha_1$  que están asociados con el músculo liso (Campbell-Walsh, 2008; Smith 2009).

Pueden clasificarse según la actividad por los distintos RA $\alpha$  y la vida media de eliminación. La eficacia de la fenoxibenzamina y la prazosina son similares, pero la segunda es mejor tolerada, lo cual implica que la eficacia y la toxicidad son mediadas por RA $\alpha_1$  y RA $\alpha_2$  (Campbell-Walsh, 2008; Smith, 2009).

Están implicados en multitud de procesos fisiológicos, incluyendo la contracción del músculo liso vascular, el control de la frecuencia e intensidad de la contracción cardíaca y el metabolismo hepático. En el tracto urinario inferior media la contracción del músculo liso prostático, la cual contribuye a la parte dinámica de la obstrucción infravesical de los enfermos con HPB. La contracción de estas fibras produce una disminución de la luz de salida de la vejiga, aparte del producido por el aumento del tamaño de la próstata. El mecanismo de acción de los RA $\alpha$  es el antagonismo competitivo de estos receptores en el cuello vesical y el tejido prostático, lo cual produce una relajación de este tejido y una menor resistencia a la salida de la orina (Cruz, 2012).

Son un tratamiento eficaz para la HPB, pero se han documentados efectos secundarios más frecuentes debidos a su uso como: mareo, cefalea, cansancio, hipotensión ortostática (incapacidad del cuerpo para regular la presión arterial rápidamente), rinitis y disfunción sexual (eyaculación retrógrada) (Cruz, 2012). Hoy en día los más utilizados son tamsulosina, alfuzosina, terazosina y doxazosina, pero también se encuentran en uso nadtopidil, prazosina, silodosina, etc. (Cruz, 2012).

### **3.7.1.2 Inhibidores de 5 $\alpha$ R**

Actualmente, se están comercializados dos inhibidores de la 5 $\alpha$ -R para el tratamiento de la HPB: finasterida y dutasterida. Actúan mediante la inhibición de la conversión de la T en DHT, de modo que disminuyen el volumen prostático y son responsables de mejorar el componente estático de la obstrucción infravesical. Finasterida inhibe la 5 $\alpha$ R-2, que causa una reducción de los niveles de DHT intraprostáticos en el 90% y los niveles plasmáticos en el 70%. Esta disminución en los niveles de DHT produce la disminución del volumen prostático al inducir la apoptosis y atrofia del tejido epitelial prostático (Cruz, 2012).

La dutasterida se caracteriza por ser un inhibidor 60 veces más potente de la 5 $\alpha$ R-1 manteniendo la misma capacidad de bloqueo de la de tipo 2. Las concentraciones de DHT plasmáticas, en el caso de dutasterida, se reducen en más del 90%, y la disminución del volumen prostático total es de casi 30% (Cruz, 2012). Los efectos colaterales son disfunción eréctil, disminución de la libido, ginecomastia y trastornos en la eyaculación (Chang *et al.*, 2002; Smith, 2009).

### **3.7.1.3 Tratamiento combinado**

La combinación de  $\alpha$  bloqueantes con la inhibición de la 5 $\alpha$ R inducen una mejora en la respuesta de los síntomas del tracto urinario pero existe el riesgo de presentar un mayor porcentaje de disfunciones sexuales, sobre todo de disfunción eyaculatoria (Cruz, 2012). Los pacientes que más se benefician son aquellos en los cuales es muy grande el riesgo basal de progresión, por lo general, los que tienen glándulas grandes y valores altos de PSA (Smith, 2009).

### **3.7.1.4 Fitoterapia**

El papel de la fitoterapia en la HPB no está muy definido. Existen en el mercado cerca de 30 compuestos distintos, entre ellos: la corteza *Pygenum africanum*, las raíces de *Echinacea purpurea* y de *Hypoxis rooperi*, el extracto de polen y las

---

hojas de álamo tembloroso, pero no se conoce aún el mecanismo de acción a través del cual actúan (Smith, 2009). El compuesto más utilizado es el extracto de *Serenoa Repens* y parece actuar a través de la inhibición de la 5 $\alpha$ R, el bloqueo androgénico intraprostático, tiene actividad agonista sobre los RA, altera el metabolismo del colesterol, inhibe la proliferación celular, tiene efecto antiinflamatorio, y ejerce un leve efecto en la disfunción eréctil (Cruz, 2012). La eficacia y seguridad de estos agentes no han sido probadas en estudios multicéntricos, aleatoria, doble ciego, controlados por placebo (Smith, 2009).

#### ***3.7.1.5 Ablación transuretral de la próstata con aguja***

Usa un catéter uretral diseñado especialmente que se introduce en la uretra. De la punta del catéter se despliegan agujas con radiofrecuencia intersticial que perforan la mucosa de la uretra prostática. El uso de la radiofrecuencia para calentar el tejido da por resultado necrosis coagulativa. Se presenta una mejoría subjetiva y objetiva en la micción (Smith, 2009).

#### ***3.7.1.6 Láseres***

Se realiza con una guía de ultrasonido transrectal. El dispositivo de la prostatectomía transuretral inducida por láser se coloca en la uretra y el ultrasonido transrectal se usa para dirigir el dispositivo mientras se recorre lentamente desde el cuello vesical al vértice generando necrosis de coagulación. Se utilizan dos fuentes principales de energía Nd: YAG y Holmium: YAG. (Smith, 2009)

La utilización del láser Holmium tiene como consecuencia una disfunción eyaculatoria superior al 33% (Cruz, 2008).

### ***3.7.1.8 Prostatectomía transuretral***

Tanto la intervención quirúrgica como la aparición de retención urinaria aguda representan dos hitos centrales en la progresión de la HBP. No obstante, hay diferencias claras entre ambos parámetros. La retención urinaria es un indicador que exige tratamiento y la cirugía representa una de las modalidades terapéuticas utilizadas con frecuencia (Campbell-Walsh, 2008).

La edad, el vaciamiento vesical incompleto y las modificaciones de la magnitud y la fuerza del chorro miccional se asocian de manera independiente con el riesgo de prostatectomía, al igual que la detección de un aumento del tamaño (Campbell-Walsh, 2008).

No se relaciona con un empeoramiento en la disfunción eréctil, ni se ha demostrado que exista una disminución del deseo sexual ni de la calidad de la vida sexual. Lo que sí es conocido y aceptado es que el porcentaje de pacientes con eyaculación retrógrada es superior al 80% (Cruz, 2012).

## **3.8 Cáncer de próstata**

El cáncer de próstata es un tumor maligno que empieza a crecer en la glándula prostática y que en sus etapas iniciales no presenta síntomas específicos. Más del 65% de todos los cánceres de próstata se diagnostican en hombres de más de 65 años (IMSS, 2013). Es el segundo con más incidencias en el mundo después del cáncer de pulmón, se han estimado más de un 30% por 100,000 casos y una mortalidad menor del 10% (GLOBOCAN, 2012). En México, es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos con un 16% de incidencia. Los datos más recientes publicados por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) indican una tasa de mortalidad de 13 defunciones por cada 100,000 hombres (IMSS, 2013).

La evolución natural del cáncer de próstata varía desde la enfermedad indolente asintomática durante toda la vida del paciente hasta el cáncer de alto



---

grado de agresividad que da metástasis rápidamente y lleva a la muerte con gran sufrimiento.

El factores de riesgo asociados a esta patología son la historia familiar, genética, andrógenos, eje del factor de crecimiento similar a la insulina, dieta, ácidos grasos, vitaminas antioxidantes (D), calcio, carotenoides y fitoestrógenos (Roos y Foster, 2007); actividad sexual, vasectomía temprana, tabaquismo, obesidad, consumo de alcohol (Campbell-Walsh, 2008).

El tacto rectal y la ecografía de la próstata aportan información acerca de la extensión del tumor primario. Los valores séricos de PSA, incluido el nivel total, la tasa de cambio, la densidad, el porcentaje de sus isoformas libres o en complejo (Campbell-Walsh, 2008; Smith, 2009).

### **3.8.1 Tratamientos**

#### ***3.8.1.1 Prostatectomía radical***

Es una operación técnicamente complicada, y por ello se han buscado tratamientos más simples para los estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo, ningún tratamiento ha reemplazado a la prostatectomía radical y sigue siendo el procedimiento de referencia porque la hormonoterapia y la quimioterapia nunca son curativas y no se pueden erradicar todas las células cancerosas mediante la radiación u otras formas de energía física, aun si el tumor está contenido dentro de la glándula (Campbell-Walsh, 2008). La preservación de uno ambos haces neurovasculares favorece el mantenimiento de la función eréctil en los hombres que son funcionales y sexualmente activos, pero si existe extensión extracapsular o preservación del fascículo neurovascular puede aumentar la probabilidad de que el tumor vuelva a aparecer (Smith, 2009).

### **3.8.1.2 Radioterapia**

Consiste en el uso de haces de radiación gamma (generalmente fotones) dirigidos a la próstata y los tejidos circundantes a través de múltiples campos. Para atenuar el daño de la vejiga y el recto por radiación, se ha desarrollado la radioterapia con forma tridimensional, en la que una computadora altera los haces de radiación focalizando la dosis de radiación hacia la región de la glándula prostática. La forma más avanzada de forma tridimensional, la radioterapia modulada por intensidad, permite localizar la dosis de radiación a campos geoméricamente complejo (Campbell-Walsh, 2008).

La mayoría de los pacientes en los que falla la radioterapia, independientemente del sitio de recurrencia, se maneja en la actualidad la privación de andrógenos. Aquellos con recurrencia local sólo pueden ser candidatos para la braquiterapia, criocirugía o prostatectomía radical. La morbilidad puede ser tan alta con estas formas de tratamiento como son sus recaídas consecuentes (Smith, 2009).

### **3.8.1.3 Braquiterapia**

Consiste en la implantación de fuentes radiactivas (semillas o agujas) directamente en la glándula prostática y en los tejidos circundantes, para llevar dosis elevadas de radiación al tumor sin afectar, en la medida posible, la vejiga y el recto (Campbell *et al.*, 2008).

### **3.8.1.4 Hormonoterapia primaria**

El tratamiento primario de supresión androgénica puede ser apropiado en pacientes mayores o con comorbilidades importantes que impiden un tratamiento curativo, o en pacientes que no desean un tratamiento curativo. Son escasos los

---

datos publicados de pacientes a los que se trató con hormonoterapia por cáncer de próstata clínicamente localizado (Campbell-Walsh, 2008).

Nunca es curativa, en muchos pacientes puede haber remisión a largo plazo. La orquiectomía bilateral y la administración de estrógenos han sido reemplazadas por análogos de la hormona liberadora de LH (LHRH). Los antiandrógenos producen menos disfunción sexual y osteoporosis, pero tienen un mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares. Ejemplos de estos fármacos son el acetato de ciproterona como molécula esteroidal y la flutamida y bicalutamida como no esteroidales (Campbell-Walsh, 2008).

Sin embargo, existen terapias de inhibición de la síntesis de andrógenos con análogos de la LHRH. Este tipo de terapias se conoce como castración química y se aplica como terapia anti cáncer para evitar la castración quirúrgica (Campbell-Walsh, 2008; Eisenberger *et al.*, 1998; Stricker, 2001). Otro tipo de aplicación de esta terapia es en los individuos acusados de violación, en donde este tipo de análogos disminuyen la concentración de T en sangre y por lo tanto, también la libido (Mendoza, 2008; Velázquez *et al.*, 2008). Entre estos análogos se encuentran: busarelina, goserelina, leuprolerina y triptorelina (Eisenberger *et al.*, 1998; Velázquez *et al.*, 2008).

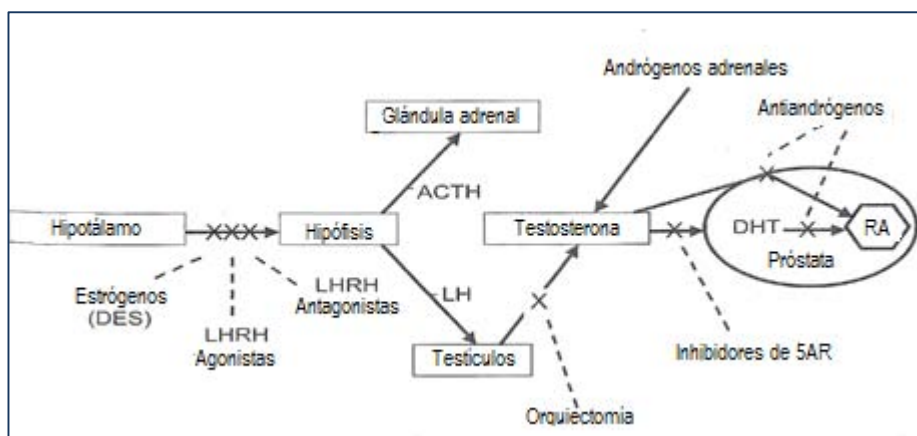
El desarrollo de nuevos inhibidores de las enzimas que participan en las vías de síntesis de las hormonas esteroidales y los antagonistas de los RA podría mejorar las terapias actuales contra el cáncer (Silva-Ortiz *et al.*, 2015).

### 3.9 Estudios previos en inhibidores de 5 $\alpha$ -R

Los tratamientos mencionados anteriormente (**Figura 12**) producen severos efectos colaterales, entre los que se encuentran la disminución de la libido, eyaculación retrógrada, aumento de la depresión, afecciones hepáticas, osteoporosis, colesterol, complicaciones vasculares, regresión de cáncer; algunas tienen vías de acción desconocidas y métodos invasivos (Campbell-Walsh, 2008; Clark *et al.*, 2004; Roehrborn *et al.*, 2002; Smith, 2009), por lo que

la búsqueda de mejores terapias sigue siendo un reto para los investigadores en química medicinal.

La inhibición de la conversión de T a DHT ha sido otro blanco terapéutico al que se le ha apostado en investigación (Castro-Magana *et al.*, 1996). La inhibición de la actividad de la 5 $\alpha$ -R ha producido algunas ventajas terapéuticas, pero hasta la fecha solamente dos fármacos de síntesis han sido aprobados por la U S Food and Drug Administration en los Estados Unidos: la dutasterida y la finasterida; ambos inhibidores selectivos de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -R como ya se mencionó antes. Sin embargo, como estos tratamientos tienen que ser a largo plazo también son capaces de producir efectos colaterales importantes (Clark *et al.*, 2004; Mendoza, 2008; Roehrborn *et al.*, 2002), lo que hace necesario identificar nuevos compuestos más potentes para poder disminuir el tiempo de tratamiento (Velázquez *et al.*, 2008).



**Figura 12.** Vías inhibidas durante el tratamiento de la HPB y cáncer de próstata. DES, Dietilestilbestrol; LHRH, Hormona liberadora de hormona leutenizante; ACTH, Hormona adrenocorticotrópica; LH, Hormona leutenizante; DHT, Dihidrotestosterona; RA receptor de andrógenos. Las líneas punteadas indican en lugar dónde va a ser inhibida la vía; X la anulación de la cascada por el tratamiento. (Modificada de Ross y Foster, 2007).

---

Tanto los estrógenos como la progesterona presentan actividad antiandrogénica, los estrógenos inhiben la secreción de gonadotropinas y la progesterona inhibe la actividad de la 5 $\alpha$ -R en los órganos blanco (Mendoza, 2008).

Los inhibidores de la 5 $\alpha$ -R son utilizados en el tratamiento de la HPB y ayuda en la reducción de la DHT en el suero, al incrementar las concentraciones de T y estradiol. Sus inhibidores disminuyen el nivel de DHT en próstata, la contracción prostática y el crecimiento prostático (Castro-Magana *et al.*, 1996). El uso de los inhibidores de esta enzima para el tratamiento de diversas patologías va en aumento (Kruep *et al.*, 2013).

Tres diferentes tipos de inhibidores pueden identificarse por mecanismos cinéticos de reducción de T: inhibidores tipo A que son competitivos con el cofactor (NADPH) y el sustrato (T) e interactúan dejando libre a la enzima; inhibidores tipo B los cuales son competitivos con el sustrato y el ajuste del complejo enzima- NADPH, y el inhibidor tipo C que tiene un mecanismo no competitivo en el ajuste enzima- NADP<sup>+</sup> contra el sustrato (Li *et al.*, 1995).

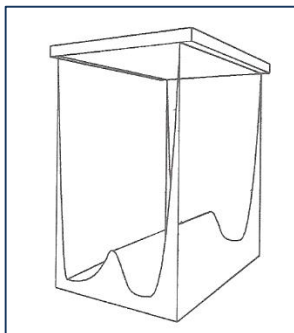
Los primeros inhibidores han sido diseñados por modificación de la estructura de sustratos naturales, incluyendo la sustitución de un átomo de carbono de los anillos de los esteroidales por un heteroátomo tal como el nitrógeno, formando así azaesteroidales (Alauddin y Martin-Smith, 1962).

Los estudios de inhibidores enzimáticos de la enzima 5 $\alpha$ -R se han realizado a partir de la técnica TLC (cromatografía de capa fina) (Arellano *et al.*, 2011; Braetoff *et al.*, 2008; Hiroshi *et al.*, 1995; Silva-Ortiz *et al.*, 2017), que ha sido utilizada para la separación cualitativa para mezclas simples (Jork *et al.*, 1990). La TLC es una técnica instrumental que ha adquirido gran importancia para el análisis de productos farmacéuticos, y de índole muy diversa, ya que reúne ventajas de la cromatografía en papel, y alguna de las de la cromatografía líquida en columna (Valls y del Castillo, 2002).

La disposición experimental es muy similar a la primera con la diferencia que en el de papel, como soporte de la fase estacionaria, se utiliza una capa fina

de un material absorbente tal como el gel de sílice. Interviene un proceso de absorción sobre el soporte sólido. Consiste en colocar en una placa, de 20x20 cm, una gota de solución de la muestra que se analiza y una vez que se seca, se sitúa en una cámara de vidrio bien cerrada (**Figura 13**), que contienen el eluyente, el cual fluye a través de la placa de sílice, pasando entre sus fibras por capilaridad (Jork *et al*, 1990; Valls y del Castillo, 2002).

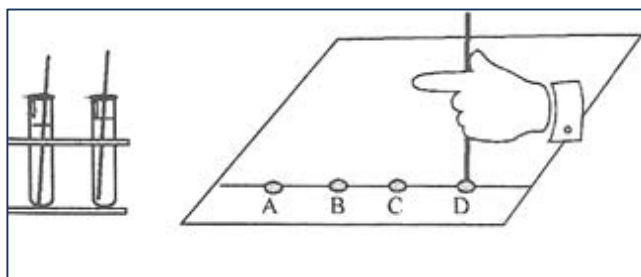
Puede considerarse que cada fibrilla de la placa, junto con la humedad retenida por la misma, constituye una célula elemental. La separación se produce por el reparto de las sustancias de la muestra entre la humedad retenida por las células y el líquido eluyente que las atraviesa. El agua retenida constituye la fase estacionaria, y el eluyente, que ahora se llama líquido de desarrollo constituye la fase móvil. Las sustancias muy solubles en el líquido de desarrollo ahora se moverán libremente con éste, en cambio las que son solubles en agua, son fuertemente retenidas por las células elementales (Jork *et al*, 1990; Valls y del Castillo, 2002).



**Figura 14.** Cámara de doble canal empleada en la elución (Tomada de Valls y del Castillo, 2002).

Antes de aplicar las muestras, se traza con un lápiz una línea recta paralela a uno de los extremos de la tira de la placa y a unos centímetros del mismo. Sobre esta línea se aplican las distintas muestras a distancias iguales, mediante un capilar o micropipeta, la cantidad óptima a aplicar es de unos 2-5 mm<sup>3</sup> de una solución diluida, realizando la aplicación en varias etapas cuando se precisen

volúmenes mayores, de forma que las manchas que se obtienen no tengan un diámetro superior a 5mm (**Figura 15**). Existen microjeringas de volumen variables que permiten la aplicación de volúmenes variables de muestra. La aplicación se realiza por desplazamiento y no por acción del capilar como en el caso anterior, se lleva la aguja del nanoaplicador a una distancia tal que el volumen de muestra entra en contacto con la superficie del absorbente evitando dañarla. Las manchas se llevan a sequedad evaporando el disolvente con una corriente de aire tibio (Valls y del Castillo, 2002).



**Figura 15.** Aplicación de las muestras en la placa (Modificada de Valls y del Castillo, 2002).

La afinidad relativa se expresa en cromatografía por el valor de retención ( $R_f$ ), que representa la relación entre la distancia recorrida por la sustancia y la recorrida por el frente del eluyente. Una vez que el eluyente ha recorrido la distancia suficiente, se saca la placa de la cubeta y se seca. Se revelan las distintas manchas obtenidas por diferentes procedimientos químicos, tales como la pulverización de una sustancia fluorescente sobre la placa, o a través de luz ultravioleta (Valls y del Castillo, 2002)

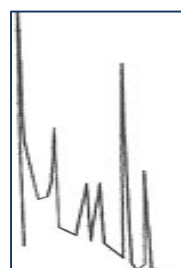
El laboratorio de hormonas de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco ha empleado el uso del Bioscanner AR-2000 (Silva-Ortiz *et al*, 2017), que puede ser de gran utilidad en el análisis de [ $^{18}\text{F}$ ] FDG puro,  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , en placas TLC, geles o bloques. En nuestro estudio se utilizó la T [ $^3\text{H}$ ]. El sistema contiene un contador digital directo y todos los radioisótopos incluidos en la

emisión de cationes. El equipo utiliza gas proporcional al conteo, que puede detectar todos los isotopos emitidos beta y gamma (Ecket y Ziegler, 2000).

El equipo AR-2000 (**Figura 16**) despliega el efecto de cada ensayo enzimático con los metabolitos obtenidos en la reacción T, DHT, androstendiol o androstendiona, en gráficos densitométricos (**Figura 17**) con base al  $R_f$  mediante el software Bioscan V3, por lo que son usados como estándares en la aplicación de cada placa de TLC (Braetoff *et al.*, 2008). Asimismo, permite la cuantificación de bajos niveles del analito disminuyendo los límites de detección para los distintos compuestos de la placa (Valls y del Castillo, 2002).



**Figura 16.** Bioscaner AR-2000.

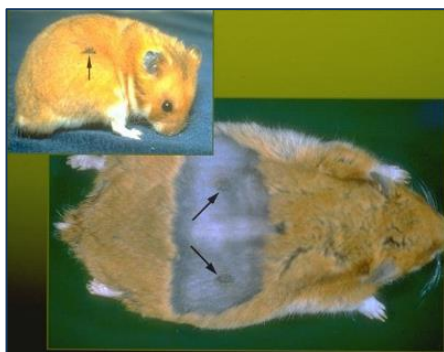


**Figura 17.** Análisis densitométrico

El modelo animal que se ha usado en ensayos dependientes de andrógenos ha sido el hámster (Vermoken *et al.*; 1980; Braetoff *et al.*, 2008; Arellano *et al.*, 2011; Silva-Ortiz *et al.*, 2017), debido al estudio de Vermorken y colaboradores (1980), quienes describieron el efecto antiandrogénico de varios compuestos, evaluando los órganos del flanco como un tejido andrógeno dependiente de estos animales. Este es un par de nódulos pigmentados que consiste en grupos de glándulas sebáceas grandes, cubiertas por la epidermis y que contienen pelos gruesos formando un complejo pilosebáceo. Se localizan en la superficie dorsal de la piel del hámster (**Figura 18**) (Takayasu y Adachi, 1972).



En hámsteres hembra el diámetro del punto pigmentado mide 2mm, mientras que en los machos es de 8mm. Estos nódulos se contraen después de la castración hasta que se asemejan a los nódulos de las hembras. Sin embargo, las inyecciones diarias o las aplicaciones tópicas de T o DHT restauran su tamaño original (Takayasu y Adachi, 1972). Estas glándulas pueden metabolizar la T a DHT tanto en animales intactos como gonadectomizados ya que la enzima 5 $\alpha$ -R está presente en este tejido. Además se ha utilizado como modelo para estudiar el metabolismo de los lípidos y la fisiología, para compuestos que podrían usarse como inhibidores de la producción de sebo (Cabeza *et al.*, 2012).



**Figura 18.** Órganos del flanco en hámster dorado.

Recientes estudios han demostrado que algunos derivados de pregnano tienen una actividad en el efecto antiproliferativo de diferentes líneas celulares de cáncer y la inhibición de la 5 $\alpha$ -R (Silva *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2017).

Con base a esto, se emplearon compuestos de nueva síntesis producidos por el grupo del Dr. Eugene Bratoeff de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La serie **S3C- S7C, AM, FCB, JT y PAC (Tablas 1-9)** fue propuesta por su efecto probado en el laboratorio de hormonas de la Universidad Autónoma de México unidad Xochimilco donde se había observado el efecto inhibitorio en la actividad de la 5 $\alpha$ R-1 y algunos habían tenido resultados esperados en RA. Al

---

probarse en el presente trabajo no tuvieron efecto en la 5 $\alpha$ R-2, por lo que no fueron probados *in vivo* como se había pensado.

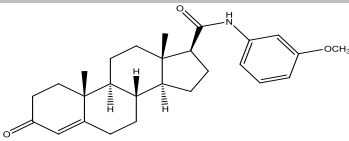
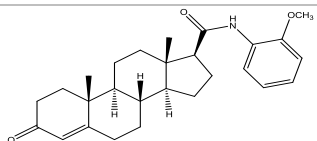
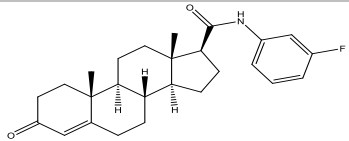
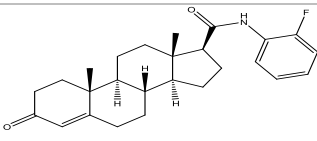
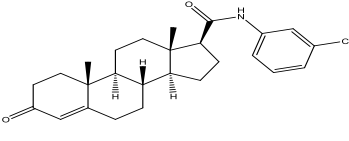
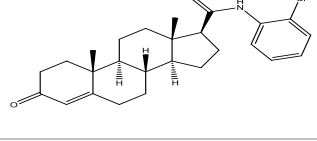
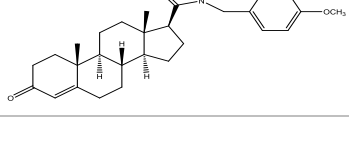
Al observar el efecto inhibitorios sobre actividad de la 5 $\alpha$ R-2 probado en el presente escrito de los compuestos **FCB16-FCB24 (Tablas 2-3)**.

Con la finalidad de comprender las interacciones moleculares entre los esteroides de nueva síntesis y su diana biológica (5 $\alpha$ -R2), los compuestos se agruparon con base en el grupo funcional presente en el C-17 (**Tablas 1-9**).

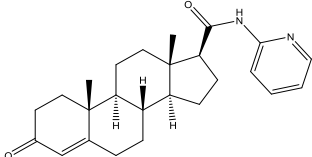
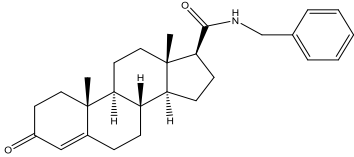
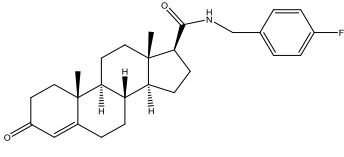
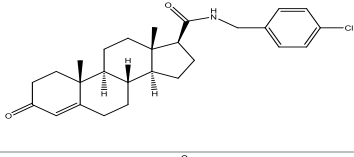
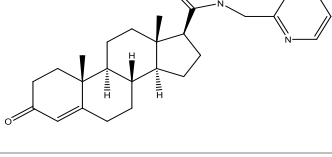
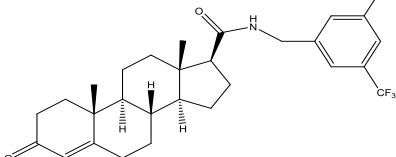
**Tabla 1. Compuestos esteroidales S3C –S7C.**

Nombre	Clave	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Estructura
17-(9 <i>H</i> -carbazol-9-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3-il ciclopropanecarboxilato	<b>S3C</b>	533	238-240	
17-(9 <i>H</i> -carbazol-9-il)-16-formilandrosta-5,16 dien-3-il ciclobutanecarboxilato	<b>S4C</b>	547	247-250	
17-(9 <i>H</i> -carbazol-9-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3-il ciclopentanecarboxilato	<b>S5C</b>	561	240-242	
17-(9 <i>H</i> -carbazol-9-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3-il ciclohexanecarboxilato	<b>S6C</b>	575	235-237	
17-(9 <i>H</i> -carbazol-9-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3-il cicloheptanecarboxilato	<b>S7C</b>	589	210-212	

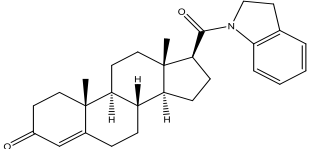
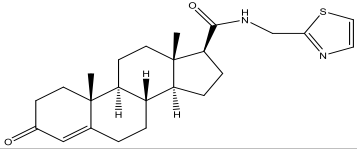
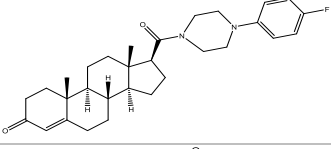
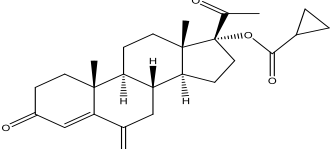
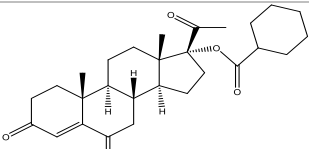
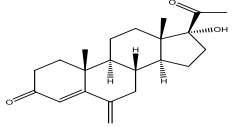
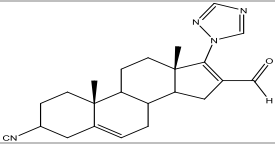
**Tabla 2.** Compuestos esteroidales **FCB16-FCB21**, **FCB24**.

Clave	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Estructura
<b>FCB-16</b>	421.57	93-95	
<b>FCB-17</b>	421.57	189-190	
<b>FCB-18</b>	409.53	225-226	
<b>FCB-19</b>	409.53	119-121	
<b>FCB-20</b>	425.99	139-141	
<b>FCB-21</b>	425.99	209-212	
<b>FCB-24</b>	435.59	212-214	

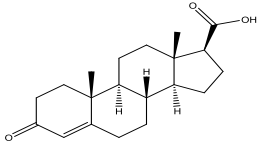
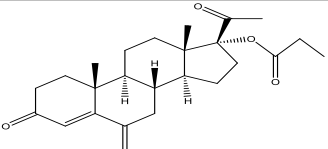
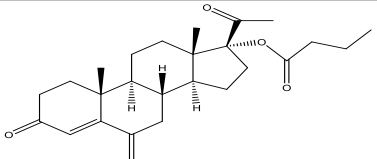
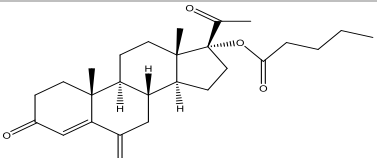
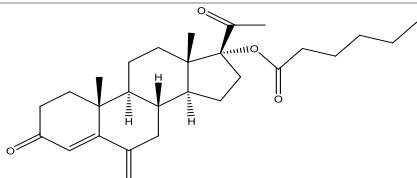
**Tabla 3.** Compuestos esteroidales **FCB22, FCB25-FCB29.**

Clave	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Estructura
<b>FCB-22</b>	395.53	199-201	
<b>FCB-25</b>	405.57	204-205	
<b>FCB-26</b>	423.56	196-198	
<b>FCB-27</b>	440.01	176-177	
<b>FCB-28</b>	406.56	195-196	
<b>FCB-29</b>	541.56	80-82	

**Tabla 4.** Compuestos esteroidales **FCB23**, **FCB30**, **FCB31**, **AM7**, **AM10**, **AM12** y **JT3**.

Clave	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Estructura
<b>FCB-23</b>	417.58	234-235	
<b>FCB-30</b>	412.59	195-197	
<b>FCB-31</b>	478.64	223-225	
<b>AM-7</b>	410.5	182-184	
<b>AM-10</b>	452.6	143-145	
<b>AM-12</b>	342.5	206-208	
<b>JT-3</b>	496.25	244-246	

**Tabla 5.** Compuestos esteroidales **FCB32, AM3-AM6.**

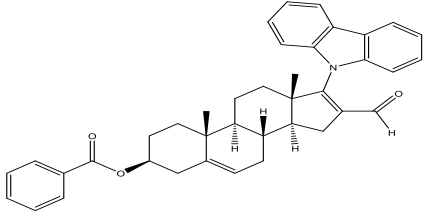
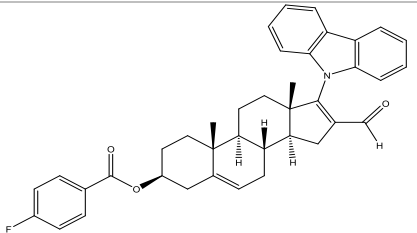
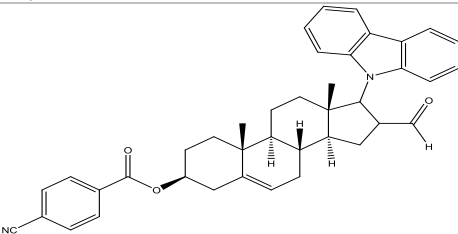
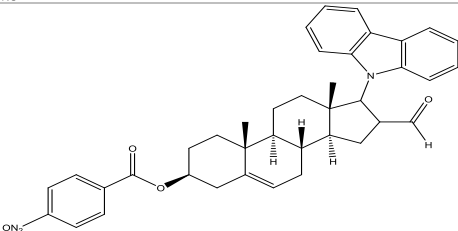
Clave	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Estructura
<b>FCB-32</b>	316.42	235-238	
<b>AM-3</b>	398.5	150-152	
<b>AM-4</b>	412.6	120-122	
<b>AM-5</b>	426.6	121-123	
<b>AM-6</b>	440.6	115-117	

**Tabla 6.** Compuestos esteroidales **PAC1-PAC3**, **PAC5** y **PAC8**.

Clave	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Estructura
<b>PAC-1</b>	500.63	208-210	
<b>PAC-2</b>	484.63	279-181	
<b>PAC-3</b>	470.60	253-237	
<b>PAC-5</b>	505.04	236-238	
<b>PAC-8</b>	495.61	208-210	



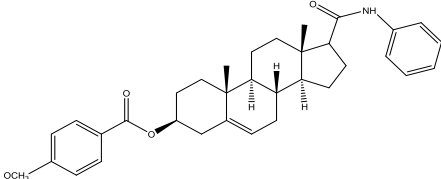
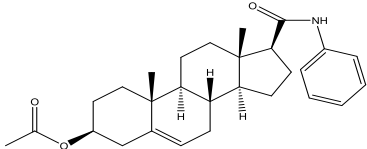
**Tabla 7.** Compuestos esteroidales **PAC12**, **PAC13**, **PAC17** y **PAC18**.

Clave	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Estructura
<b>PAC-12</b>	569.73	284-286	
<b>PAC-13</b>	587.72	272-275	
<b>PAC-17</b>	594.74	276-278	
<b>PAC-18</b>	614.73	278-279	

**Tabla 8.** Compuestos esteroidales **JT1**, **JT2**, **JT4-JT6**.

Clave	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Estructura
<b>JT-1</b>	516.5	239-241	
<b>JT-2</b>	496.25	256-258	
<b>JT-4</b>	471.25	240-241	
<b>JT-5</b>	439.25	261-263	
<b>JT-6</b>	501.26	242-244	

**Tabla 9.** Compuestos esteroidales **FCB7** y **FCB11**.

Clave	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Estructura
<b>FCB-7</b>	572.69	258-259	
<b>FCB-11</b>	435.59	231-233	

#### **4. Planteamiento del problema**

El cáncer de próstata y la HPB son enfermedades que aquejan al género masculino en edad adulta con una alta incidencia en México y en el mundo. Durante muchos años se han investigado los blancos terapéuticos que puedan ser utilizados para curar estos padecimientos. Hasta la fecha se han desarrollado varios tipos de fármacos que han ayudado a resolver muchos de los síntomas que se presentan en estas enfermedades con el propósito de evitar la intervención quirúrgica. Sin embargo, estos tratamientos además de que producen severos efectos colaterales, no previenen la metástasis en los casos de cáncer de próstata por lo que la búsqueda de mejores terapias sigue siendo un reto para los investigadores en química medicinal.

#### **5. Hipótesis**

Si compuestos esteroidales son derivados del pregnano **S3C- S7C, AM, FCB, JT** y **PAC** van a lograr la inhibición de la enzima 5 $\alpha$ R- 2, por lo que no se producirá DHT en los experimentos *in vitro* y se observará un efecto *in vivo*, del peso de la próstata y de las vesículas seminales, así como la reducción del diámetro de los órganos del flanco.

#### **6. Objetivo General**

Evaluar el efecto *in vivo* e *in vitro* de los compuestos esteroidales que inhiben la enzima 5 $\alpha$ -R2 sobre la expresión de DHT en cromatografía de capa fina, en la disminución del peso de la próstata y de las vesículas seminales, así como el diámetro de los órganos del flanco.

## 6. 1 Objetivos particulares

6.1.1 Obtener a partir de próstata humana A-15-048, la fracción membranal como fuente de la enzima 5 $\alpha$ -R2.

6.1.2 Estandarizar la conversión de T a DHT en condiciones *in vitro*.

6.1.3 Evaluar el efecto de cada uno de los compuestos esteroidales **S3C- S7C**, **AM**, **FCB**, **JT** y **PAC** sobre la expresión de DHT en TCL.

6.1.4 Comparar el efecto *in vivo* de los esteroidales **FCB16-FCB32** en diferentes grupos de hámsteres castrados y tratados con T en el diámetro de los órganos del flanco, el peso de la próstata y las vesículas seminales.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Diseño de estudio

El estudio se dividió en dos partes:

1. Determinación *in vitro* de la inhibición de la actividad de enzima 5 $\alpha$ -R2 por los compuestos **S3C- S7C**, **AM**, **FCB**, **JT** y **PAC** (Tabla 1-9).

2. Determinación *in vivo* del efecto de los compuestos **FCB16- FCB32** (Tablas 2-4).

7.1.1 Determinación *in vitro* de la inhibición de la actividad de enzima 5 $\alpha$ -reductasa de tipo 2 por los compuestos **S3C- S7C**, **AM**, **FCB**, **JT** y **PAC** (Tabla 1-9)

El estudio comprendió una serie de experimentos *in vitro* en los que se evaluó la actividad de los 5 compuestos esteroidales de la Tabla 1 como inhibidores de la conversión de T a DHT.

Variables: en cada ensayo se utilizaron 5 concentraciones diferentes de cada uno de los compuesto esteroidales que se muestran en la Tabla 1, con dos repeticiones y controles.

---

Las técnicas empleadas: fueron de carácter cuantitativo; las determinaciones de T convertida a DHT se cuantificaron utilizando un Bioescaner (BIOSCAN AR-2000).

#### Homogenizado de próstata humana

Para eso fue necesaria la obtención de un homogenizado de próstata humana, donde se obtuvo la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -R2. La próstata humana se obtuvo de individuos post-mortem que ingresaron para autopsia al Depto. de Patología del Hospital General de la Secretaría de Salud. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del mismo Hospital. El tejido fue colocado en frío a -4°C en una solución salina (NaCl 0.15M) inmediatamente al ser extraído, para evitar la pérdida de actividad enzimática.

Una vez que el tejido se recibió, se criopreservó a -70°C en el congelador (REVCO Technologies ULT1386-3-A). A las 24 horas se descongeló en baño de agua fría en un vaso de precipitados de 1000mL, dejando aproximadamente un 30% de congelación de la misma. Se desechó la solución salina en la cual estaba contenida. Se eliminó la grasa y tejido conjuntivo utilizando un equipo de disección.

Se pesó la próstata colocando una caja de petri con hielo en una balanza granataria (Triple Beam Balance OHAUS 5lb 2oz).

Se agregó un volumen de buffer (Medio A pH 6.5, fosfato de sodio 20 mM, pH 6,5 sacarosa 0,32 M) igual al doble de valor del peso de la próstata. Se añadió DTT al 0.1 mM (DL-Ditiotereitol Sigma-Aldrich, Inc) el cual se pesó en una balanza analítica (6A200 OHAUS).

Se homogenizó varias veces utilizando un homogeneizador (Ultra Tukay Ika T18Basic). El homogenizado se (Optima L-70K Ultracentrifuge) a 4000rpm a una temperatura de 0°C por una hora.

El centrifugado desplazó dos fases una líquida y una sólida. La fase sólida se criopreservó en microviales eppendorf.

#### Determinación de proteínas por el Método Bradford

Para la determinación de las proteínas en el homogenizado se utilizó el Método Bradford (Bradford, 1986). Se preparó una solución con 10 mg de azul de Coomasie (Sigma Aldrich Inc. USA) que se pesó en la balanza analítica (6A200 OHAUS). Posteriormente se diluyó en 5 mL de etanol (Baker®) al 95%, 10 mL de ácido fosfórico (Baker®), y se aforó en 100 mL de agua destilada.

Se realizó una curva patrón a partir de proteína albúmina (MERCK) con concentraciones ascendentes de 0  $\mu$ L (blanco) 25  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 75  $\mu$ L y 100  $\mu$ L en tubos de ensaye, con una repetición por concentración. Se le añadió NaCl 0.15 M (Baker®) en concentraciones descendentes 10 0 $\mu$ L al blanco, 75  $\mu$ L, 50  $\mu$ L y 25  $\mu$ L, respectivamente. Se le agregó 5 mL de solución Azul de Coomasie previamente preparado. Las concentraciones utilizadas se muestran en la **Tabla 10**. Cada preparación fue agitada en vórtex (Thermolyne) y se colocaron en celdas (4MM Beckman Coulter).

Se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro (DU 730 Life Science UV/VIS Spectrophotometer Beckman Coulter).

**Tabla 10.** Curva patrón de albúmina

Tubo	Albúmina (1mg/mL)	NaCl 0.15 M	Azul de Coomasie
Blanco	-----	100 $\mu$ L	5 mL
25	25 $\mu$ L	75 $\mu$ L	5 mL
50	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	5 mL
75	75 $\mu$ L	25 $\mu$ L	5 mL
100	100 $\mu$ L	-----	5 mL

## Diluciones problema

Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de proteína obtenida a partir de homogenizado de próstata humana criopreservado, con la precaución de no tomar membranas que pudieran interferir en la lectura. Cada dilución se preparó en un tubo de ensaye con una repetición. Se agregaron 180  $\mu\text{L}$  de NaCl 0.15 M (Baker®) para obtener una dilución 1:10 y se homogenizó. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de esta preparación y se colocaron en un tubo nuevo con 5 mL de solución azul de Coomasie. Se agitó y realizó su lectura en el espectrofotómetro a 590 nm (DU 730 Life Science UV/VIS Spectrophotometer Beckman Coulter).

Posteriormente se realizaron otras diluciones 1:20, 1:30 y 1:40 como se muestra en la **Tabla 11**. Para corroborar la cantidad de proteína obtenida.

**Tabla 11.** Diluciones problema

Dilución	Proteína	NaCl 0.15 M	Azul de Coomasie
1:20	20 $\mu\text{L}$	380 $\mu\text{L}$	5 mL
1:30	20 $\mu\text{L}$	580 $\mu\text{L}$	5 mL
1:40	20 $\mu\text{L}$	780 $\mu\text{L}$	5 mL

Los datos obtenidos ( $\mu\text{g}$  de proteína en 20  $\mu\text{L}$ ) fueron utilizados durante los siguientes ensayos.

Evaluación de la actividad de la enzima  $5\alpha\text{-R2}$  obtenida a partir de próstata humana.

## Preparación de medio de incubación

A diferentes tubos de ensaye con su repetición, se les agregaron: 2 nM de testosterona 1,2,6,7-  $\text{H}^3$  ( $\text{T}[\text{H}^3]$ ) disuelta en etanol y 50  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) (Baker®). Se dejó evaporar el etanol y se les añadieron para alcanzar un mL de buffer de fosfatos 40 mM pH 6.5 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  Baker®,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Baker®)



---

conteniendo 1 mM de DTT (DL-ditiotreitol) (Sigma-Aldrich, Inc. USA) y 2 nM de NADPH ( $\beta$ - Nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato reducido sal tetrasódica hidrato) (Sigma-Aldrich, Inc. USA).

#### Incubación

Para empezar la reacción, a los tubos con el contenido descrito en el párrafo anterior se les añadieron 75, 150 o 300  $\mu$ g de proteína de la fracción membranal obtenida de la próstata humana, para evaluar la conversión de T a DHT. Los tubos se incubaron a baño maría (SW22 Julabo) a 37°C durante una hora. Se detuvo la reacción con 1 mL de diclorometano (Baker®) y se agitó durante 1min en vórtex.

#### Extracción

Los tubos se centrifugaron (Allegra GR Centrifuge Beckman Coulter) a 3700 rpm durante 5 min y se obtuvieron dos fases. Se extrajo la inferior con pipetas Pasteur y se depositó en el fondo de un tubo cónico. Este procedimiento se repitió 5 veces más. Se dejó evaporar el diclorometano (Baker®) a sequedad; aproximadamente por 48 horas.

#### Aplicación del extracto en la placa cromatográfica

Después de evaporación quedó un remanente de DMSO al cual se le agregaron 100  $\mu$ L de metanol (Baker®), se agitó y el líquido se tomó con una jeringa (100  $\mu$ L Syringe Analtech) para aplicarse en las cromatoplasmas (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>) previamente marcadas, utilizando un aplicador Analtech. INC. Este procedimiento se repitió 5 veces más. En los carriles laterales de la misma cromatoplasma se aplicaron manualmente con un capilar 5  $\mu$ g/5 $\mu$ L de las siguientes soluciones estándar: T (Sigma Aldrich Inc. USA), DHT (Steraloids Inc), androstendiol (Sigma Aldrich Inc) y androstenediona (Steraloids Inc).

## Elución de las cromatoplacas

La cromatografía se desarrolló en un sistema de cloroformo: acetona (9:1) utilizando una tanque para cromatografía de placa fina (CAMAG) previamente saturada con la combinación de solventes.

## Identificación de estándares no marcados

Las fracciones de las cromatoplacas que contenían los estándares no marcados se separaron de las cromatoplacas y se revelaron de la siguiente manera: la T y la androstenediona con la lámpara UV (Mineralight lamp Model UVG-54 254 nM) y la DHT y el androstanediol utilizando un aerosol preparado con ácido fosfomolibdico al 8% (Baker®), y aplicando calor (100 °C) en una estufa (AMERICAN 5636). Más tarde se determinó su *Rf*.

## Obtención de metabolitos radiomarcados formados

La cromatoplaque se colocó en un lector de radiactividad Bioescaner (Bioscan AR-2000). Y a través del software Bioscan V3 se produjeron los gráficos densitométricos indicando el valor calculado del *Rf* para cada uno de los metabolitos radiactivos obtenidos a partir de la T marcada con tritio. Este valor se comparó con el obtenido con los estándares no marcados con la finalidad de identificarlos. La cantidad de DHT marcada obtenida a partir de la T [ $H^3$ ] indicó la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -R. Este valor se utilizó como el 100% de la conversión.

Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI50) para cada uno de los compuestos sintetizados **S3C- S7C, AM, FCB, JT y PAC**

Se prepararon una serie de tubos con su repetición de la misma forma que se indicó anteriormente y se agregaron diferentes concentraciones [ $1 \times 10^{-11}$ - $1 \times 10^{-4}$  M] de los compuestos a estudiar **S3C- S7C, AM, FCB, JT y PAC (Tabla 1-9)**. La

reacción se inició agregando 300 µg de proteína con actividad de 5α-R. Además se preparó un blanco de reactivos; sin proteína. Los tubos se incubaron, extrajeron y los metabolitos formados se separaron, cuantificaron e identificaron como se describió en las secciones anteriores.

Cálculo de la  $CI_{50}$ .

La concentración media inhibitoria ( $CI_{50}$ ) se define como la concentración del inhibidor que reduce la velocidad de la reacción a la mitad de la que existe en ausencia del inhibidor. El valor de la  $CI_{50}$  de los compuestos probados se calculó a partir de los gráficos de inhibición construidos con apoyo del Programa SIGMA PLOT versión 12.

#### 7.1.2 Determinación *in vivo* del efecto de los compuestos FCB16 – FCB24 (Tablas 2-3)

El estudio comprende los experimentos *in vivo* en donde se evaluó el efecto de cada uno de los 9 compuestos esteroidales (**FCB16 – FCB24**) que mostraron efecto *in vitro* en las Tablas 2-3 inhibiendo la DHT. Por lo cual fueron evaluados sobre el peso de la próstata y de las vesículas seminales de hámsteres castrados y tratados con T.

Variables: fueron los tratamientos con los diferentes compuestos a estudiar que se aplicaron a distintos grupos de hámsteres castrados y tratados con T. Se utilizaron tres grupos control de 4 hámsteres cada uno: uno tratado por la vía subcutánea con 200 µg de T disueltos en 200 µL de aceite de sésamo; el segundo será tratado con T plus Finasterida; y el tercer grupo con T más cada uno de los 9 esteroidales que mostraron efecto *in vitro* mostrados en las Tablas 2-3, con 4 respectivas repeticiones.

Técnicas: fueron de carácter cuantitativo, ya que, fue necesario medir el peso de la próstata y de las vesículas seminales, así como el tamaño de los órganos del flanco presentes en la parte dorsal de los hámsteres.

## Evaluación *in vivo* de los compuestos esteroideos

Se requirió un grupo de 4 hámsteres dorados (cada uno) de 3 meses de edad que fueron sometidos a gonadectomía 30 días antes de comenzar los experimentos. Las cirugías se realizaron bajo anestesia con Pentobarbital sódico 50mg/kg de uso veterinario (Smithkline Norden, México). Los animales se mantuvieron durante 30 días en una habitación con temperatura controlada (22°C) y períodos de luz-oscuridad de 12 h. Los alimentos (5001 Purina Lab diet) y agua fueron proporcionados *ad libitum*.

Los experimentos que implican el uso de animales de laboratorio fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana Plantel Xochimilco.

Los tres grupos se mantuvieron como control; uno fue inyectado con 200µl de aceite de sésamo (Cosmopolita), el segundo con 1 mg/kg de peso corporal de T (Sigma Aldrich, Inc.) disuelto en 200µL de aceite de sésamo, y el tercero con 1 mg/kg de T y con 1mg/kg de Finasterida (Sigma Aldrich, Inc.).

Los tratamientos con los compuestos cuya actividad *in vitro* fue comprobada (**FCB16- FCB24**) fueron inyectados junto con la T (1 mg/kg en 200 µL de aceite de sésamo) a 9 grupos diferentes de hámsteres gonadectomizados, en una dosis de 2 mg/kg, disuelta en 200µL de aceite de sésamo.

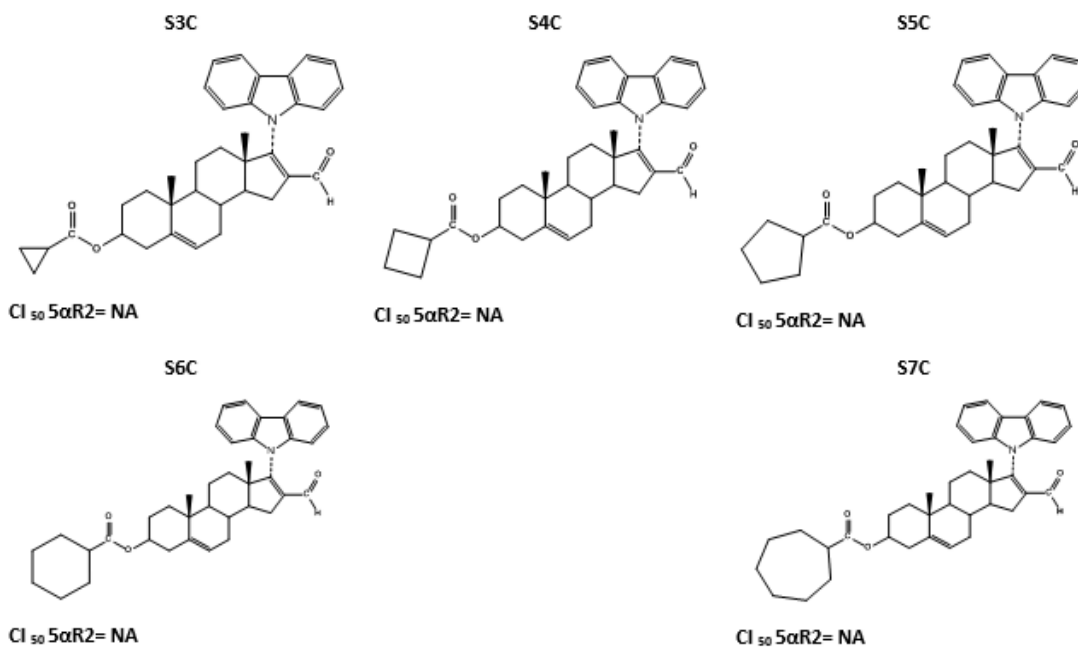
Después del tratamiento, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>. Se procedió a pesarlos y posteriormente se midió el diámetro de los órganos flanco con un vernier. La próstata y las vesículas seminales de cada animal se diseccionaron y pesaron en la balanza analítica (6A200 OHAUS).

Se realizó la prueba de ANOVA del peso de la próstata, vesículas y diámetros de los órganos del flanco; y los promedios se compararon utilizando la prueba de Dunnet con una  $p < 0.05$ .

## 8. Resultados

### 8.1 Efecto *in vitro* de los compuestos estudiados

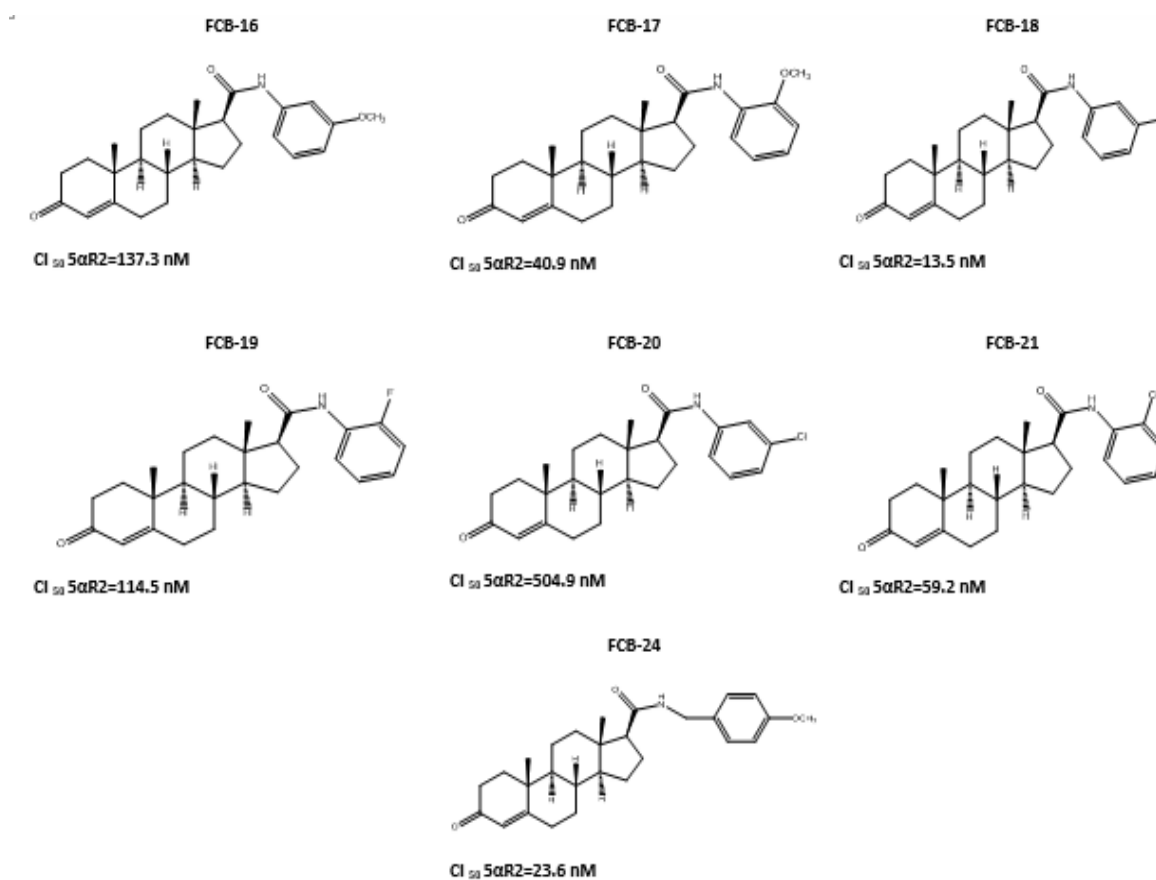
El resultado de las pruebas biológicas realizadas con los compuestos de la serie **S3C-S7C** de la Tabla 1, indica que no mostraron actividad biológica sobre la 5 $\alpha$ R-2 (**Figura 19**).



**NA: No activo**

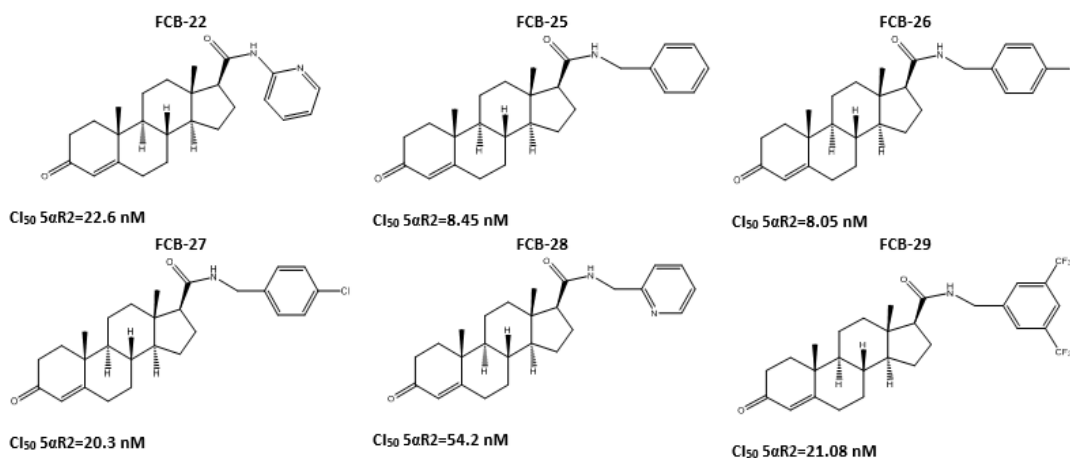
**Figura 19.** Valores de la Cl<sub>50</sub> para los esteroides **S3C-S7C**

En la **Figura 20** se muestra el valor de la  $CI_{50}$  de los esteroides: **FCB16-FCB21** y **FCB24**. Entre ellos, EL FCB20 obtuvo el  $CI_{50}$  con 504.9 nM, mientras que el **FCB16** presentó un valor menor: 13.5 nM.



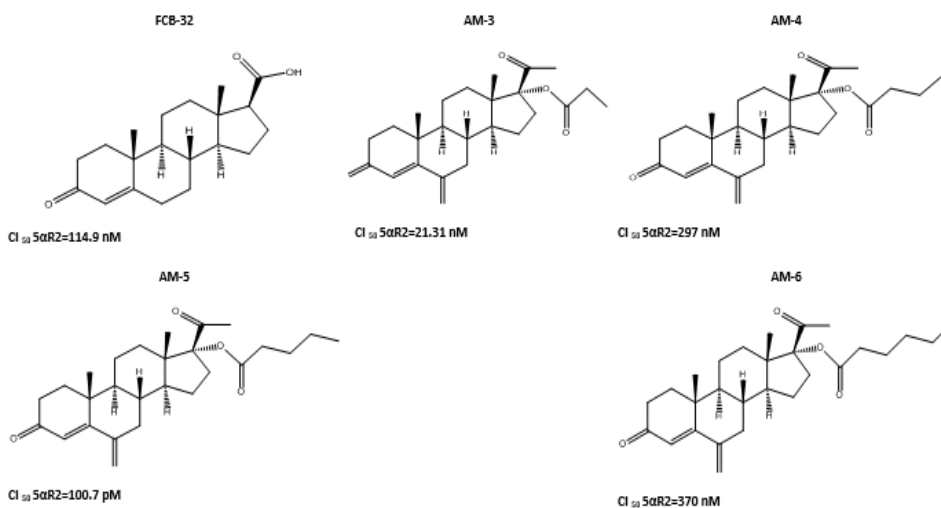
**Figura 20.** Valores de la  $CI_{50}$  de los esteroides **FCB16-FCB21** y **FCB24**.

La **Figura 21** muestra el valor de la  $Cl_{50}$  de los esteroides **FCB22**, **FCB25-FCB29**. Entre ellos el valor mayor fue el **FCB28** con 54.2 nM, mientras que el **FCB26** presentó un valor menor: 8.05 nM.



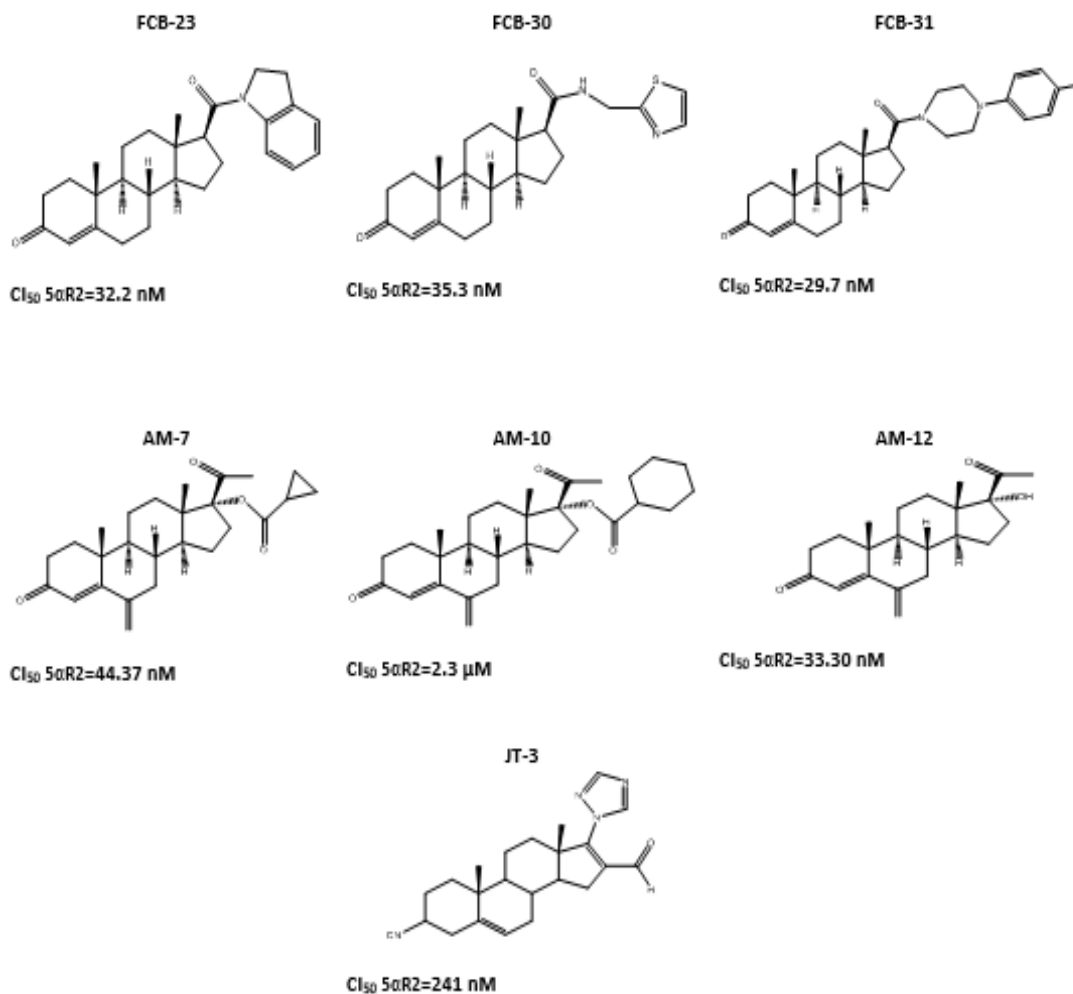
**Figura 21.** Valores de la  $Cl_{50}$  de los esteroides **FCB22**, **FCB25-FCB29**.

En la **Figura 22** se muestra el valor de  $Cl_{50}$  de los esteroides: **FCB32** y **AM3 - AM6**. Entre ellos el valor mayor fue el **AM6** con 370 nM, mientras que el **AM3** presentó un valor menor fue el 21.31 nM.



**Figura 22.** Valores de la  $Cl_{50}$  de los compuestos **FCB32** y **AM3-AM6**.

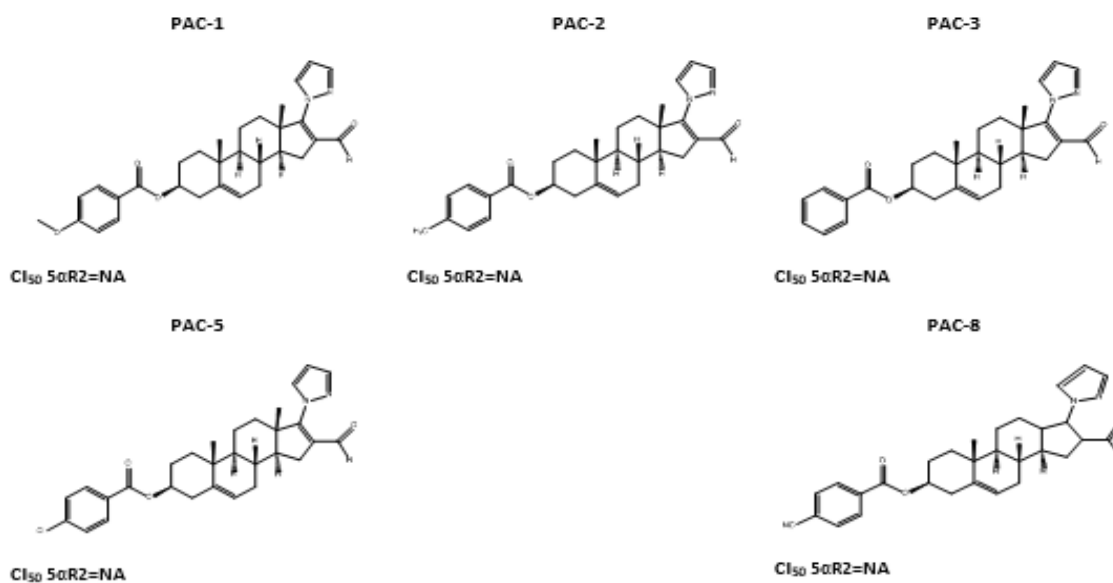
En la **Figura 23** se observa el valor de la  $Cl_{50}$  de los compuestos: **FCB23**, **FCB30**, **FCB31**, **AM7**, **AM10**, **AM12** y **JT3**. Entre ellos el valor mayor fue el **AM10** con un valor de 2300 nM, mientras el que presentó un valor menor fue el **FCB31** con un  $Cl_{50}$  de 29.7 nM.



**Figura 23.** Valores de la  $Cl_{50}$  para cada uno de los compuestos **FCB23**, **FCB30**, **FCB31**, **AM7**, **AM10**, **AM12** y **JT3**.

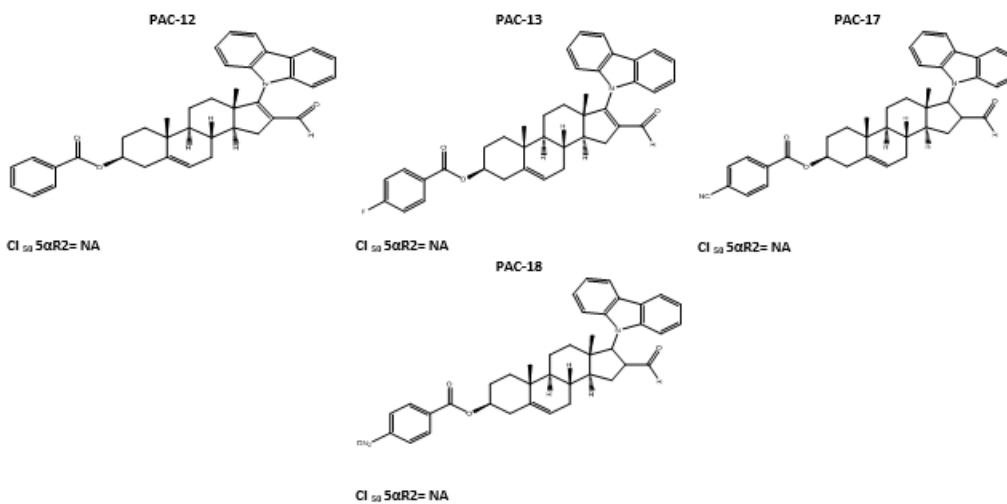


La **Figura 24** muestra el valor de la  $Cl_{50}$  de los esteroides **PAC1-PAC3**, **PAC5** y **PAC8**. Ninguno de ellos fue activo para inhibir la actividad de la enzima  $5\alpha R-2$ .



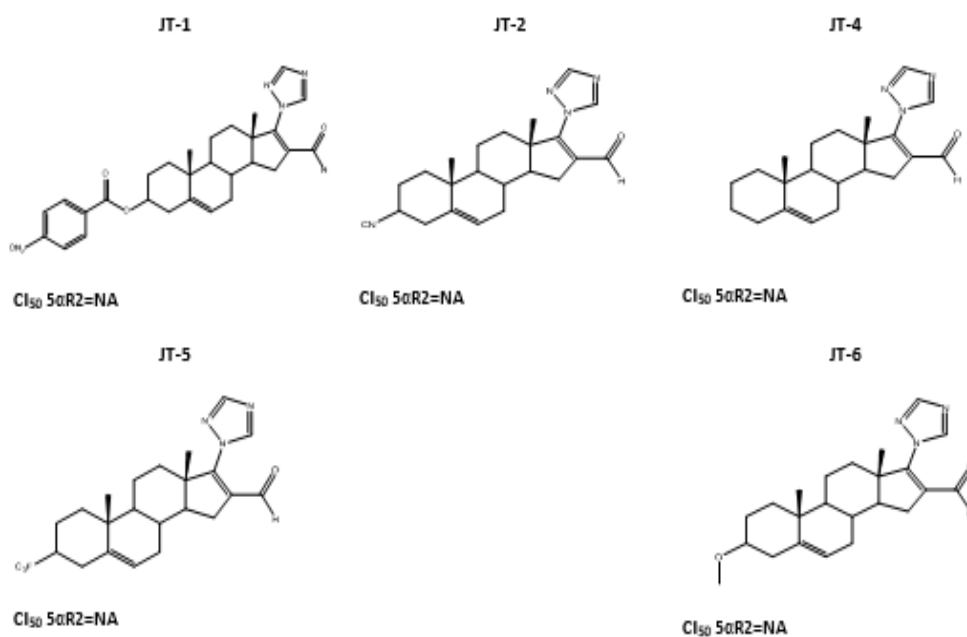
**Figura 24.** Valores de la  $Cl_{50}$  de los compuestos **PAC1-PAC3**, **PAC5** y **PAC8**.

La **Figura 25** muestra el valor de la  $Cl_{50}$  de los esteroides **PAC12**, **PAC13**, **PAC17** y **PAC18**. Ninguno de ellos inhibió la actividad de la enzima  $5\alpha R-2$ .



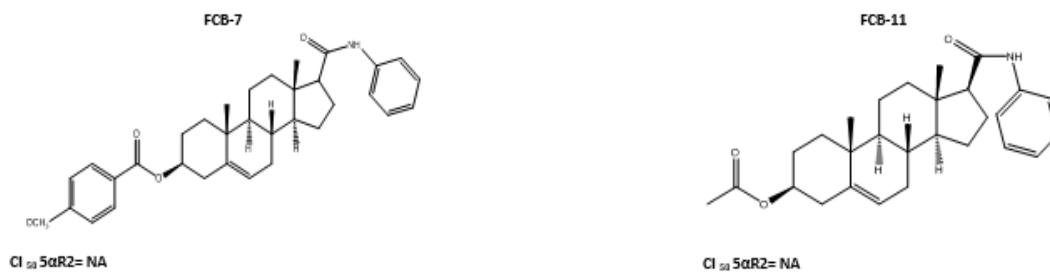
**Figura 25.** Valores de la  $Cl_{50}$  los esteroides **PAC12**, **PAC13**, **PAC17** y **PAC18**.

En la **Figura 26** se presenta el valor de la  $Cl_{50}$  de los esteroides **JT1**, **JT2** y **JT4 - JT6**. Ninguno de ellos muestra actividad inhibitoria sobre la enzima  $5\alpha R-2$ .



**Figura 26.** Valores de la  $Cl_{50}$  de los compuestos **JT1**, **JT2** y **JT4 - JT6**.

En la **Figura 27** se presenta el valor de la  $Cl_{50}$  de los esteroides **FCB7** y **FCB11**. Ninguno de ellos tiene actividad inhibitoria sobre la enzima  $5\alpha R-2$ .



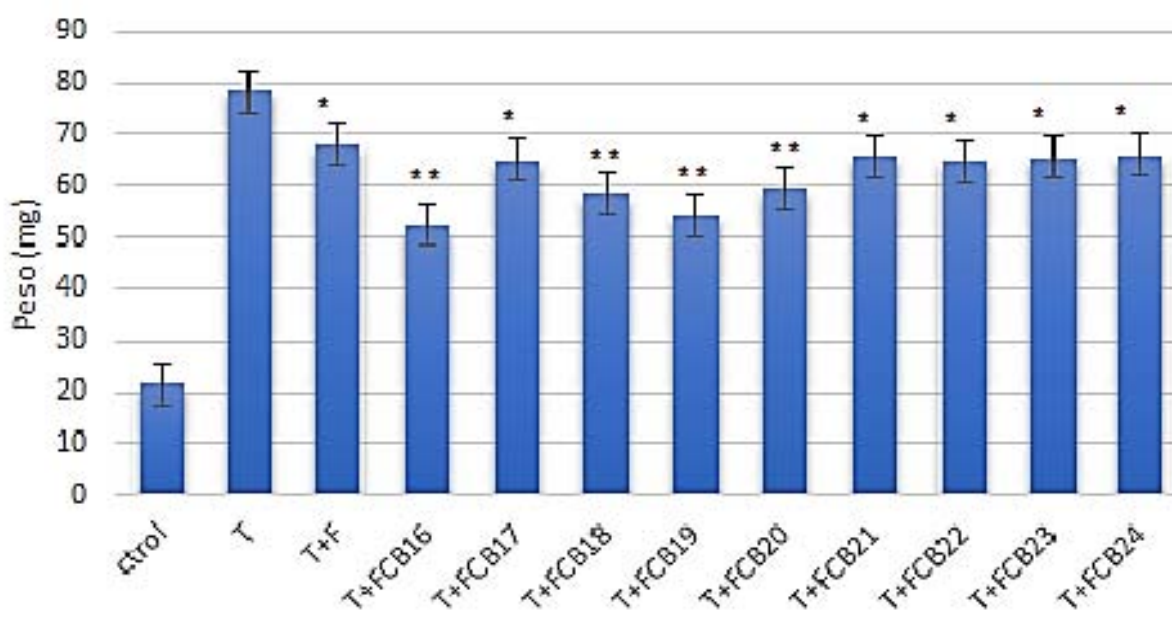
**Figura 27.** Valores de la  $Cl_{50}$  de los compuestos **FCB7** y **FCB11**.

8.2. Efecto *in vivo* en los órganos blanco de los compuestos esteroidales con actividad *in vitro*.

En la **Gráfica 1** se muestra el efecto *in vivo* en el peso de la próstata por los esteroides **FCB16- FCB24** inyectados conjuntamente con la T a los hámsteres.

En el control gonadectomizado y tratado exclusivamente con vehículo se observó la disminución del peso de la próstata en comparación el de los animales intactos (próstata: 18.0 vs. 20 mg). En los animales tratados con T aumentó el peso de estas glándulas, mientras que en aquellos tratados con T y Finasterida disminuyó el peso de dichas estructuras (**Gráfica 1**).

En los animales tratados con T, los compuestos esteroidales o la combinación de ambos disminuyó el peso de la próstata, en comparación con el de los controles gonadectomizados y tratados únicamente con T.

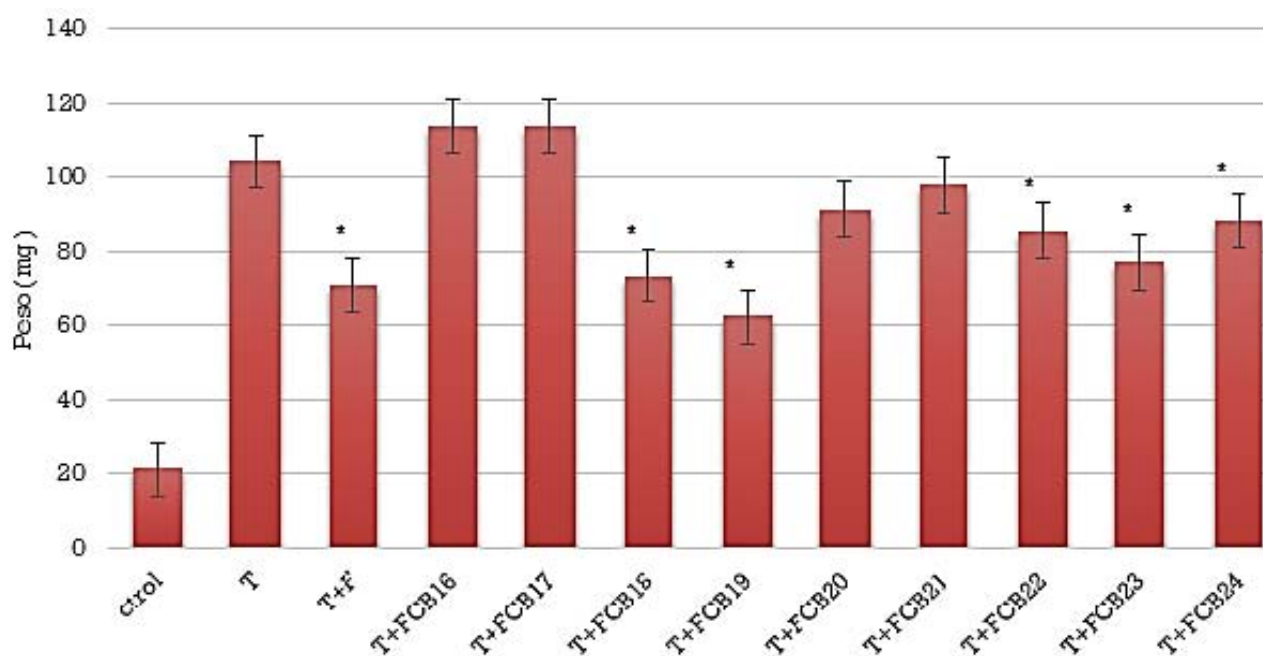


**Gráfica 1.** Efecto en el peso de la próstata en la media $\pm$  e.e.m de los hámsteres tratados con los esteroides **FCB16- FCB24**. \*Diferencia significativa comparado con grupo de T; \*\*Diferencia significativa comparado con el grupo de T+F ( $p < 0.05$ ).

En la **Gráfica 2** se muestra el efecto *in vivo* en las vesículas seminales por los compuestos **FCB16- FCB24** inyectados conjuntamente con la T a los hámsteres.

En el control gonadectomizado y tratado exclusivamente con vehículo se observó la disminución del peso de las vesículas seminales en comparación con los animales intactos (vesículas seminales 17.0 vs. 20 mg  $p < 0.05$ ). En los animales tratados con T aumentó el peso de estas, mientras que en aquellos tratados con T y Finasterida disminuyó el peso de estas, mientras que en aquellos tratados con T y Finasterida disminuyó el peso de dichas glándulas (**Gráfica 2**).

En los animales tratados con T, los compuestos esteroidales o la combinación de ambos disminuyó el peso vesículas seminales, en comparación con el de los controles gonadectomizados y tratados únicamente con T.

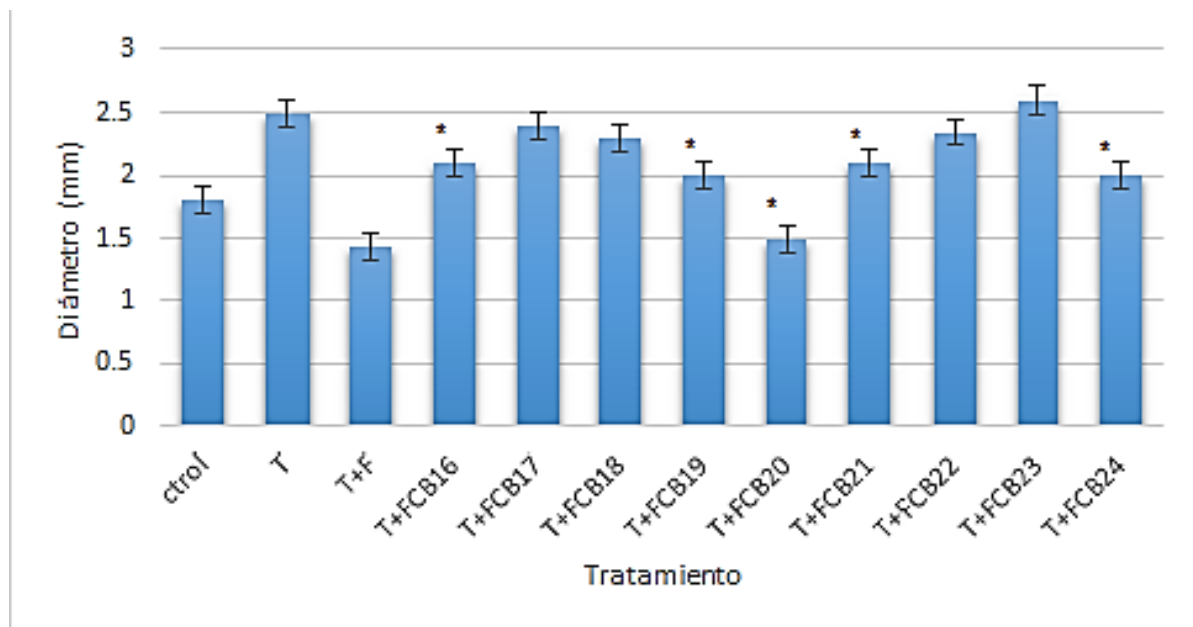


**Gráfica 2.** Efecto en el peso de las vesículas seminales  $\text{media} \pm \text{e.e.m}$  de los hámsteres tratados con los esteroides **FCB16- FCB24**. \*Diferencia significativa comparado con grupo de T ( $p < 0.05$ ).

En la **Gráfica 3** se muestra el efecto *in vivo* en el diámetro de los órganos flanco de los hámsteres tratados con los esteroides **FCB16- FCB24** inyectados conjuntamente con la T.

En el control gonadectomizado y tratado exclusivamente con vehículo se observó un tamaño similar en el diámetro de los órganos flanco en comparación con los animales intactos (1.5 vs 1.8 cm  $p < 0.05$ ). El diámetro de estos órganos aumentó con el tratamiento con T, mientras que el tratamiento de T con Finasterida disminuyó el diámetro como se esperaba (**Gráfica 3**).

En los animales tratados con T, los compuestos esteroidales **FCB16- FCB22** y **FCB24** o la combinación de ambos disminuyó el diámetro de los órganos flanco en comparación con el de los controles gonadectomizados y tratados con T (**Gráfica 3**).



**Gráfica 3.** Efecto en el diámetro de los órganos flanco en la media  $\pm$  e.e.m de los hamsteres tratados con los esteroides **FCB16- FCB24**. \*Diferencia significativa comparado con grupo de T ( $p < 0.05$ ).

## 9. Discusión

De los compuestos 46 que fueron probados sólo 24 mostraron un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -R2. Los esteroides **S3C-S7C**, **PAC1-PAC3**, **PAC5**, **PAC8**, **PAC12**, **PAC 13**, **PAC17**, **PAC18**, **JT1**, **JT2**, **JT4- JT6**, **FCB7** y **FCB11** no fueron activos en estos ensayos enzimáticos.

La serie **S3C-S7C** muestran en su estructura un (metil-ciclo-[propano, butano, pentano, hexano, heptano]-carboxilato) en el C-3 y grupo carbazol en el C-20. Estos radicales al impiden estéricamente la interacción del compuesto con el sitio activo de la enzima. Sin embargo, hipotéticamente estos los compuestos podrían tener un efecto *in vivo*, ya que en el plasma existe la presencia de esterasas que podrían hidrolizar el grupo en el C-3.

Los valores de la  $CI_{50}$  de los derivados del pregnano con un N-([3-metoxifenilo, 2-metoxifenilo, 3-fluorofenilo, 2-fluorofenilo, 3-clorofenilo, 2-clorofenilo]- acetamida) en el C-17, mostraron que el más potente de ellos para inhibir la actividad de la 5 $\alpha$ -R2 es el **FCB16**, mientras que el menos potente para inhibir esta enzima fue el **FCB20**. Sin embargo, los estudios *in vivo* indican que el **FCB16** tiene efecto únicamente en el peso de la próstata, ya que, el peso de las vesículas seminales aumentó más que el grupo control tratado con T y con Finasterida y también tuvo efecto en la disminución de los órganos del flanco, lo que sugiere que el **FCB16** de este grupo posee más potencia terapéutica en la glándula prostática.

Los valores de la  $CI_{50}$  de los compuestos derivados del pregnano con un grupo sustituido N-([piridin-2-il, 4-metoxibencil, bencil, 4-fluorobencil, 4-clorobencil- piridin-2-ilmetil, 3-5-trifluorometil-bencil]-acetamida) en el C-17 del núcleo del pregnano, mostraron que el más potente para inhibir la actividad de la 5 $\alpha$ -R2 es el **FCB26**, mientras que el menos potente fue el **FCB28**. De estos los más activos *in vivo* fueron **FCB22** y **FCB24**, lo que indica que estos esteroides poseen una mayor potencia terapéutica. Los demás compuestos de este grupo podrían ser candidatos para estudios *in vivo*.

Los compuestos que van de la serie **FCB16- FCB32** presentan un grupo ceto en el C-3 y un grupo radical más grande en el C-17. Indica la importancia del C-3 en la interacción con el sitio activo de la enzima. Los dobles enlaces que muestran en el C-3 y C- 4 podría ser un factor determinante en la actividad de la enzima, como se ha propuesto para explicar la de acción de la Finasterida (Bull *et al.*, 1996). Estos autores proponen que el NADPH interactúa con los dobles enlaces del anillo A de la Finasterida hasta reducirlos por completo, ya que es una inhibición de tipo competitiva que incluye al cofactor podríamos esperar un mecanismo similar para la inhibición de la enzima producida por los compuestos **FCB16- FCB32**.

El mecanismo de acción de los inhibidores de la serie **FCB**, se consideran también semejante al producido por la Dutasterida (Aggarwal *et al.*, 2010), ya que ambos contienen en el anillo A el grupo ceto en el C-3 y en el C-17, unido a un N y un radical cíclico que en el caso de la Dutasterida es un trifluorobencilo, además de ser un azaesteroide. El compuesto **FCB29** tiene una estructura química similar a la Dutasterida.

Los valores de la  $CI_{50}$  con un grupo éster (propilato butirato, petanoato, hexanoato) en el C-17, mostraron que el más potente de ellos para inhibir la actividad de la  $5\alpha$ -R2 es el **AM3**, mientras que el menos potente es el **AM6**. Estos no fueron estudiados *in vivo* pero son candidatos para ser valorados.

Los valores de la  $CI_{50}$  con un grupo variable en el C-17 (indolin-carbonilo, tiazol-ilmetil, fluorofenil, ciclopropanocarboxilato, ciclohexanocarboxilato, triazol-il), mostraron que el más potente de ellos para inhibir la actividad de la  $5\alpha$ -R es el **FCB31**, y el menos potente fue el **AM10**. Por lo que son candidatos para ser valorados *in vitro*.

Todos los esteroides evaluados de la serie **AM** tienen un grupo ceto en el C-3 y tienen un efecto inhibitorio de la enzima compitiendo efectivamente con la

T, que también presenta un grupo ceto en este carbono. Estos compuestos tienen diferentes radicales en C-17 lo que permite interactuar de manera diferente con la enzima y potenciar el efecto de una mejor manera (Voig y Hsia, 1973).

Los valores de la  $CI_{50}$  con un grupo pirazol en el C-17 no mostraron actividad para inhibir la  $5\alpha$ -R2. Ninguno de los esteroides analizados de la serie de compuestos **PAC** tuvo un resultado favorable, lo que fue correlacionado con los resultados sin actividad sobre la  $5\alpha$ -R2; donde el C-3 juega un papel importante. Este carbono cuenta con una cetona unida a un benzoato; radicales bastante grandes para competir con el sustrato natural.

Los valores de la  $CI_{50}$  con un grupo triazol en el C-17 no mostraron actividad para inhibir la  $5\alpha$ -R2, con excepción del **JT3** que si tienen un efecto inhibitorio sobre la enzima. Por lo que es un candidato en la valoración *in vivo* para dilucidar su efecto. La serie de compuestos **JT** poseen un grupo grande unido al C-3, además son compuestos pequeños y en algunos casos sin radicales en este carbono y no presentan actividad biológica. Discos resultados nos sugieren que la falta del grupo ceto en el C-3 los hace inactivos y posiblemente la falta de un doble enlace en el C-4 hace que estos compuestos interaccione en el grupo activo de la enzima.

Casi todos los compuestos utilizados en este estudio, con efecto inhibitorio, presentan un doble enlace en el C-4 (excepto el **JT3**), el cual podría ser esencial junto con un grupo ceto o un radical favorable en el C-3 para el acoplamiento de la  $5\alpha$ -R2 y la inhibición de su actividad. Esto se correlaciona con los estudios realizados por Voig y Hsia (1973) mostraron que los compuestos con la estructura  $\Delta^4$ , 3-ceto tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima, debido a que por la naturaleza hidrofílica de ésta, puede unirse con el Anillo A de la molécula esteroide. Además observaron que cuando el C-3 no tiene radicales en sus enlaces puede inhibir la actividad compitiendo con la T.



---

El único compuesto de la serie **JT** con efecto es el **JT-3**. En este caso, el metilo unido al C-3 parece aumentar su actividad.

Los compuestos **FCB7** y **FCB11** que contienen radicales más grandes en el C-17 no tuvieron actividad inhibitoria sobre la 5 $\alpha$ R-2.

## 10. Conclusiones

- Los compuestos **FCB16- FCB22** y **FCB24** podrían tener potencia terapéutica para las enfermedades andrógeno dependientes, por mostrar efectos inhibitorios sobre la enzima  $5\alpha$ -R2 *in vivo* e *in vitro*.
- Los esteroides **FCB25- FCB32**, **JT3**, **AM3- AM7**, **AM10** y **AM12** mostraron efecto inhibitorio sobre  $5\alpha$ -R2 *in vitro*.
- El grupo ceto en el C-3 es clave para la interacción de los compuestos esteroidales con la  $5\alpha$ -R2.
- El doble enlace en el C-4 es esencial para competir con el sustrato natural de la  $5\alpha$ -R2.
- Un radical adecuado en C-17 puede potenciar la actividad de inhibición de los compuestos.

---

## 11. Perspectivas

- Los compuestos con actividad inhibitoria que no fueron evaluados farmacológicamente podrían ser probados con la finalidad de comprobar que no sean profármacos que al hidrolizarse en el organismo, muestren la actividad deseada
- Los compuestos valorados *in vivo*, **FCB16- FCB24**, podrían ser estudiados en células correspondientes a una línea celular de cáncer de próstata LnCAP que es ampliamente utilizado y el cual se ha establecido para estudios antiproliferativos, por lo cual se podría dilucidar su efecto en el carcinoma de esta glándula.

## 12. Referencias

**Aggarwal S, Thareja S, Verma A, Bhardwaj T, Kumar M.** (2010). An overview on 5 $\alpha$ -reductase inhibitors. *Steroids*, 75 (2): 109–153.

**Alauddin M, Martin-Smith M.** (1962). Biological activity in steroids possessing nitrogen atoms. II. Steroidal alkaloids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 14(1): 325-349.

**Anderson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW.** (1991). Deletion of steroid 5 $\alpha$ -reductase-2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*, 354(6349): 159–161.

**Arellano Y, Bratoeff E, Garrido M, Soriano J, Heuze Y, Cabeza M.** (2011). New ester derivatives of dehydroepiandrosterone as 5 $\alpha$ -reductase inhibitors. *Steroids* 76 (12): 1241–1246.

**Arce V, Catalina P y Mallo F.** (2006). *Endocrinología*. 1° Ed. Universidade, Servizo de Publicacions e intercambio Científico. Santiago de Compostela pp. 73-113.

**Barón M, González J, Feliu J.** (2001). *Cáncer en el anciano*. 1° Ed. Masson. Barcelona. pp. 49-70.

**Beato M.** (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56(3): 344-355.

**Bradford M.** (1986). A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248–254.

**Bratoeff E, García P , Heuze Y, Soriano J , Mejía A, Labastida A, Valencia N y Cabeza M.** (2010). Molecular interactions of progesterone derivatives with 5-reductase types 1 and 2 and androgen receptors. *Steroids*, 75(7): 499–505.

---

**Cabeza M, Naranjo B, Heuze Y, Sánchez A, Hernández M, Sainz T y Bratoeff E.** (2012). Molecular interactions of natural and synthetic steroids in female hamsters' flank organs. *Journal of Dermatological Science*, 66( 2): 119-126.

**Campbell-Walsh** editado por Wein A, Kavoussi L, Partin A, Novick A. (2008). *Urología*. Tomo III. 9ª edición. Médica Panamericana. Buenos Aires.pp. 3086-3090

**Castro-Magana M, Angulo M, Fuentes B, Canas A, Sarrantonio M, Arguello R, Vitollo P.** (1996). Effect of finasteride on human testicular steroidogenesis. *Journal of Andrology*, 17(5): 516-521.

**Chang J, Nguyen H, Lue T.** (2002). Androgens in penile development, penile erection, and erectile dysfunction. *In*: Chang C, ed. *Androgens and androgen receptor: mechanisms, functions and clinical applications*. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers; pp. 289–298.

**Clark R, Hermann D, Cunningham G, Wilson T, Morrill B, Hobbs S.** (2004). Marked suppression of dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia by dutasteride, a dual 5 $\alpha$ -reductase inhibitor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(5): 2179 –2184.

**Conti F.** (2010). *Fisiología Médica*. Mc Graw- Hill Interamericana Editores. Italia. pp. 7-40.

**Cruz N.** (2012). *Tratado de andrología y medicina sexual*. Editorial Panamericana. Madrid. pp. 946-966.

**Devlin T.** (2004). *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4ª. edición. Editorial Reverté, S.A. España. pp. 960-964.

**Dorantes A, Martínez C, Guzmán A.** (2012). Endocrinología clínica. 4ª. edición. Editorial El Moderno. pp. 670-693.

**Eicheler W, Tuohimaa P, Vilja P, Andermann K, Forssmann WG, Aumuller G.** (1994). Immunocytochemical localization of human 5 alpha-reductase-2 with polyclonal antibodies in androgen target and non-target human tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 42(5): 667–675.

**Eisenberger M, Blumenstein B, Crawford D, Miller G, Mcleod D, Loehrer P, Wilding G, Sears K, Culkin D, Thompson I, Bueschen A, Lowe B.** (1998). Bilateral orchiectomy with or without flutamide for metastatic prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 339(15): 1036-1042.

**GLOBOCAN** (2012). ([http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)).

**Heracek J, Richard H, Martin H, Luboslav S, Jana S, Jitka K, Vaclav E, Michael U, Vaclav M.** (2008). Tissue and serum levels of principal androgens in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Steroids*, 72(4): 375-380.

**Hirosumi J, Nakayama O, Fagan T, Sawada K, Chida N, Inami M, Takahashi S, Kojo H, Notsu Y y Okuhara M.** (1995). FK 143, a novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5 -reductase: (1) *In vitro* effects on human and animal prostatic enzymes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 52(4): 357-363.

**IMSS** (2013). (<http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-prostata>).

**Koolman J, Röhn K.** (2004). Bioquímica: texto y atlas. 3ª. edición. Madrid. Médica Panamericana. pp. 374-377

**Kruep E, Goodwin B, Chaudhari S.** (2013). Evaluation of recent trends in treatment patterns among men with benign prostatic hyperplasia. *American Journal of Men's Health*, 7(3): 214–219.

**Jork H, Werner F, Fischer W, Wimmer H.** (1990). Thin-Layer Chromatography. Reagents and detection methods Vol 1.1a physical and chemical detection methods.VCH Publisher. 1° Ed. UK pp 9-20

**Li C, Chen C, Singh M, Labrie F.** (1995). The enzyme and inhibitors of 4-ene-3-oxosteroid 5 $\alpha$ -oxidoreductase. *Steroids*, 60(6): 430–441.

**Mendoza P.** (2008). *Farmacología Médica*. Editorial Médica Panamericana. México. UNAM, Facultad de Medicina. pp. 428-434.

**Patton K y Thibodeau G.**(2013). *Anatomía y fisiología*. España. Elsevier. pp. 910-915.

**Rij S, Gilling P.** (2015). Recent advances in treatment for benign prostatic hyperplasia. *Faculty Review*: 1482.

**Roehrborn C, Boyle P, Curtis N, Hoefner K, Andriole G.** (2002). Efficacy and safety of a dual inhibitor of 5- $\alpha$ -reductase types 1 and 2 (dutasteride) in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology*, 60 (3): 434- 441.

**Ross J y Foster C.** (2007). *Molecular oncology of prostate cancer*. Jones and Bartlett publishers. Massachusetts. pp 7-50.

**Ross M y Pawlina W.** (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5° Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. pp 780-810

**Silva-Ortiz A, Bratoeff E, Ramírez- Apan T, Heuze Y, Sánchez A, Soriano J, Cabeza M.** (2015). Synthesis and activity of novel 16-dehydropregnenolone acetate derivatives as inhibitors of type 1 5 $\alpha$ -reductase and on cancer cell line SK-LU-1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(24): 7535–7754.

**Silva-Ortiz A, Bratoeff E, Ramírez-Apan T, Heuze Y, S Juan , Moreno I, Bravo M, Bautista L y Cabeza M.** (2017). Synthesis of new derivatives of 21-imidazolyl-16-dehydropregnenolone as inhibitors of 5 $\alpha$ -reductase 2 and with cytotoxic activity in cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25(5): 1600-1607.

**Smith T.** (2009). Urología general. Editorial Mundo Moderno. Octava edición. Pp555-577.

**Stricker H.** (2001). Luteinizing hormone–releasing hormone antagonists in prostate cancer. *Urology*, 58(Suppl 2): 24–27.

**Takayasu S, Adachi K** (1972). The in vivo and in vitro conversion of testosterone to 17-hydroxy-5 $\alpha$ -androstane-3-one (dihydrotestosterone) by the sebaceous gland of hamsters. *Endocrinology*, 90(1): 73-80

**Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW.** (1993). Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme expression. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(2):903–910.

**Valls O, del Castillo B.** (2002). Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. Edición Mexicana. Universidad Autónoma Metropolitana. pp. 527-544

**Velázquez, Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza J, Moro M, Portolés A.** (2008). Farmacología básica y clínica. 18° edición. Buenos Aires. Médica Panamericana. pp. 653-660.

**Vermorken A, Goos C, Roelofs H** (1980). The antiandrogenic effect of progesterone on the hamster flank organ. *The British Journal of Dermatology*, 102(4): 455–460.

**Voigt W, Hsia S.** (1973). Further studies on testosterone 5 $\alpha$ -reductase of human skin. Structural features of steroid inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, 248 (12): 4280-4285.

**Wang R, Yeh S, Tzeng C, Chang C.** (2013). Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 30(2): 119 –132.



---

**Yen S, Jaffe R, Barbieri R.** (2002). Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. Madrid. 4ª. edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 118-143

**Yik S, Laengvejkal P, Panikkath R y Nugent K.** (2004). The association of  $\alpha$ -blockers and 5- $\alpha$ -reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia with fractures. The American Journal of the Medical Sciences, 347(6): 463–471.

**Zhu YS, Sun GH.** (2005). 5 $\alpha$ -reductase isozymes in the prostate. Journal of Medical Sciences, 25 (1):1-12.