



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“SÍNTESIS DE 17-CARBOXIDERIVADOS DEL
ANDROSTENO COMO ANTIANDRÓGENOS”

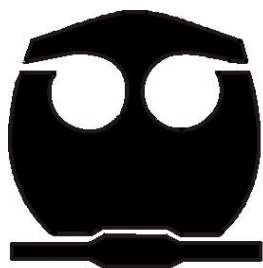
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U Í M I C A

P R E S E N T A:

VICUÑA FLORES LEONILA



MÉXICO, D.F.

2009

JURADO ASIGNADO

Presidente: Francisco Yuste López

Vocal: María Isabel Aguilar Laurents

Secretario: Elena Guadalupe Ramírez López

1er sup: Ana Adela Sánchez

2 do sup: Bernardo Antonio Frontana Uribe

**Sitio donde se desarrollo el tema: Laboratorio 125, Conjunto E,
Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México.**

Asesor del tema:

Dra. Elena Guadalupe Ramírez López

Supervisor Técnico:

Dr. Eugene Athanas Bratoeff Titef

Sustentante:

Leonila Vicuña Flores

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química, UNAM y a la sección 024 del AAPAUNAM que otorgaron el apoyo necesario, a través de la Cátedra Fernando González Vargas 2008-I, para la realización e impresión de esta tesis.

Proyectos CONACYT 52310 y DGAPA IN200708 que otorgaron el soporte financiero para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la Dra. Elena Ramírez López por las enseñanzas compartidas a lo largo del proyecto, por su comprensión, gracias por ser mi guía.

Al Dr. Eugene Bratoeff por su infinita paciencia y apoyo durante toda mi estancia en el laboratorio 125.

A la Dra. Marisa Cabeza Salinas por su apoyo para las pruebas biológicas.

A la M. en C. María Teresa Ramírez Apan gran ayuda para la elaboración de pruebas en líneas celulares.

Al personal académico de la USAI por el apoyo para la realización de los espectros de IR, RMN¹H, RMN¹³C.

A los miembros del jurado por las observaciones y sugerencias hechas a éste trabajo.

A mis padres: Leonila y Elías por su paciencia y enorme cariño durante todos estos años por su esfuerzo en toda su vida para verme convertida en una mujer que la sociedad necesita, porque se que desde el cielo estas orgulloso de mi papi, gracias por todo mami, nunca terminare de pagarles todo lo que han hecho por mi.

A mi hermano José Elías (Toby), por soportarme durante toda su vida, por cuidarme desde mi niñez y lo que le falta.

A mi familia por sus porras para que terminara: Tía Chucha, Lupe, Manuela, Goya, José, a mis padrinos, a mis primos y mis sobrinas (Karen y Paula).

A las personas que ya no están conmigo en este mundo: Luis Felipe e Iliana

A mis amigos: Cesar (por su incesante presión para terminar este proyecto), Luis Antonio, Abraham, Isabel, Alfredo, Edgardo, Chio, Lorena, Irene, Moni (manzanita), Memo.

A Jonathan por su amor y apoyo incondicional durante estos años.

A mis compañeros del laboratorio 125.

A mis compañeros de la Prepa 5.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	3
2.1 Cáncer de próstata	3
2.2 Esteroides	5
2.3 Andrógenos	5
2.4 Regulación de producción de la testosterona	7
2.5 Mecanismos de acción de los andrógenos	10
2.6 La dihidrotestosterona en la función de la próstata	11
2.7 Mecanismos de acción de la enzima 5 α -reductasa	12
2.8 Antiandrógenos	14
2.9 Antiandrógenos no esteroideos	14
2.10 Antiandrógenos esteroideos	16
3. Objetivos	19
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivo específico	19
4. Metodología Experimental	20
4.1 Etapa 1. Síntesis Química	20
4.1.1 Síntesis y caracterización de los compuestos	21

4.1.2 Caracterización de materia prima (3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona)	22
4.1.3 Síntesis de ácido 3 β -hidroxi- 5-pregnen-20-oico(1)	24
4.1.4 Derivados del Derivados del ácido 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-oico	26
4.1.5 Descripción general	26
4.1.5.1 Síntesis de 17- carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (2)	28
4.1.5.2 Síntesis de 17-carboxilato de bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (3)	30
4.1.5.3 Síntesis de 17-carboxilato <i>p</i> -metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (4)	32
4.1.6 Síntesis de derivado 3-oxo-4-androsteno (17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno)	34
4.1.6.1 Descripción general	34
4.1.6.2 Síntesis de 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno (5)	35
4.2 Etapa 2	37
4.2.1 Ensayo in vitro: citotoxicidad en líneas celulares	37

4.3 Etapa 3	40
4.3.1 Ensayo in vitro de la inhibición de la enzima 5 α -reductasa de próstata de hámsteres	40
4.3.2. Obtención de la enzima 5 α - reductasa de próstata de hámster	40
4.3.3. Ensayo in Vitro con la enzima 5 α - reductasa	41
5. Resultados y Discusión	44
5.1 Etapa 1	44
5.2 Etapa 2	51
5.3 Etapa 3	51
6. Conclusiones	53
Bibliografía	54
Apéndice	58



1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata es una enfermedad que se produce cuando células de la próstata mutan y comienzan a multiplicarse descontroladamente. Estas células podrían propagarse (metástasis) desde la próstata a otras partes del cuerpo, especialmente en los huesos y los ganglios linfáticos. El cáncer de próstata puede causar dolor, micción dificultosa, disfunción eréctil, entre otros síntomas. El cáncer de próstata es el cáncer más frecuente, excluyendo a los carcinomas de piel, entre los norteamericanos y europeos. Uno de cada seis hombres será diagnosticado de cáncer de próstata en su vida, pero solo uno de cada 32 morirá por esta enfermedad.

De acuerdo con la evidencia disponible, el desarrollo del cáncer de próstata estaría relacionado con niveles aumentados de algunas hormonas, en particular, de los andrógenos como la testosterona. Actualmente existen diversos tratamientos para combatir el cáncer de próstata como lo son: la prostatectomía (cirugía en donde se elimina la glándula prostática), radioterapia, braquiterapia (implantes de microesferas que emiten radiación), orquiectomía (extirpación de testículos), terapia hormonal, quimioterapia o bien una combinación de todos estos dependiendo del estadio del cáncer (1, 2, 3). Los efectos colaterales provocados por los fármacos utilizados en la terapia hormonal constituyen un factor que



INTRODUCCIÓN

estimula el esfuerzo para buscar nuevas entidades químicas con mayor potencia antiandrogénica y un mínimo de efectos colaterales.

Actualmente, una gran cantidad de antiandrógenos han sido sintetizados, como por ejemplo la finasterida (Proscar) (4) que actualmente es el fármaco de elección para el tratamiento de hiperplasia prostática benigna, ya que inhibe la actividad de la enzima 5α -reductasa (tipo 2) que se encuentra presente en el tejido prostático y es responsable de la transformación de la testosterona (T) a dihidrotestosterona (DHT) (5).

Por lo anterior, en este trabajo se presenta la síntesis de nuevos antiandrógenos con posibilidad para el tratamiento de diversos padecimientos andrógenos-dependientes. Se utilizó como materia prima 3β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (pregnenolona) por su disponibilidad comercial (6-10) y la presencia de las funciones químicas necesarias para la obtención de 17α -carboxiderivados: ácido 3β -hidroxi-5-pregnen-20-oico (1), 17-carboxilato de bencil- 3β -hidroxi-5-androsteno (2), 17-carboxilato de *p*-bromobencil- 3β -hidroxi-5-androsteno (3), 17-carboxilato de *p*-metilbencil- 3β -hidroxi-5-androsteno (4) y 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno (5) propuestos en este trabajo.



2. MARCO TEÓRICO

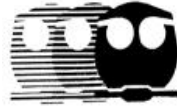
2.1. CÁNCER DE PRÓSTATA.

La próstata tiene dos funciones, una es en el control urinario, ayuda a controlar la velocidad con la que sale la orina, y la otra es la participación en la vida sexual ya que se encarga de secretar líquido durante la eyaculación para la movilidad del espermatozoide en la uretra dando a éste su apariencia blanquecina (5, 11).

La próstata esta formada por muchos tipos de células diferentes, mas del 99% de los cánceres de próstata se desarrollan sobre células de la glándula. La próstata puede ser el origen de metástasis de cáncer de vejiga, colon, pulmón, melanoma, linfoma u otras neoplasias.

La mayoría de los cánceres de próstata crecen muy lentamente y persisten durante mucho tiempo sin causar síntomas importantes. Los estudios de series de autopsias muestran que la mayoría de los hombres mayores que mueren por otras enfermedades, también tienen un cáncer de próstata que nadie había diagnosticado antes.

El cáncer de próstata tiende a ser multifocal y con frecuencia afecta a la cápsula glandular. Al contrario que la hipertrofia benigna de próstata (HBP), el cáncer de próstata predomina en la periferia de la próstata.



Se han establecido algunos factores de riesgo para desarrollar esta enfermedad:

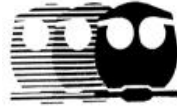
Edad: La probabilidad de tener cáncer de próstata aumenta rápidamente después de los 50 años, más del 70% de los casos son diagnosticados en hombres que tienen más de 65 años.

Raza: El cáncer de próstata ocurre alrededor del 70% mas a menudo en hombres afroamericanos que en hombres blancos, los hombres de ascendencia asiática o los habitantes de las islas del pacifico, tienen las tasas mas bajas de incidencia y mortalidad.

Dieta: La nutrición parece tener un papel importante en el desarrollo del cáncer de próstata. La distribución geográfica de este cáncer muestra valores muy elevados en los países industrializados o desarrollados.

Historia familiar: El cáncer de próstata que ocurre más frecuentemente en algunas familias, sugiriendo que existe un factor hereditario. Tener un padre o un hermano con cáncer de próstata dobla el riesgo de padecer esta enfermedad.

Tabaco: El tabaco, según estudios recientes es también un factor de riesgo para el cáncer de próstata, fumar cigarrillos aumenta la producción de hormonas masculinas, éstas estimulan el crecimiento celular y por lo tanto, el crecimiento de los tumores prostáticos.



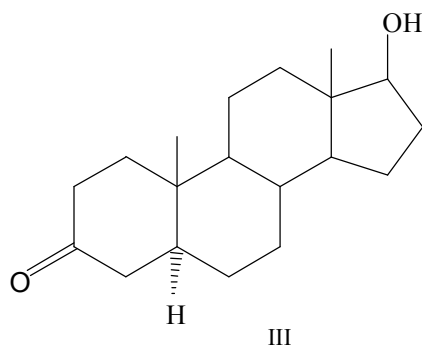
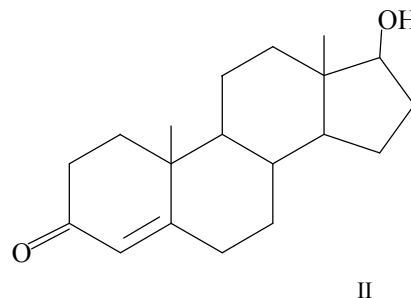
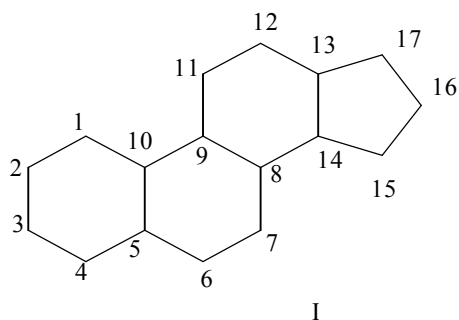
En México a partir de la década de los noventa, los tumores malignos son la segunda causa de muerte en el país (después de las enfermedades cardiovasculares en donde la neoplasia prostática ocupa el tercer lugar, después de la neoplasia cérvico uterina y de mama (12).

2.2. ESTEROIDES.

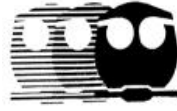
Los esteroides son sustancias que contienen en su estructura base el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (I). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en el reino animal como en el vegetal. Los efectos fisiológicos varían de un compuesto a otro y van desde la actividad de vitaminas hasta las de hormonas sexuales (andrógenos y progestágenos) (13).

2.3. ANDRÓGENOS.

Los andrógenos como la testosterona (T) (II) y la dihidrotestosterona (DHT) (III) se encuentran relacionados con el desarrollo del crecimiento y conservación de los órganos genitales masculinos promoviendo y manteniendo las características sexuales primarias y secundarias tales como, desarrollo del músculo esquelético, crecimiento del pene, crecimiento del escroto y cambio de voz, inhibición en el desarrollo de la función de la glándula mamaria y además de estimular la libido (14).



El exceso de DHT en el organismo está relacionado con una serie de padecimientos andrógeno-dependientes, entre los cuales se encuentran la hiperplasia prostática benigna, el acné, hirsutismo, cáncer prostático, etc. Entre los tratamientos recomendados para abordar los diversos padecimientos andrógeno-dependientes existe la terapia hormonal utilizando antiandrógenos que modifican la producción de andrógenos endógenos (13).

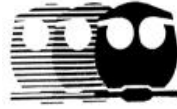


Los andrógenos son compuestos esteroideos conocidos como hormonas sexuales masculinas, las cuales se biosintetizan en los testículos y la corteza adrenal.

2.4. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA TESTOSTERONA.

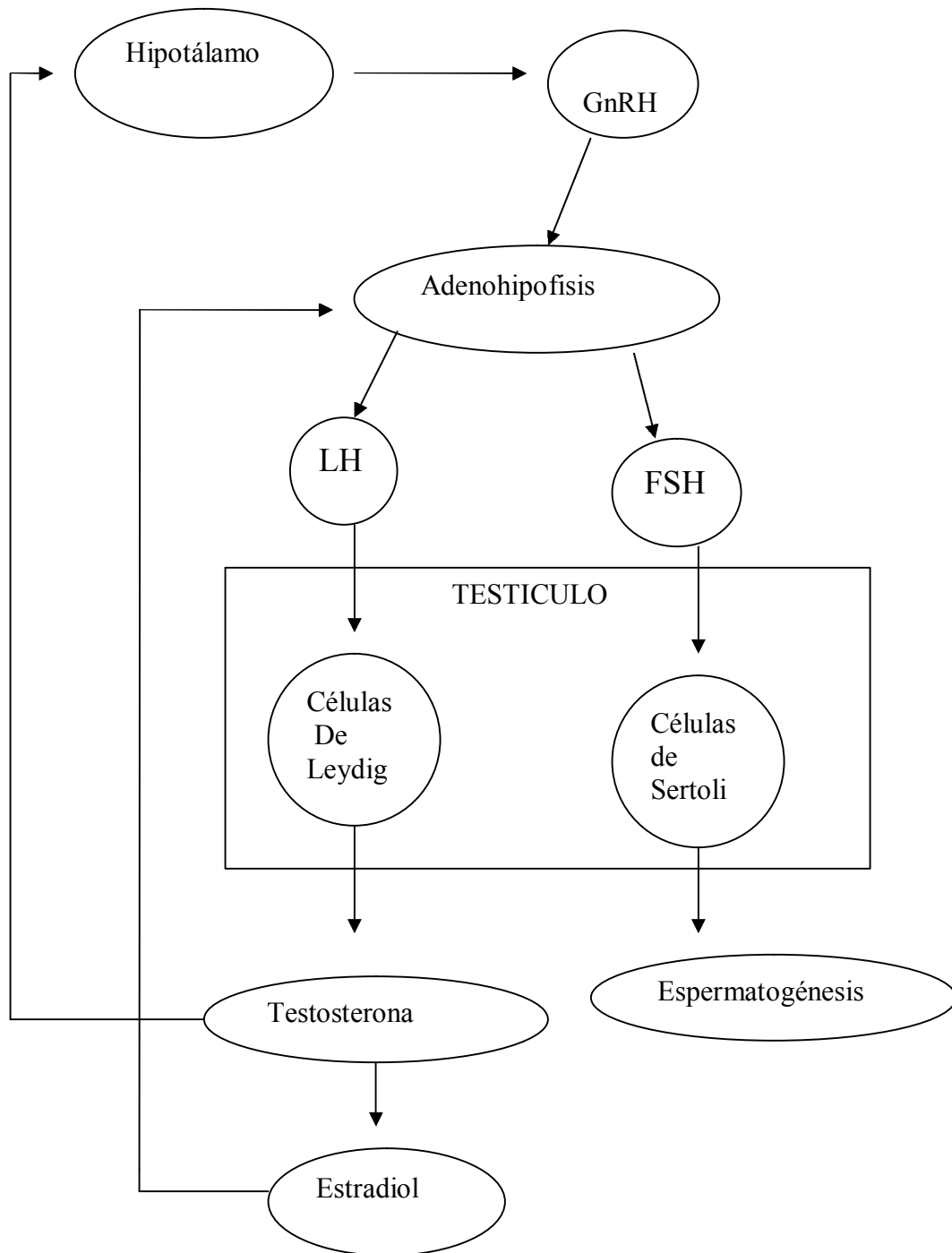
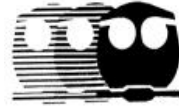
La producción de la T esta regulada por dos ejes conocidos: el hipotálamo-hipófisis-células de Leydig y eje hipotálamo-hipófisis-células de Sertoli. La porción basal del hipotálamo contiene una serie de neuronas peptidérgicas que secretan la hormona liberadora de gonadotropinas, neuronas procedentes del sistema nervioso central (SNC) que controlan la síntesis y liberación de las gónadas, su nombre específico es el factor de liberación de hormona luteinizante (LH), que a su vez estimula la secreción de la hormona estimulante de las células intersticiales (HSCI) y la hormona folículo estimulante (FSH) a nivel de la adenohipófisis. La cantidad de cada hormona liberada depende de la edad y el estado hormonal del individuo.

La LH viaja por la corriente sanguínea hasta llegar a las células de Leydig ubicadas en el testículo. En estas células, la LH se une a los receptores específicos hormonales presentes en las membranas, ésta produce el aumento intracelular de la adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que activa a las enzimas involucradas en la biosíntesis de andrógenos.

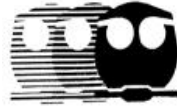


MARCO TEÓRICO

En el eje hipotálamo- hipófisis- células de Sertoli (ubicadas éstas en el testículo), la FSH secretada por las células de la hipófisis anterior actúa sobre las células de Sertoli mediante la unión a receptores específicos de la membrana plasmática. Esta interacción estimula tanto la secreción proteica, como la conversión de T en estradiol y junto a la T regula el proceso de espermatogénesis (15, 16). En este eje se observa la acción de la inhibina, una glucoproteína que sintetizan las células de Sertoli (Esquema 1). Aproximadamente un 95% de la testosterona se produce en los testículos y el 5% restante es liberado por las glándulas suprarrenales (17, 18).



Esquema 1. Regulación de la Testosterona



2.5. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANDRÓGENOS.

La testosterona (T) penetra en el tejido mediante difusión simple y puede actuar de la siguiente manera:

- * Sin ser metabolizada, la T es ligada directamente al receptor intracelular de andrógenos.
- * La T es metabolizada en el retículo endoplásmico por la enzima 5α -reductasa a 5α -DHT, este metabolito presenta mayor afinidad por el mismo receptor intracelular de andrógenos, con lo cual implica el efecto androgénico.

Los complejos T-receptor o DHT-receptor son transferidos al núcleo para unirse a sustancias de DNA altamente específicas que se conocen como elementos de respuesta hormonal (HRE). El complejo hormona-receptor unido, puede tanto estimular o suprimir la expresión de genes específicos adyacentes a los HRE (transformación de RNA) y por lo tanto la síntesis de proteínas codificadas por los genes (19, 20). Una vez que el complejo hormona-receptor ha interceptado con sitios aceptores del DNA, el esteroide libera su receptor desocupando los sitios de éste y sale de las células blanco.

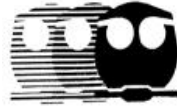


La biogénesis de la T en el organismo se lleva a cabo mediante la degradación enzimática parcial de la cadena lateral del colesterol dando lugar a la formación de la pregnenolona y posteriormente a la producción de la progesterona que es el precursor de la T (21).

2.6. LA DIHIDROTESTOSTERONA EN LA FUNCIÓN PROSTÁTICA.

La transformación de testosterona endógena a su metabolito 5α -dihidrotestosterona (DHT) se lleva a cabo en presencia de la enzima 5α -reductasa y NADPH. La DHT es un potente andrógeno que se relaciona con diversos padecimientos como el acné y el cáncer prostático. La inhibición de la enzima 5α -reductasa por antiandrógenos de tipo esteroidal permite la disminución de la formación de DHT.

El metabolismo de la T y DHT implica la oxidación del C-17 y la reducción de la cetona en C-3 a 3α y 3β - alcoholes, estos se conjugan para ser eliminados del organismo por la orina y heces (22). Aunque la T es el mayor andrógeno circulante, la DHT es el andrógeno más activo en próstata y piel, así mientras que la espermatogénesis, la libido y el aumento de la masa muscular están mediados por la T, el crecimiento de la próstata y el desarrollo de la alopecia androgénica son procesos controlados por la DHT. A nivel celular la función de T y la DHT



implica la estimulación de células epiteliales e inhibir su apoptosis (muerte programada de células) (23).

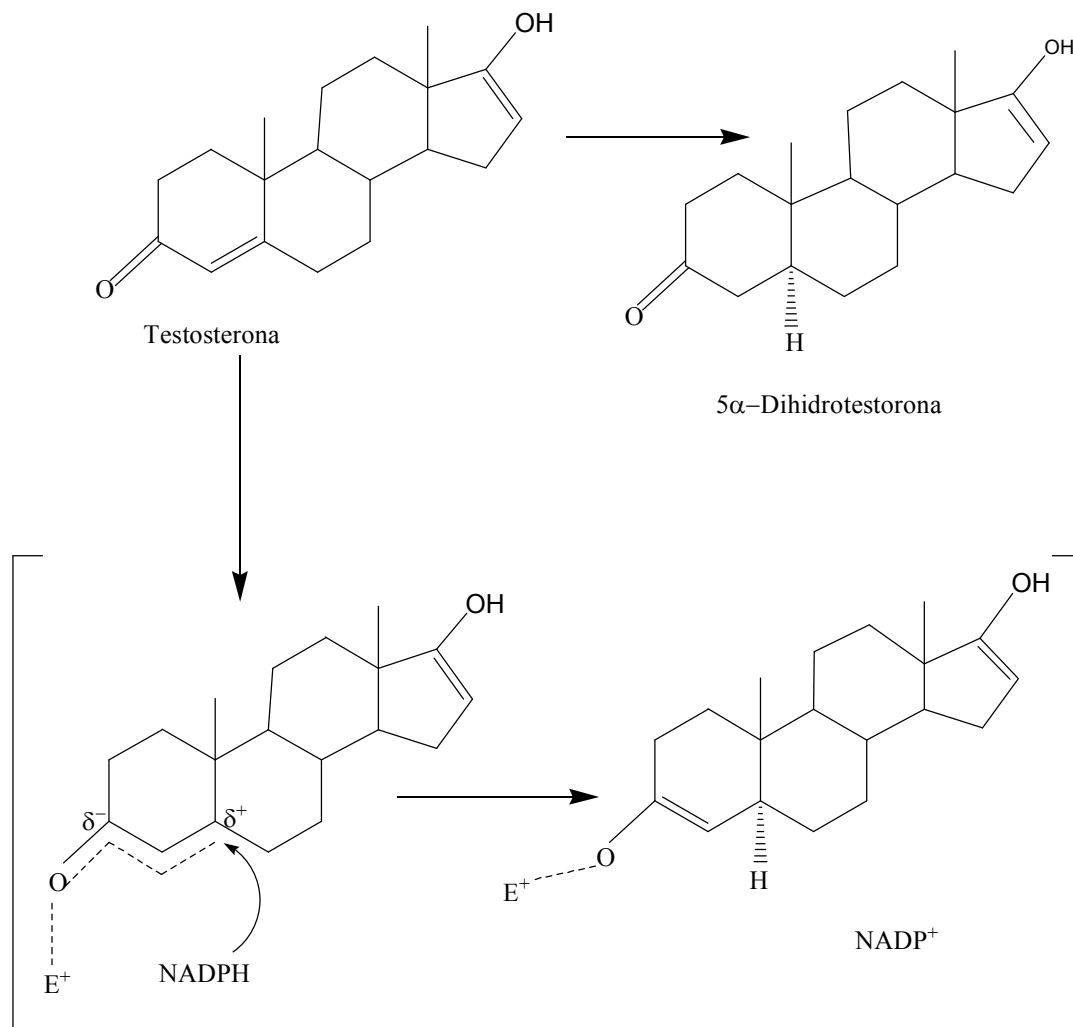
2.7. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ENZIMA 5α -REDUCTASA.

La T entra a la célula blanco en el retículo endoplásmico o en la membrana nuclear para llevarse a cabo la transformación de esta prohormona en DHT; esta reacción está catalizada por la enzima 5α -reductasa, y requiere de un cofactor que es el NADPH (forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) para llevar a cabo la transformación. Esta consiste en la reducción estereo específica de la adicción del hidruro del NADPH a la posición C-5 de la T, el enolato formado en C-3 y C-4 se estabiliza por un residuo electrofílico de la enzima 5α -reductasa. Por tautomerismo, se regenera el grupo carbonilo formándose así la 5α -dihidrotestosterona y la liberación de NADPH (24), (Esquema 2).

La enzima 5α -reductasa se encuentra en dos formas:

Tipo I: isoenzima 5α -reductasa, está predominantemente en glándulas sebáceas de piel y en el hígado, tiene un pH óptimo de 6-9 y requiere de concentraciones elevadas de T para saturarse.

Tipo II: isoenzima 5α -reductasa, está en el tejido genital; como lo son la próstata, testículos y vesículas seminales, su pH óptimo es de 5.5 y por lo contrario a la de tipo I, ésta requiere de concentraciones bajas de T para saturarse (25, 26).



Esquema 2. Mecanismo de acción de la enzima 5α -reductasa.



2.8. ANTIANDRÓGENOS.

Los antiandrógenos ofrecen un tratamiento útil para un gran número de enfermedades mediadas por andrógenos, tales como hirsutismo, acné, seborrea, alopecia androgénica, pubertad precoz y desde luego el cáncer de próstata y la HPB (hiperplasia prostática benigna se caracteriza por un agrandamiento anormal de la próstata y la formación de nódulos); tanto la HPB como el cáncer de próstata tienen características en común como lo es su alta incidencia en la vejez.

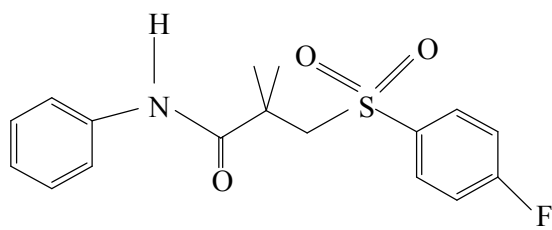
Los antiandrógenos son sustancias químicas que generalmente previenen la expresión de los andrógenos como la T y la DHT en su sitio de acción por bloqueo de los receptores androgénicos en los órganos blanco, por ejemplo: la flutamida (Esquema 3) y el acetato de ciproterona (Esquema 4) (27, 28, 29) o por inhibición enzimática (enzima 5α -reductasa, aromatasa, etc) que interfiere con la biosíntesis de andrógenos.

2.9. ANTIANDRÓGENOS NO ESTEROIDALES.

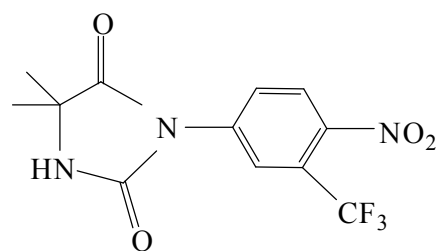
Algunos ejemplos de estos antiandrógenos no esteroideos son; el ketoconazol, la flutamida, anandron, etc, (Esquema 3).

Estos presentan algunas ventajas; ya que tienen afinidad por el receptor debido a su estructura química y por lo tanto reducen del 25 al 30%, el tamaño de la

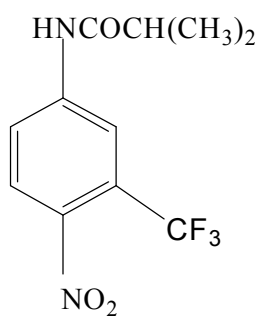
próstata. Las desventajas observadas son; que estimula la erección y ocasiona efectos adversos como la insuficiencia hepática (27-30).



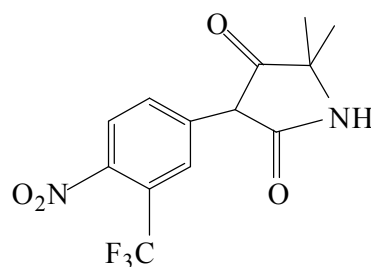
Bicalutamida



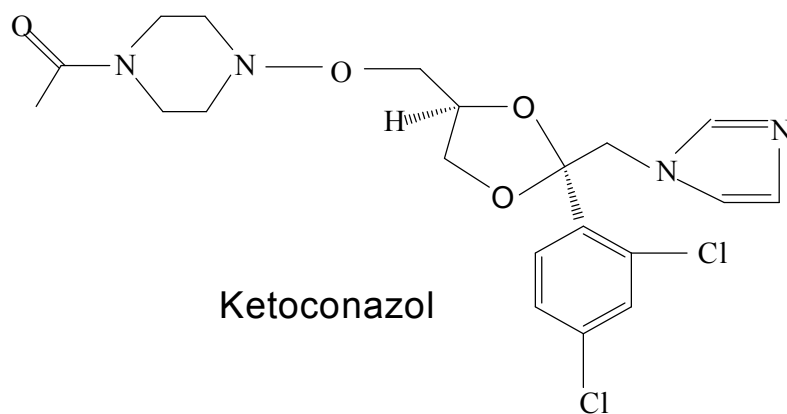
Nilutamida



Flutamida

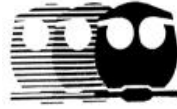


Anandron



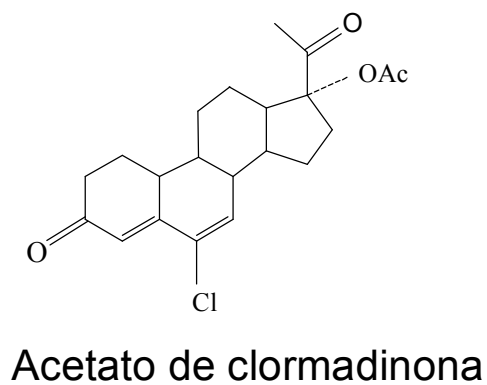
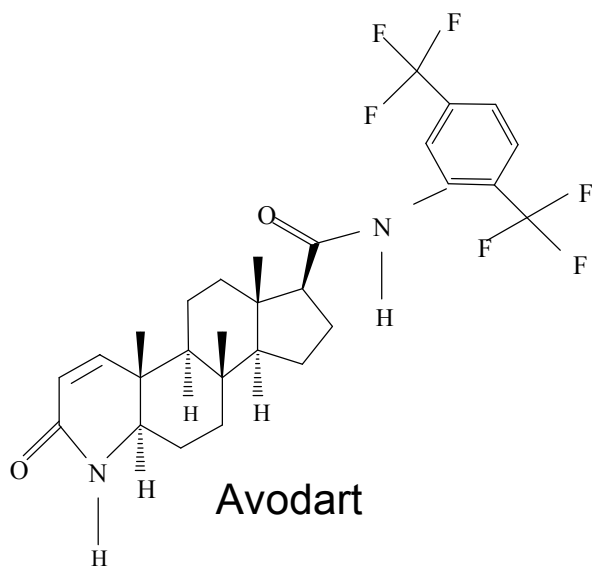
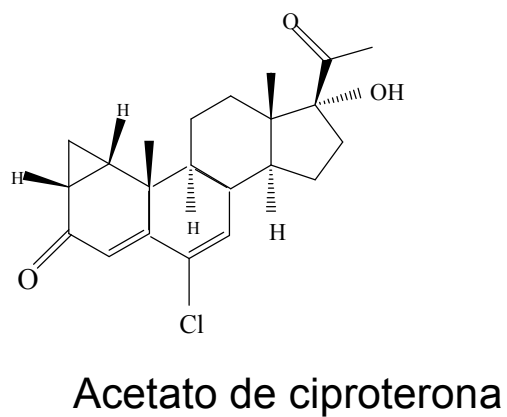
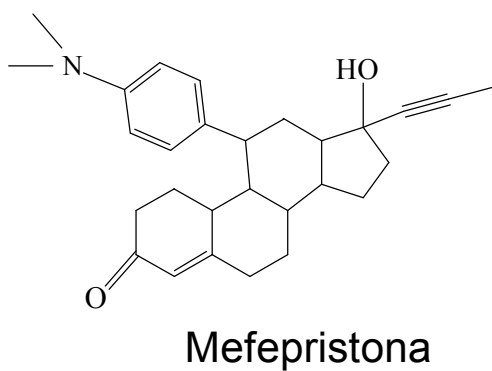
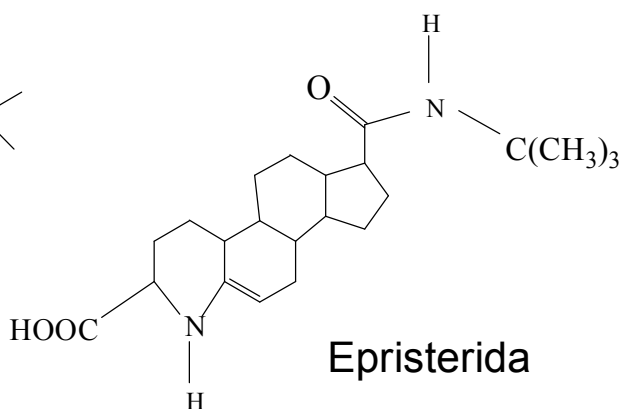
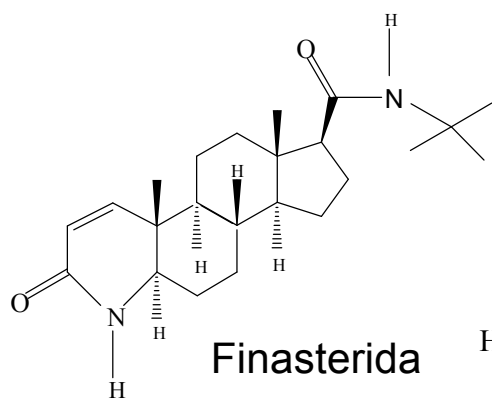
Ketoconazol

Esquema 3. Algunos ejemplos de antiandrógenos no esteroidales.

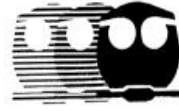


2.10. ANTIANDRÓGENOS ESTEROIDALES.

Estos antiandrógenos derivan de la molécula de la progesterona; algunos ejemplos de estos antiandrógenos esterooidales son la finasterida y el acetato de ciproterona (principales fármacos comerciales) que tienen como ventajas: que actúan específicamente con el receptor androgénico, son de mayor interés terapéutico y tienen un costo relativo bajo en consideración con los no esterooidales. Sus desventajas: reducen la concentración de la testosterona y como consecuencia la actividad enzimática de la enzima 5α -reductasa; por lo tanto, se ve disminuido el tamaño de los órganos sexuales y provocando los efectos progestacionales en el individuo (Esquema 4) (5, 21, 24, 31, 32).



Esquema 4. Algunos ejemplos de antiandrógenos esteroidales.



Para que un derivado de la progesterona se pueda usar como antiandrógeno debe de poseer las siguientes características (33).

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



3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL.

◆ Síntesis, purificación e identificación (métodos espectroscópicos y propiedades físicas) de 17-carboxiderivados del androsteno como antiandrógenos a partir de 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (pregnenolona).

3.2. ESPECIFICOS.

◆ Sintetizar los derivados: ácido 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-oico (**1**) (Pág. 24), 17-carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (**2**) (Pág. 28), 17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (**3**) (Pág. 30), 17-carboxilato de *p*-metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (**4**) (Pág. 32), y 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno (**5**) (Pág. 35) con posible actividad antiandrogénica.

◆ Aislar, purificar y caracterizar mediante propiedades físicas (punto de fusión) y espectroscópicas (IR, RMN¹H, RMN¹³C) los intermediarios y productos finales de la ruta sintética.

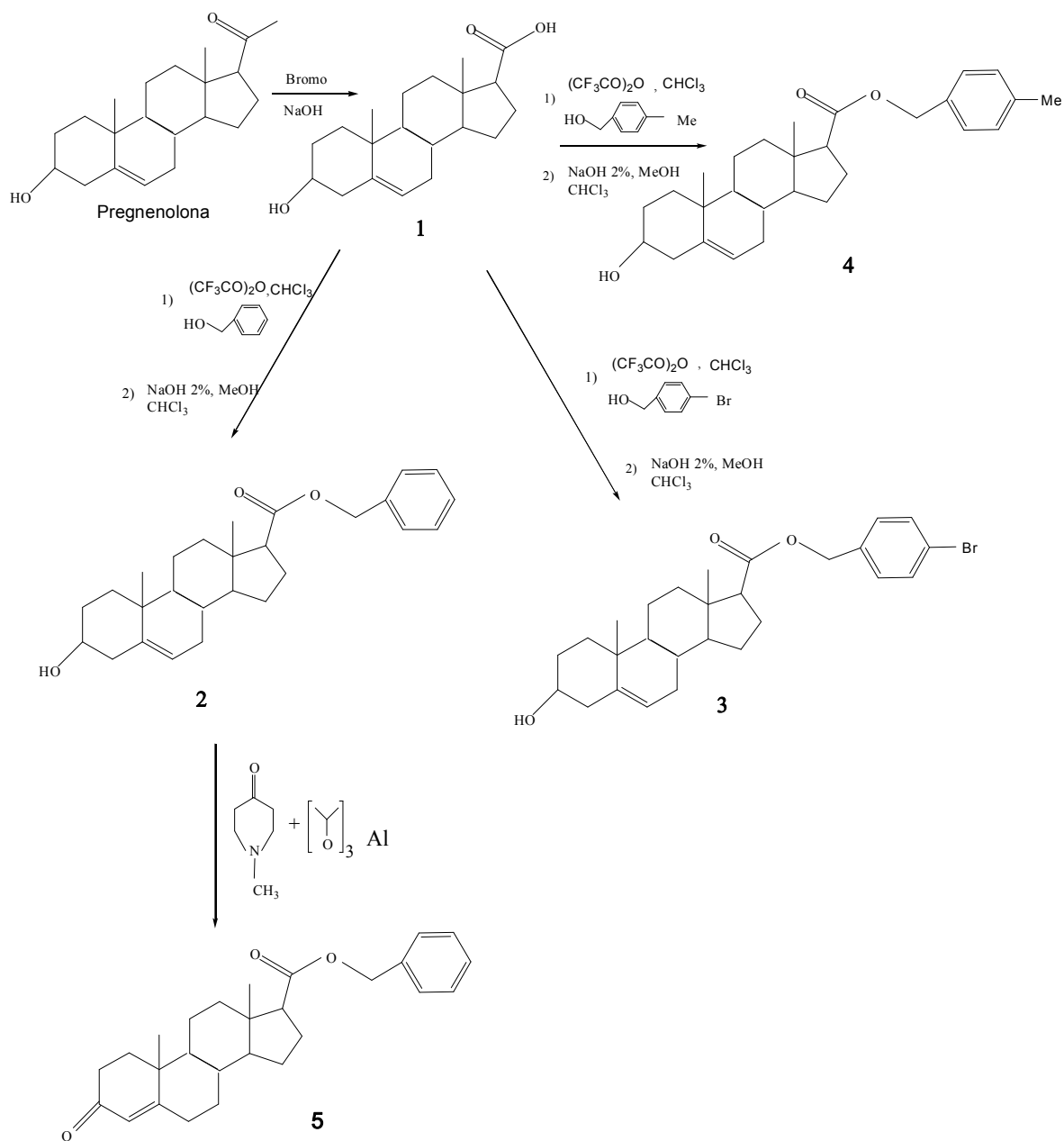
◆ Determinar y comparar la actividad biológica de los compuestos mediante los siguientes ensayos:

- Ensayo in vitro de citotoxicidad en línea celular cancerosa de próstata humana (PC-3)

- Ensayo in vitro de la inhibición de la enzima 5 α -reductasa de próstata de hámsteres.

4.0. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. ETAPA 1. SÍNTESIS QUÍMICA



Esquema 5. Ruta general de síntesis.



4.1.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS.

El monitoreo del avance de las reacciones se realizó con cromatografía en capa fina (CCF), utilizando cromatoplasmas de gel de sílice Merck 7730 y como eluyente diferentes mezclas de hexano–acetato de etilo en diferentes proporciones. Se utilizó una lámpara de luz U.V. ($\lambda = 254 \text{ nm}$) y una solución de CoCl_2 al 1% en H_2SO_4 2N como reveladores.

Los puntos de fusión de los compuestos obtenidos se determinaron en el aparato de Fisher –Johns y no están corregidos.

Las pruebas espectroscópicas se realizaron en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

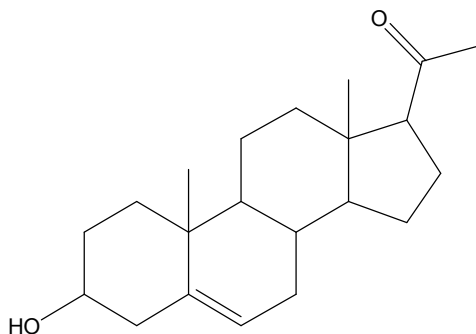
Para la determinación de los espectros de infrarrojo (IR) se utilizó un equipo Perkin Elmer modelo 1600, utilizando la técnica en pastilla de KBr.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN^1H) y de carbono 13 (RMN^{13}C), se determinaron empleando los espectrómetros Varian, Gemini 200 y VRX – 300S, usando CDCl_3 como disolvente y TMS como referencia interna. Para indicar los patrones de acoplamiento se emplearon las siguientes

abreviaturas: s (señal simple), d (señal doble), t (señal triple), dd (señal doble de doble), m (señal múltiple).

El desarrollo experimental de la sección química se realizó en el laboratorio 125, conjunto "E", Departamento de Farmacia de la Facultad de Química.

4.1.2. CARACTERIZACIÓN DE MATERIA PRIMA, 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona



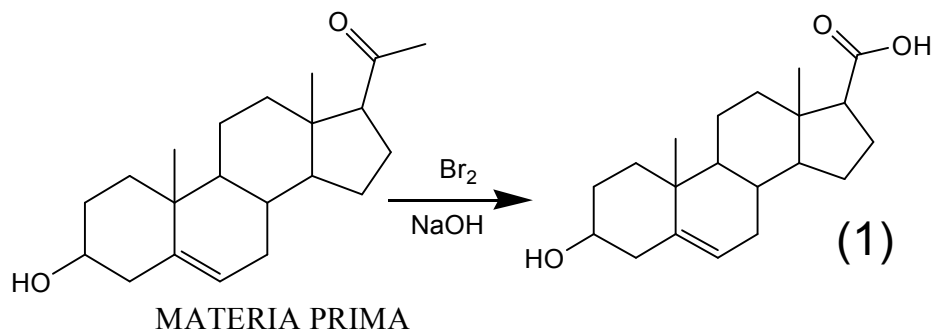
La materia prima 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona es un polvo blanco, que se recristalizó de acetato de etilo; las propiedades físicas se encuentran reportadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físicas y espectroscópicas de 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona.

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	193-195
Formula molecular	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
Peso molecular (uma)	316
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
IR (cm ⁻¹) Espectro 1	
3437.96	OH en C-3
2927.93	C-H de CH ₂ y CH ₃
1681.4	C=O de C-20
1642.22	C=C de C-5
RMN ¹ H (PPM) Espectro 2	
5.35 (d,1H)	H en C-6
3.53 (m, 1H)	H en C-3
2.53 (t,1H)	H en C-17
2.2 (s, 3H)	H en C-21
1.01 (s, 3H)	H en C-19
0.62 (s, 3H)	H en C-18

RMN ¹³ C (ppm), Espectro 3 y 4	
13.19	C-18
19.35	C-19
31.81	C-21
71.63	C-3
121.33	C-6
140.73	C-5
209.59	C-20

4.1.3. Síntesis de (1): ácido 3β-hidroxi-5-pregnen-20-oico.



En un matraz redondo de 250 ml se disolvió con 2.94 g (73.5 mmol) de NaOH en 25 mL de H₂O, se agitó por 10 minutos a 10° C. Después se adicionó lentamente una solución de bromo/dioxano (1 mL de bromo /40 mL de dioxano) y se agitó por 30 minutos a -5°C. Se agregó una solución de 3β-hidroxi-5-pregnen-20-ona (1g, 3.16 mmol), en dioxano (50 mL), por último se adicionaron 11 mL de H₂O y se mantuvo en agitación por 24 horas a una temperatura de 20°C. Al término de este

tiempo se acidificó con HCl hasta pH=1, se filtró y se lavó con H₂O hasta pH neutro, se obtuvo un producto blanco. El sólido resultante se recristalizó con MeOH obteniendo un producto más blanco, con un rendimiento de 94% (0.94 g, 2.95 mmol), Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades físicas y valores espectroscópicos del compuesto 1.

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	246-248
Formula molecular	C ₂₀ H ₃₀ O ₃
Peso molecular (uma)	318
Rendimiento (%)	94
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
IR (cm ⁻¹) Espectro 5	
3427.85	OH- en C-20 y C- 3
2938.88	C-H de CH ₃ Y CH ₂
1293	C-O
1708	C=O
RMN ¹ H (ppm) Espectro 6	
5.2(d, 1H)	H en C-6
4.4 (s, 1H)	OH
3.2 (m, 1H)	H en C-3

1.9 (t, 1H)	H en C- 17
1.0 (s, 3H)	H en C-19
0.7 (s, 3H)	H en C-18
RMN ¹³ C (ppm), Espectro 7, 8	
14	C-18
19	C-19
31	C-17
71	C-3
120	C-6
142	C-5
174	C-2

4.1.4. Derivados del ácido 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-oico: 17-carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (**2**), 17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (**3**) y 17-carboxilato de *p*-metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (**4**).

4.1.5. Descripción general:

En un matraz redondo de 25 mL se mezclaron 200 mg (0.63 mmol) de **ácido 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-oico**, 0.34 mL (0.44 g, 2.09 mmol) de anhídrido trifluoroacético (CF₃CO)₂O y 40 mg (0.21 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico como catalizador, después de agitar por 2 horas se agregaron 2 mmol de alcohol



correspondiente, esta mezcla se agitó por 6 horas a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla de la reacción se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, posteriormente se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro.

El producto crudo se sometió a una hidrólisis con NaOH/MeOH/CHCl₃ a temperatura ambiente por 4 horas. Después de este tiempo de reacción el exceso de disolvente se concentró a presión reducida y se agregó MeOH y H₂O para que precipite el monoéster deseado.

Los productos 17-carboxilato de bencil-3β-hidroxi-5-androsteno (**2**), 17-carboxilato de *p*-bromobencil-3β-hidroxi-5-androsteno (**3**), y 17-carboxilato de *p*-metilbencil-3β-hidroxi-5-androsteno (**4**) se purificaron por cromatografía en capa fina (CCF) con un sistema de elución hexano- acetato de etilo 7: 3% v/v, 2 veces.

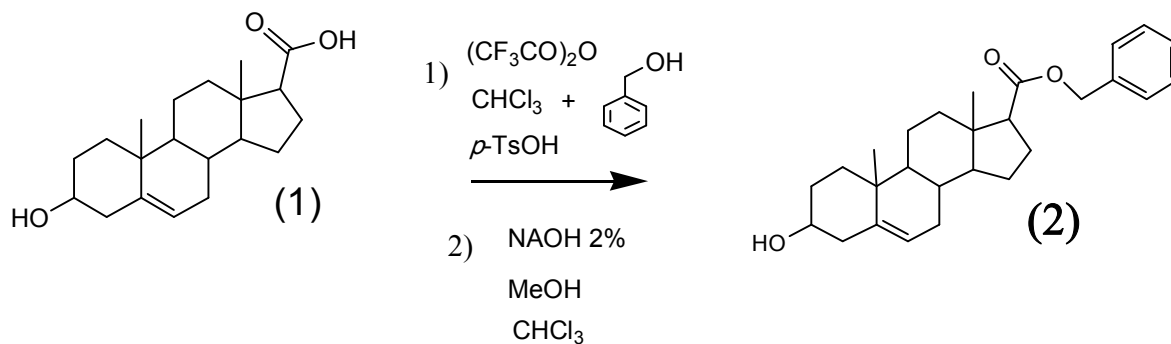

4.1.5.1. Síntesis de 17- carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (2).


Tabla 3. Propiedades físicas y valores espectroscópicos de compuesto 2.

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	107 – 110
Formula molecular	$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_3$
Peso molecular (uma)	408
Rendimiento (%)	82.5
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
IR (cm^{-1}) Espectro 9	
3401	OH de C- 3
3031	=C-H
2935	C-H de CH_3 y CH_2
1600 y 1452	C=C
1730	C=O
752 y 698	C-H fuera del plano aromático

RMN ¹ H (ppm) Espectro 10	
7.4 (m , 5H)	C–aromáticos
5.4 (dd, 1H)	H en C- 6
5.1 (s, 2H)	H en COO- <u>CH</u> ₂ -Ph
3.5 (m, 1H)	H en C-3
1 (s, 3H)	H en C –19
0.8 (s, 3H)	H en C-18
RMN ¹³ C (ppm), Espectro 11 y 12	
14	C-18
20	C–19
32	C–17
66	-COO- <u>CH</u> ₂ -Ph
72	C–3
120	C-6
130	C-aromáticos
136	- CH ₂ - 
140	C- 5
175	C = O

4.1.5.2. Síntesis 17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (3) a partir de ácido 3 β -hidroxi-5-pregnen-20- oico (1).

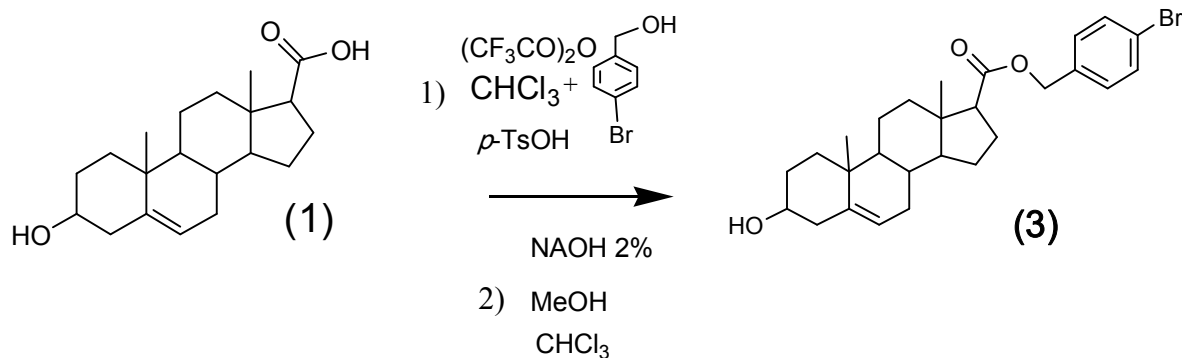
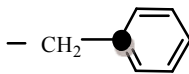
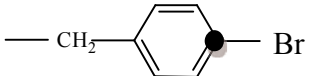


Tabla 4. Propiedades físicas y valores espectroscópicos del compuesto 3.

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	110 – 112
Formula molecular	$\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{O}_3\text{Br}$
Peso molecular (uma)	487
Rendimiento (%)	60
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
IR (cm^{-1}) Espectro 13	
3401	OH en C- 3
3010	=C-H
2935	C-H de CH_3 y CH_2
1731	<u>COOR</u>
1595 y 1450	C=C
842	C-H disustitución 1,4

RMN ^1H (ppm) Espectro 14	
7.4 (m, 4H)	H aromáticos
5.3 (dd, 1H)	H en C- 6
4.9 (s, 2H)	COO- <u>CH</u> ₂ -Ph
3.6 (m, 1H)	H en C- 3
1 (s, 3H)	H en C-19
0.7 (s, 3H)	H en C-18
RMN ^{13}C (ppm), Espectro 15	
18	C- 18
22	C-19
32	C-17
65	COO-CH ₂ -Ph-Br
72	C-3
121	C-6
130	C-aromáticos
136	
141	C-5
163	
175	C=O

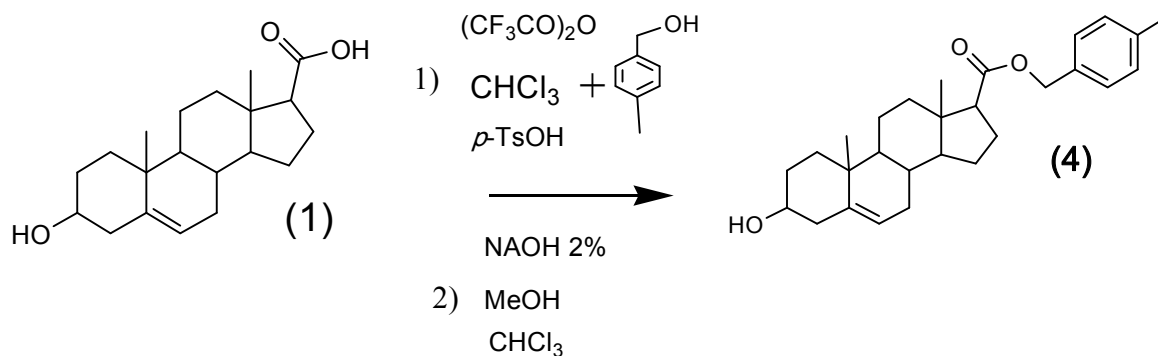
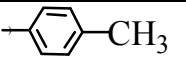
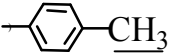
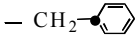
4.1.5.3. Síntesis de 17-carboxilato de *p*-metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno
(4) a partir de ácido 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-oico (1)


Tabla 5. Propiedades físicas y valores espectroscópicos compuesto 4.

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	97 – 100
Formula molecular	C ₂₈ H ₃₈ O ₃
Peso molecular (uma)	422
Rendimiento (%)	68
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
IR (cm ⁻¹) Espectro 16	
3291	OH en C-3
3010	C=C-H
2930	C-H de CH ₂ y CH ₃
1617 y 1450	C=C
1726	C = O de Éster en C – 17
842	C-H disustitución 1,4

RMN ^1H (ppm) Espectro 17	
7.3 (m, 5H)	H en aromáticos
5.3 (dd, 1H)	H en C-6
5.1 (dd, 2H)	COO-CH ₂ -Ph
3.5 (m, 1H)	H en C-3
2.4 (dd, 3H)	
1.0 (s, 1H)	H en C- 19
0.6 (s, 1H)	H en C - 18
RMN ^{13}C (ppm), Espectro 18	
15	
18	C-18
22	C-19
32	C-17
67	-COO-CH ₂ -Ph-CH ₃
73	C-3
122	C-6
130	C-aromáticos
137	
141	C-5
178	C=O

4.1.6. Síntesis del derivado 3-oxo-4-androsteno (17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno).

4.1.6.1 Descripción general

El éster correspondiente al 17-carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (**2**), 0.98 mmol se hizo reaccionar con 1-metil-4-piperidona 12.47 mmol, 2.93 mmol de isopropóxido de aluminio y tolueno (9 mL) como disolvente. La mezcla se agitó por 24 hrs a reflujo y al término de este tiempo se evaporó el exceso de tolueno. Se agregó acetato de etilo y se filtró al vacío, para eliminar el exceso de las sales de aluminio que se formaron en el proceso. Se lavó con NaOH al 2% y después con H₂O hasta pH neutro. Se secó la fase orgánica y se filtró sobre alúmina y fluorisil. Después de evaporar el exceso de disolvente (acetato de etilo), los compuestos se purificaron por cromatografía en capa fina (CCF) con un sistema de elución hexano-acetato de etilo 8:2% v/v 2 veces.

Las constantes físicas y espectroscópicas del compuesto 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno (**5**) se muestran en la Tabla 6.

4.1.6.2. Síntesis de 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno (5).

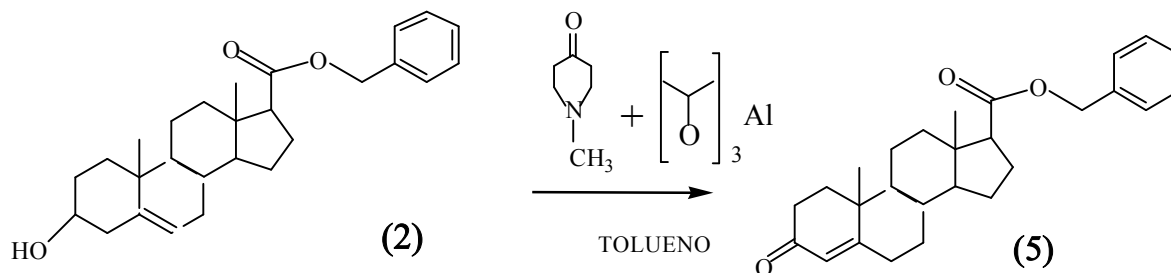
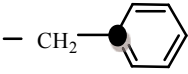


Tabla 6. Propiedades físicas y espectroscópicas de compuesto 5.

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	115 – 117
Formula molecular	C ₂₇ H ₃₄ O ₃
Peso molecular (uma)	406
Rendimiento (%)	40
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
IR (cm ⁻¹) Espectro 19	
3030	C=C-H
2930	C-H de CH ₂ y CH ₃
1730	C=O de ester en C-17
1674	C=O de C-3
1615 y 1452	C=C
749 y 698	C-H disustitución aromática 1,4

RMN ¹ H (ppm) Espectro 20	
7.3 (m , 5 H)	H aromáticos
5.7 (dd , 1H)	H en C-4
5.1 (dd, 2H)	<u>CH₂</u> bencil
1.16 (s, 1H)	H en C-19
0.7 (s, 1H)	H en C-18
RMN ¹³ C (ppm), Espectro 21 y 22	
66	<u>CH₂</u> -bencil
120	C-4
128	C de aromáticos
138	C- 5
172	
175	C-20
200	C-3



4.2. Etapa 2

4.2.1. Ensayo in vitro: citotoxicidad en líneas celulares.

Las pruebas biológicas de actividad citotóxica se realizaron bajo la supervisión de la M. en C. María Teresa Ramírez Apan (Instituto de Química, UNAM).

La evaluación citotóxica de los compuestos; 3- β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (**MP**), ácido 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-oico (**1**), 17-carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (**2**), 17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (**3**) y 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno (**5**) se realizó en la línea celular cancerosa de próstata humana (PC-3). Cabe mencionar que el compuesto **4** (17-carboxilato de *p*-metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno) no se evaluó por este método debido a que fue sintetizado posteriormente al periodo de evaluación de los otros compuestos. El ensayo inició al colocar 100 μ L de la línea celular y medio de cultivo en una placa de 96 pozos en donde se incubaron por 24 horas.

Por otra parte se preparó una solución patrón en dimetilsulfóxido (DMSO) de cada compuesto a evaluar, dicha solución se adicionó al pozo de la línea celular en 100 μ L de medio de cultivo, la concentración final de cada compuesto fue de 50 μ M.



Se incubó por 48 horas (plato experimental). Adicionalmente se preparó otro pozo en el cual se adicionó únicamente medio de cultivo, este último se incubó por una hora (plato basal); ambas incubaciones se llevaron a cabo a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa. Al finalizar el tiempo de incubación se fijaron los cultivos celulares in situ con la adición de 50 µL de ácido tricloroacético 50% (p/v) frío, se incubó por 1 hora a 4°C, se desechó el sobrenadante y se lavaron 5 veces con agua desionizada y se dejó secar por 24 horas, posteriormente se tiñeron con 100 µL de sulforhodamina B (SRB) (0.4% p/v en 1% ácido acético) el pozo se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se hicieron lavados con una solución de ácido acético al 1% y se dejó secar por 24 horas. Las células fijadas se resuspendieron utilizando 10 nM de buffer Tris, pH=10 en agitación por 5 minutos. Finalmente se determinó la densidad óptica a 515 nm utilizando un lector ELISA.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de crecimiento celular a 50 µM y están representados en la Tabla 7.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de crecimiento en la línea celular PC-3 (cáncer de próstata).

Muestra	% inhibición de crecimiento en PC-3
Materia prima	24.1
Compuesto 1	10.4
Compuesto 2	16
Compuesto 3	26.5
Compuesto 5	86.7
Acetato de ciproterona (referencia)	50.5



4.3. Etapa 3

4.3.1. Ensayo in vitro de la inhibición de la enzima 5 α -reductasa de próstata de hámsteres.

Para determinar esta actividad biológica, las pruebas se realizaron en el laboratorio 006 del Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal de la UAM Xochimilco, por la Dra. Marisa Cabeza.

Para estas pruebas de estudio el equipo utilizado fue el siguiente:

- ◆ Un contador de centello (para medir radioactividad) Liquid Scintillation Analyser, modelo Tricards 2100 TR – Packard con impresora Panasonic Quiet KX- P3123,
- ◆ Una incubadora modelo BMR-18/25, una centrífuga modelo Allegra 6R Beckman,
- ◆ Micro pipetas electrónicas Advanced Electronic Pipette Rain modelo Edp 3, con capacidad para 10, 100 y 1000 μ L.
- ◆ Lámpara de U.V. ($\lambda = 254$ nm).

4.3.2. Obtención de la enzima 5 α -reductasa de próstata de Hámster

Se sacrificaron 72 hámsteres macho con aproximadamente 5 días de castración, para posteriormente separar las próstatas. Se limpiaron y pesaron por separado, se homogenizaron en un buffer TEDM sin DTT en 3 volúmenes con relación a su

peso. Los homogeneizados de ambos tejidos se centrifugaron por 1 hora a 140 000 g a 4°C. Se separó el pellet del sobrenadante. El sobrenadante se utilizó como citosol para el ensayo con los receptores y el precipitado se resuspendió en 3 volúmenes de medio A pH=6.5, el cual se preparó a partir de sacarosa 0.32 M, 0.1 nM de DTT y buffer de fosfatos 20 mM. La solución de primulina se preparó a partir de 10 mg de primulina que disuelven con 400 mL de una mezcla agua-acetona (1:5% v/v).

Se tomaron alícuotas de 1 mL, tanto para la fracción citosólica como para la microsomal, las cuales se congelaron a -70°C para su posterior utilización. Se determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford (34) que es usado como la fuente de la enzima 5 α -reductasa en su isoforma 2 como la fracción microsomal predominante.

4.3.3. Ensayo in Vitro con la enzima 5 α -reductasa

Se preparó una serie de tubos con concentraciones entre 2×10^{-2} mM de los compuestos, 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (**MP**), ácido 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-oico (**1**), 17-carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (**2**) y 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno (**5**) además de 2 tubos controles que solo contienen T [H³]. Los compuestos **3** (17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno) y **4** (17-carboxilato de *p*-metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno) no se



evaluaron por este método debido a que del compuesto **3** no se tenía la cantidad suficiente para el ensayo y el compuesto **4** se sintetizó después de realizada la evaluación biológica.

A todos los tubos se les adicionó un volumen conocido de T [H^3] suficiente para alcanzar una concentración final de 2 nM. Se colocaron los tubos a baño maría y atmósfera de nitrógeno para evaporar el disolvente hasta sequedad. Se adicionaron los reactivos en el siguiente orden: 640 μ L de buffer de fosfatos pH=7, 160 μ L de fracción microsomal de vesícula seminal, 100 μ L de DTT 1 mM y 100 μ L de NADPH 2 mM con los que se dio inicio a la reacción. Los tubos se agitaron en un vortex y se incubaron a 37°C por 1 hora; al término de la incubación se agregó 1 mL de diclorometano para detener la reacción y se agitó en un vórtex por 1 minuto.

La fase orgánica se extrajo con diclorometano, en la cual se encuentra la DHT [H^3] formada. Se realizaron 4 extracciones más, y el diclorometano se evaporó en baño maría hasta sequedad. A todos los tubos incluyendo los controles se les adicionaron 10 μ L de DHT (no reactiva, 1 mg/mL y 6 gotas de MeOH). Los contenidos de los tubos se aplicaron en las placas cromatográficas para separar la DHT [H^3] que se forma, con un sistema de elución cloroformo-acetona 9:1% v/v. Estas placas se observaron bajo luz U.V. a 254 nm y se marcó la zona correspondiente a la testosterona. Posteriormente las placas de CCF se revelaron

con una solución de primulina y se observaron bajo luz U.V. a 304 nm, se marcaron las zonas correspondientes a la DHT [H^3], se cortaron y se colocaron en viales, se les adicionó 5 mL de líquido de centello Ultima Gold y finalmente se determinó la radioactividad en el analizador de centello.

La actividad de la enzima se calculó con los controles que fueron incubados en presencia de T [H^3]. Se trazó una curva y se calculó la concentración del compuesto necesaria para inhibir el 50% de la conversión de T [H^3] a la DHT [H^3] (IC_{50}). Todo esto se hizo por duplicado y los datos obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Inhibición de la enzima 5α -reductasa

Compuesto	IC_{50} Valor
Finasterida (referencia)	8.5nM
Materia prima	No presento actividad
Compuesto 1	19.9 μ M
Compuesto 2	3.9 nM
Compuesto 5	13 nM



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ETAPA 1.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS

La materia prima (**3 β -hidroxi-5 pregnen-20-ona**) fue caracterizada de acuerdo a los siguientes datos espectroscópicos: en el IR (espectro 1) se observó la presencia del alcohol secundario en 3437 cm^{-1} , el doble enlace de C-5 y C-6, con la señal en 1642 cm^{-1} y una banda intensa correspondiente al carbonilo de la cetona en C-20 en 1681 cm^{-1} .

En RMN ^1H (espectro 2) las señales en 0.62, 1.01 y 2.2 ppm que integran para 3H cada una, se asignaron a los carbonos C-18, C-19 y C-21, respectivamente. En 5.3 ppm se observa una señal que integra para un protón que se asigna al protón vinílico en C-6, para 3.53 ppm la señal es asignada al protón base en C-3, por último, para C-17 el triplete en 2.53 ppm.

La RMN ^{13}C (espectros 3 y 4) registra señales en 13.19 ppm, 19.35 ppm y 31.81 ppm los cuales pertenecen al C-18, C-19 y C-21, respectivamente. El desplazamiento registrado en 71.63 ppm corresponde al C-3 y para los C-5 y C-6 las señales en 121 ppm y 140 ppm.



Compuesto 1: ácido 3 β -hidroxi- 5-pregnen-20-oico.

El compuesto se obtiene por una reacción de oxidación de la cetona en C-20 a través de la llamada reacción de haloformo (35) en donde una metilcetona se trihalogena y posteriormente por tratamiento básico se efectúa la ruptura para obtener el carboxilato correspondiente y el haloformo (bromoformo). Al acidular la mezcla anterior se obtiene el ácido carboxílico en el anillo D del esteroide (compuesto 2) con un rendimiento del 94%.

Para este compuesto el análisis de su espectro de IR (espectro 5) mostró una banda intensa en 3427 cm^{-1} correspondiente a la banda de estiramiento -OH en C-20 y C-3. En 2938 cm^{-1} se presenta el estiramiento de C-H en metilos y metilenos, en 1708 cm^{-1} la banda asignada al carboxilo del grupo ácido en C-20 que se complementa con la banda de 1293 cm^{-1} correspondiente a C-O.

En RMN ^1H (espectro 6), además de las señales en 0.7 ppm y 1 ppm, que integran cada una para tres protones asignados a H-18 y H-19, en 1.9 ppm se observa un triplete asignado al protón en C-17. En 3.2 ppm tenemos una señal múltiple para un protón que corrobora la presencia del OH en C-3 y en 5.2 ppm se observa una señal que se asignó al protón vinílico en C-6.

En el espectro de RMN ^{13}C (espectros 7 y 8) se confirma la oxidación del metilo en C-20 ya que no aparece la señal en 31.81 ppm de C-21 y se modifica el valor



de C-20 apareciendo a 174 ppm. Las señales registradas en 120 y 142 ppm nos indican que se conserva el doble enlace entre C-5 y C-6.

El siguiente paso en la síntesis fue la esterificación del grupo ácido en C-20 para obtener los compuestos **17-carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (2)**, **17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (3)** y **17-carboxilato de *p*-metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (4)**. La reacción se llevó a cabo con el anhídrido trifluoroacético, el ácido *p*-toluensulfónico como catalizador y el alcohol correspondiente. En el primer paso se formó el anhídrido mixto aciloiloxitrifluoroacético que reaccionó con cada bencilalcohol originando los diésteres 3-trifluoroacetoxi-17(bencil)-5-androsteno correspondientes, los cuales se detectaron por CCF. Los derivados obtenidos se aislaron y se sometieron a una hidrólisis básica para desproteger el alcohol en C-3 y así generar los ésteres correspondientes, **17-carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (2)**, **17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (3)** y **17-carboxilato de *p*-metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (4)**.

Compuesto 2: 17-carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno. Este compuesto fue obtenido por esterificación con el alcohol bencílico. En esta reacción se obtuvo un rendimiento del 82.5 %.

En el IR (espectro 9) se observa la banda a 3401 cm⁻¹ correspondiente al alcohol en C-3. En 3031, 1600 y 1452 cm⁻¹ se verifica la presencia de



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

instauraciones sp^2 . La señal a 2935 cm^{-1} se asignó a la vibración de C-H de los grupos metilo y metilenos y la señal en 1730 cm^{-1} corresponde al carbonilo del éster formado. En 752 y 698 cm^{-1} se observa la vibración C-H fuera del plano correspondiente al anillo aromático.

En RMN ^1H (espectro 10) se observan las señales en 0.8 ppm y 1.0 ppm que integran cada una para tres protones asignados a H-19 y H-18, respectivamente, las cuales se mantienen constantes con respecto al compuesto **ácido 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-oico**. Una señal múltiple en 3.5 que integra para 1H se asignó al H-3. En 5.1 ppm se observa la señal del metileno del grupo bencilo. En 5.4 tenemos un doble de dobles que integra para 1H del C-6. La presencia de una señal múltiple en 7.4 ppm que integra para 5H es el indicativo de la presencia de protones aromáticos.

En el espectro de RMN ^{13}C (espectros 11 y 12) se observan las señales del carbonilo en 175 ppm y en 120 y 140 ppm los carbonos vinílicos C-6 y C-5. En 66 ppm aparece el metileno del bencilo. En 14 ppm y 20 ppm se observa la presencia de C-19 y C-18, respectivamente.



Compuesto 3: 17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno.

En el espectro de IR (espectro13), aparece en 3401 cm^{-1} la señal del OH correspondiente a C-3. En 2935 cm^{-1} se observan las señales de alargamiento de C-H y en 1731 cm^{-1} se observa el carbonilo del éster; en 3010, 1595, 1450 y 842 cm^{-1} observamos la presencia de instauraciones sp^2 .

En el espectro de RMN ^1H (espectro 14), aparecen en 7.4 y 7.2 dos señales múltiples integrando para 4H que nos muestran la presencia de H aromáticos y en 5.3 una señal doble de doble para el protón en C-6. En 4.9 ppm se asigna la señal doble de doble que integra para 2 protones correspondientes al metileno del grupo bencilo. El resto de las señales no cambia.

En el espectro de RMN ^{13}C (espectro 15) se observan señales en 121 y 141 ppm que se asignan al doble enlace C-6 y C-5. El carbonilo del éster se observa en 175 ppm. En 65 ppm se observa la señal de metileno del grupo *p*-bromobencilo. En 163 ppm se observa la señal del C-aromático que sostiene al bromo. En 18 y 22 ppm se encuentran las señales correspondientes a C-19 y C-18.



Compuesto 4: 17-carboxilato de *p*-metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno.

Nuevamente en el espectro de IR (espectro 16) aparece en 3291 cm^{-1} la señal de alcohol que corresponde al C-3, en 2853 cm^{-1} el C-H de metilos y metilenos y en 1726 cm^{-1} se observa la señal del carbonilo del éster.

En el espectro de RMN ^1H (espectro 17) aparecen señales arriba de 7.05 correspondientes a los protones aromáticos, en 5.3 ppm está la señal correspondiente al C-6, en 5.1 ppm se observa la señal doble de doble que integra para 2 protones correspondientes al metileno bencílico, y en 3.5 ppm una señal múltiple que integra para un protón correspondiente a H-3. El desplazamiento químico de las señales para los protones en C-18 y C-19 permaneció como en la materia prima.

En el espectro de RMN ^{13}C (espectro 18) el carbonilo del éster se observa en 178 ppm, en 122 y 141 ppm se encuentran las señales correspondientes a los carbonos C-6 y C-5. En 73 ppm se observa la señal del metileno bencílico y en 130 ppm se encuentran las señales para los C-aromáticos.

Compuesto 5: 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno.

Este compuesto se preparó haciendo una oxidación del alcohol en C-3 por medio de la reacción conocida como Oppenauer (36) para obtener el sistema 4-en-3-ona en la molécula esteroideal. La reacción implicó la formación del alcóxido de



aluminio y la presencia de la metil-4-piperidona lo que permitió la formación del sistema conjugado que involucra los anillos A y B del esteroide. El producto se obtuvo con un rendimiento del 40%.

En el espectro de IR (espectro19) de este compuesto las señales cambian notablemente con respecto del compuesto 2 ya que por una parte, no se aprecia la señal del alcohol y en su lugar se observa en 1674 cm^{-1} la señal correspondiente al C=O en C-3. Otras señales que se aprecian son en 2930 cm^{-1} la señal de vibración de grupos C-H de CH_2 y CH_3 , en 1730 la correspondiente al carbonilo y en 3030 , 1615 y 1452 , 749 y 698 cm^{-1} se confirma la presencia de insaturaciones (alifática y aromática).

En el espectro de RMN ^1H (espectro 20), en 7.3 ppm se observan los protones aromáticos y en 5.7 ppm se observa el protón en C-4. Los protones restantes no presentan alteración sobresaliente en su desplazamiento.

En RMN ^{13}C (espectros 21 y 22) encontramos a 120 y 138 ppm los carbonos correspondientes al doble enlace C-4 y C-5, en 128 ppm los carbonos aromáticos siguen sin cambios. En 175 ppm se asigna la señal para C-20 y en 200 ppm para C-3.



5.2. ETAPA 2.

En el ensayo de citotoxicidad (tabla 7) se utiliza como referencia el acetato de ciproterona (fármaco comercial) que inhibe en 50.5% el crecimiento de la línea celular de cáncer de próstata. El compuesto **5** (17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno) presenta mayor valor de inhibición (86.7%), con respecto al compuesto **2** (16% de inhibición) que presenta el alcohol libre en C-3 y a los otros compuestos evaluados. Al parecer la presencia del sistema 4-en-3-ona en el esteroide le confiere mayor actividad frente a este tipo de ensayo. Por otra parte la presencia de un átomo de bromo en el anillo aromático incrementa la actividad inhibitoria del crecimiento celular (26.5%) con respecto al compuesto **2** que no tiene bromo.

5.3. ETAPA 3.

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para la inhibición de la enzima 5 α -reductasa para los compuestos: ácido 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-oico (**1**), 17-carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (**2**), 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno (**5**). La finasterida se ocupa como estándar para la inhibición de la enzima 5 α -reductasa; estos valores se dan en IC₅₀ (cantidad de sustrato necesaria para inhibir al 50% de la actividad de la enzima). En este caso el compuesto que actúa como mejor inhibidor de la enzima 5 α -reductasa es el compuesto **2** ya que



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

presenta un menor valor de IC_{50} (3.9 nM) comparado con el de la finasterida que es de 8.5 nM y a los otros compuestos sintetizados. Al parecer la presencia del anillo aromático en la molécula le confiere mayor actividad. La baja actividad mostrada por el compuesto **1** se puede atribuir a su baja solubilidad lo que interfiere en el ensayo biológico.



6. CONCLUSIONES

- Se logró exitosamente llevar a cabo la síntesis del ácido 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-oico (1), 17-carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (2), 17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (3), 17-carboxilato de *p*-metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno (4) y 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno (5).
- Se llevó a cabo la determinación de la actividad biológica, por medio de un ensayo in vitro midiendo la toxicidad en líneas celulares, comprobando que el compuesto 5 (17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno) en el modelo de línea celular cancerosa de próstata humana (PC-3) es más activo que el compuesto de referencia, acetato de ciproterona.
Para el ensayo in vitro de la inhibición de la enzima 5 α -reductasa de próstata de hámsteres, el compuesto 2 (17-carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno) es el más activo comparado con el estándar finasterida.
- Los resultados generados en este trabajo contribuyen a los estudios de la relación estructura química-actividad biológica de un grupo de compuestos esteroidales con potencial actividad antiandrogénica lo que nos permitirá proponer algunas modificaciones necesarias en una molécula esteroideal del tipo androsteno para obtener mayor actividad antiandrogénica.



BIBLIOGRAFÍA

1. Ellen, M.; Suhuck, H. The endocrinology of prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol.* **2001**, *86*, 3467.
2. Brawley, O. W. *Hormonal prevention of prostate cancer. Urologic oncology* **2003**, *21*, 67.
3. Metcalf, BW.; Levy, MA.; Holt, D. Inhibitors of steroid 5 α -reductase in benign prostatic hyperplasia. *Pharmacol Sc.* **1989**, *10*, 491.
4. Mc, Connel, J.; Wilson, D.; George, F. G.; Seller, J.; Pappas, F.; Stoner, E. Finasteride, an inhibitor of 5 α -reductase. *J. Clin. Endocrinol.* **1992**, *74*, 505.
5. Ramírez. E. Síntesis de 6-halo-16-beta metil-17alfa valeriloxi-4, 6-pregnadien-3, 20-diona como antiandrógenos. Tesis de Maestría, Facultad de Química. UNAM, **1998**.
6. Lehmann, F. A.; Bolivar, A.; Quintero, R.; *Rev. Soc. Quim. Mex.* **1970**, *14*, 133.
7. Marker, E. R.; Rohrmann, E. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 518.
8. Marker, E. R.; Tsukamoto, T.; Turner, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 2525.
9. Rosenkranz, G. *Steroids* **1992**, *57*. 409.
10. Lehmann, F. A.; Bolivar, A.; Quintero, R. *J. Chem.* **1973**. *50*,195.
11. Fruzzeetti, F.; Bersi, C.; Parrini, D.; Ricci, C.; Genazzani, A. R. *Fertility and Sterility* **1999**, *64*, 413.
12. Informe de Secretaria de Salud, **2004**, INEGI.



13. Tayler, V. *Pharmacognosy*, Editorial Lea & Febiyer, 8^a Edición, Philadelphia, USA. **1981**, Cap 7.
14. Wilson, J. D. Recen studies on the mechanism of action of testosterone. *New England J. Med.* **1972**, *131*, 1284.
15. Newsholme, E.A.; Leech, A.R. *Bioquímica Medica*, Cap. 20, España, **1986**, 189.
16. Williams, R.H. *Tratado de Endocrinología*, Cap. 6, España, **1985**, 308.
18. Scott, J.; Engel, L. *Mechanism of Action of Steroid Hormones*, New York, **1961**, 20
19. Scholster, D.; Burstein, S.; Cooke, B. *Molecular Endocrinology of Steroid Hormones*, Wiley, **1976**, 4.
20. Hippaka, R.A.; Shutsung, L. *Molecular mechanism of androgen action* **1998**, *9*, 317.
21. Heinlein, C.A.; Chang, C. Androgen receptor coregulators: an overview. *Endocrin, Rev.* **2002**, *23*, 175.
22. Munguía, A. Derivados de la pregnadiona con un grupo electronegativo en C-3 como antiandrógenos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, 2003.
- 23 Goodman, G. A.; Gilman, L. S. Las bases farmacológicas de la terapéutica, **1994**, 1531.
24. Mc Connell, J.; Stoner, E. 5 α -reductase inhibitors. *Advanced in protein chemistry*, **2001**, *56*, 143.



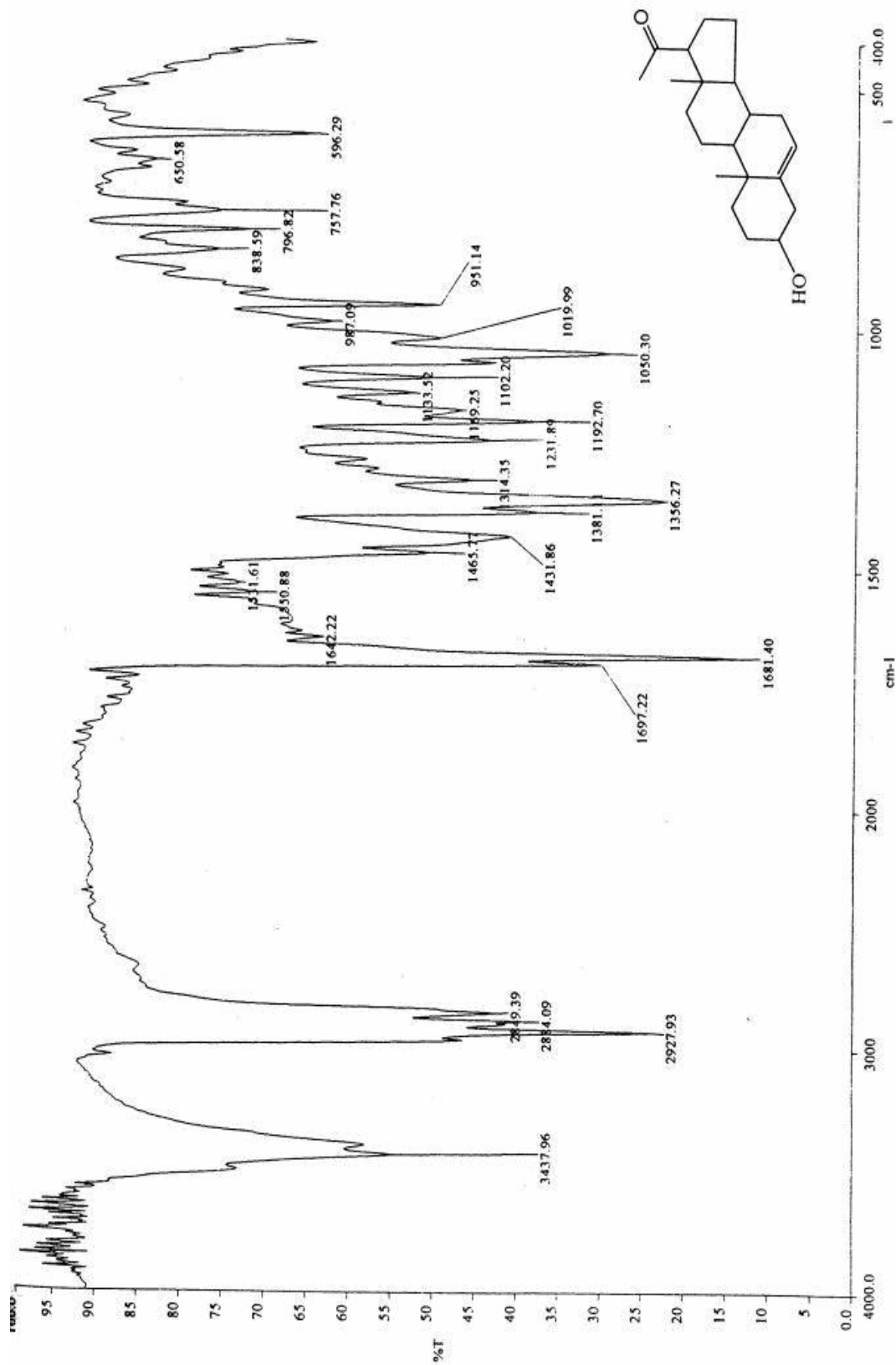
25. Ramírez, E. Síntesis de 17-alfa-aciloiloxi derivados del pregnadieno con un sustituyente en C-16-beta como antiandrógenos. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM. 2002.
26. Shiike, M.; Latkany, L. Lack of effect of a low- fat, high fruit vegetable and fiber diet on serum prostate-specific antigen of men without prostate cancer. Results from a randomized trial *Journal of Clinical Oncology* 2002, 20, 3592.
27. Qin, L.; Wang, P.; Kaneko, T. Estrogen: One of the risks factors in milk for prostate cancer *Journal of Medical Hypotheses* 2004, 62, 132.
28. Don, F.; Becket, H.; Effect of cyproterone acetate in comparison to flutamide on the ventral prostate of adult male castrated Copenhagen- Fisher rats en Dunning B-3327H tumors *Andrology* 1992, 24, 113.
29. Mukherjee, M. Affect of flutamide on the physiological status epididymis end epydidynal sperms *Andrology* 1992, 24, 267.
30. Eil, C. Ketoconazol brids to the human androgen receptor *Hormona metab. Res.* 1992, 24, 267.
31. Rojas, A. Síntesis de haloesteres alifáticos de la pregnadiona. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, 2003.
32. Orozco, Chávez. Derivados de la Progesterona como antiandrógenos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, 2003.
33. Bratoeff, E.; Rubio, M.; Ramírez, E.; Flores, G.; García, J.; Ramírez, G. *Chemistry Today* 1998, 22, 33.



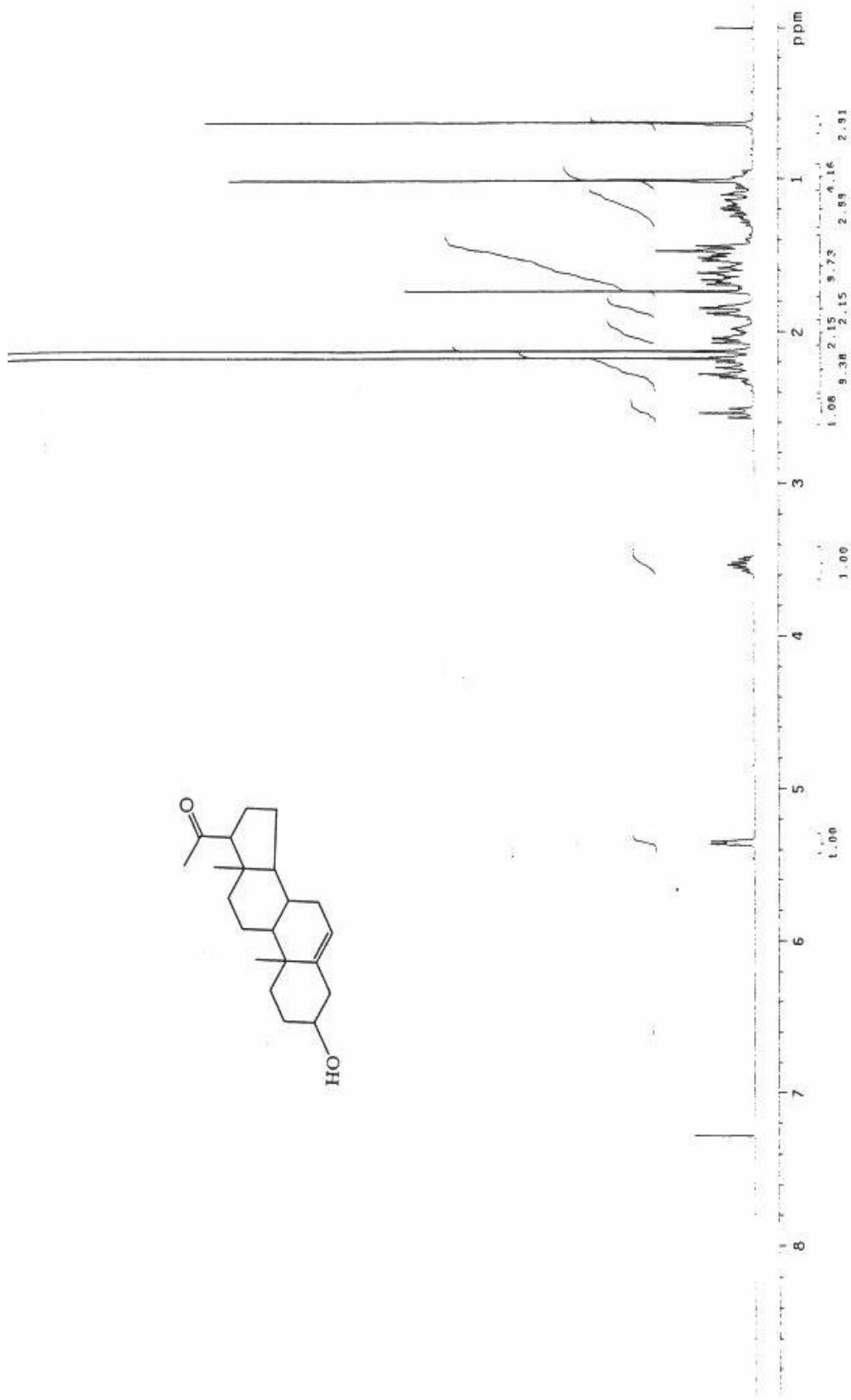
BIBLIOGRAFÍA

34. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding, *Annal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
35. McMurry, J. Química Orgánica, 3ª Edición, México **1992**.
36. Djerassi, C., Organic Reactions, **1951**, *6*, 206.

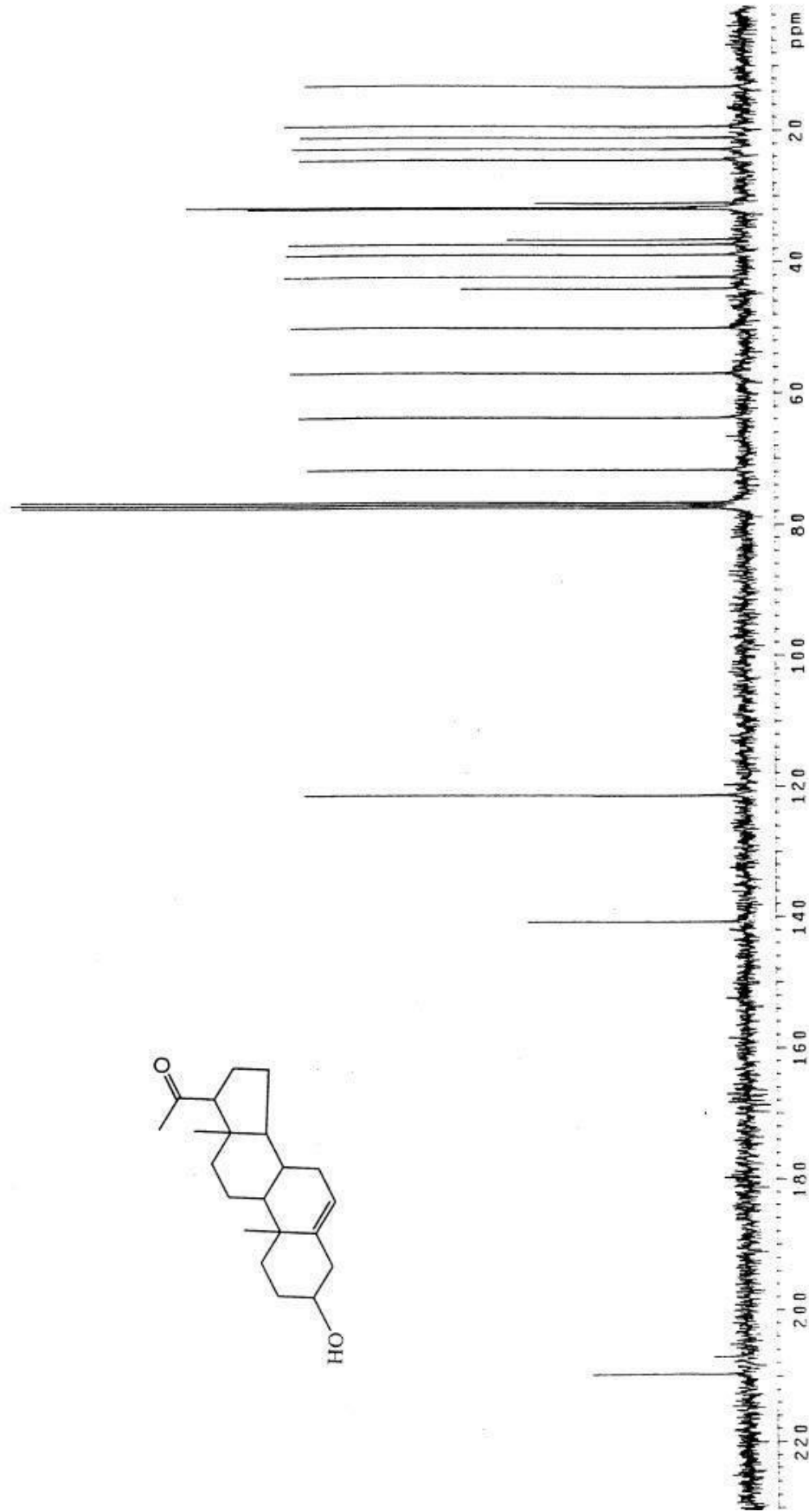
A P É N D I C E



ESPECTRO 1, IR del 3β-hidroxi-5-pregnen-20-ona



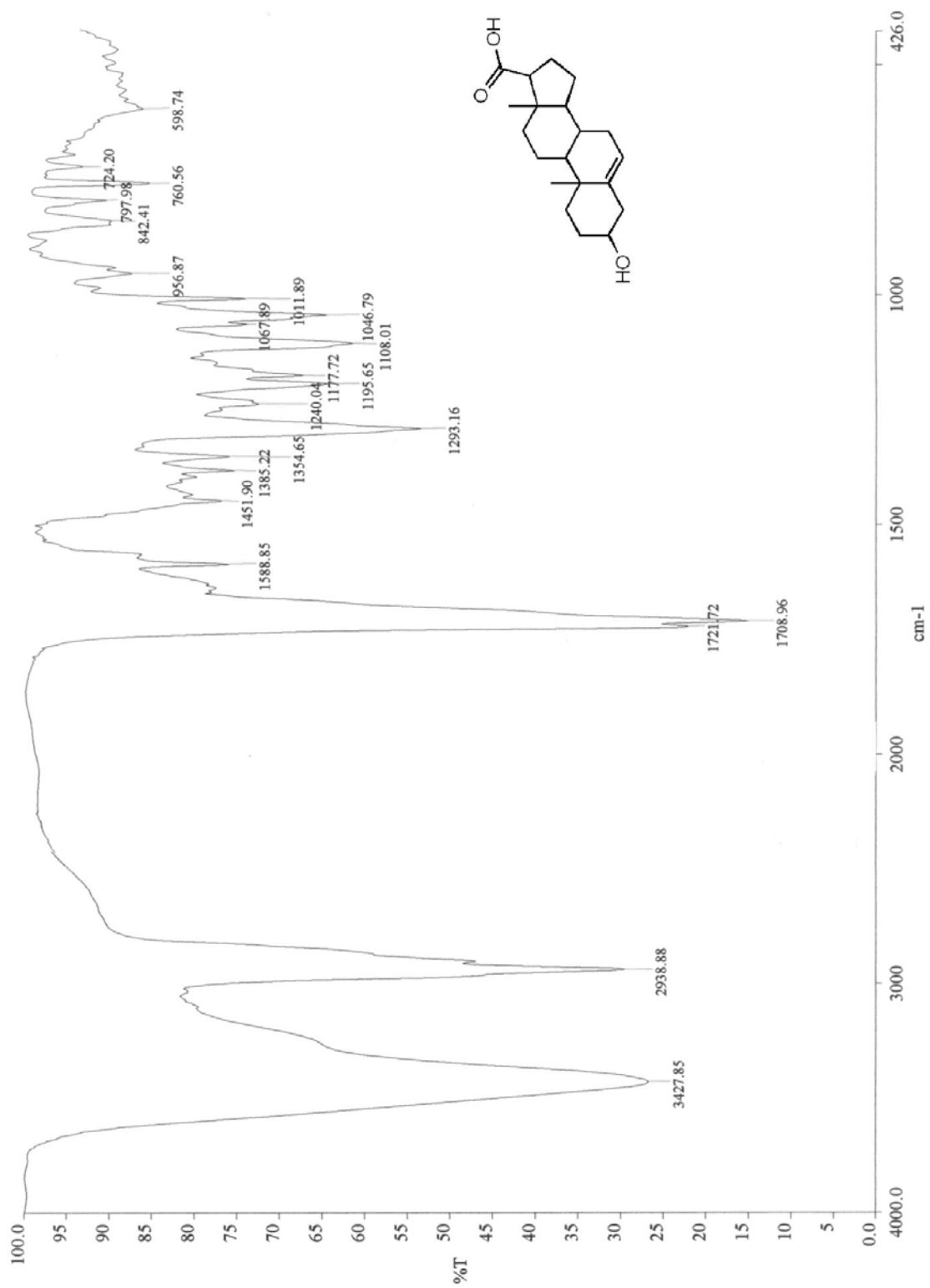
ESPECTRO 2, RMN¹ H del 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona



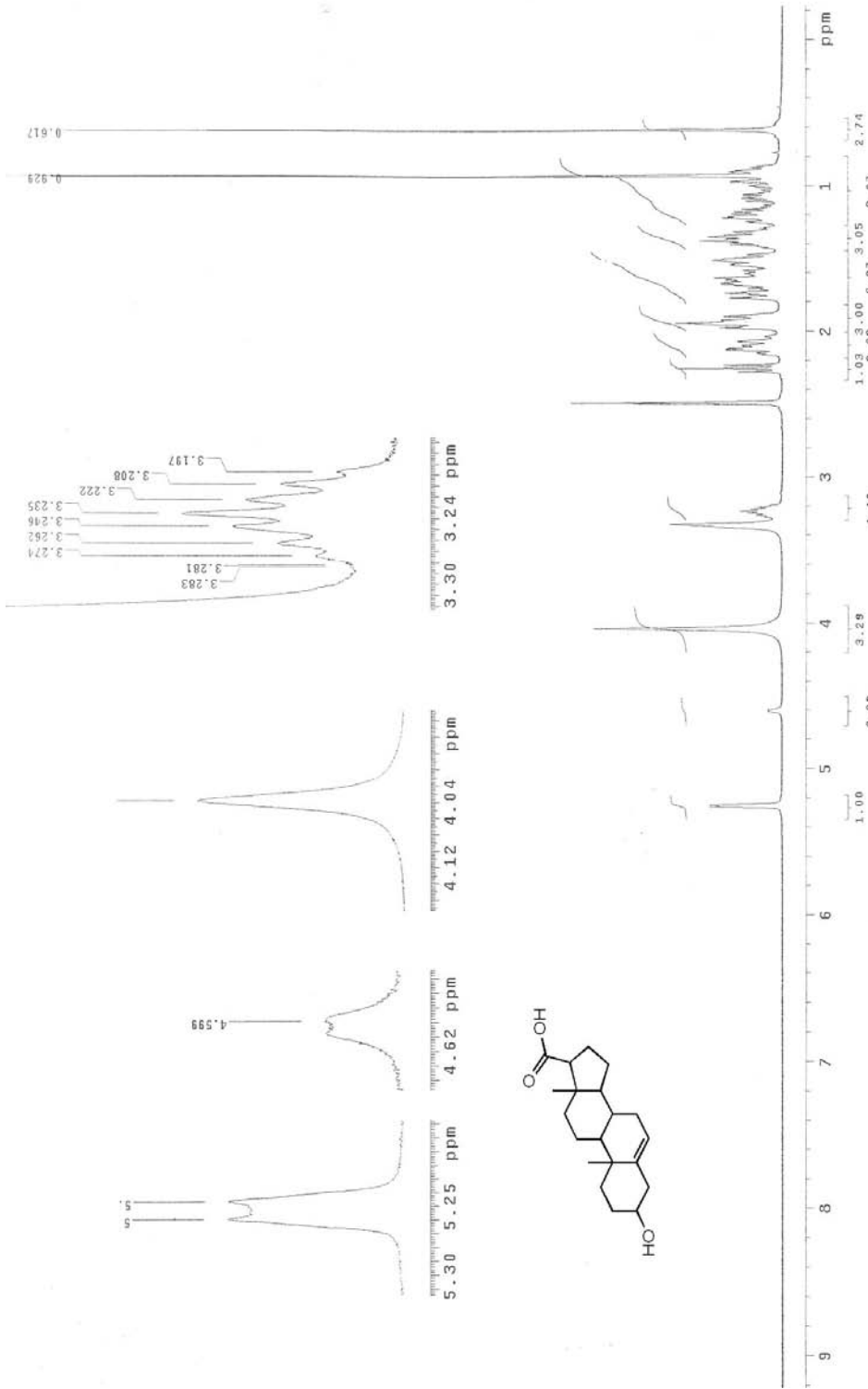
ESPECTRO 3, RMN ^{13}C del 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona



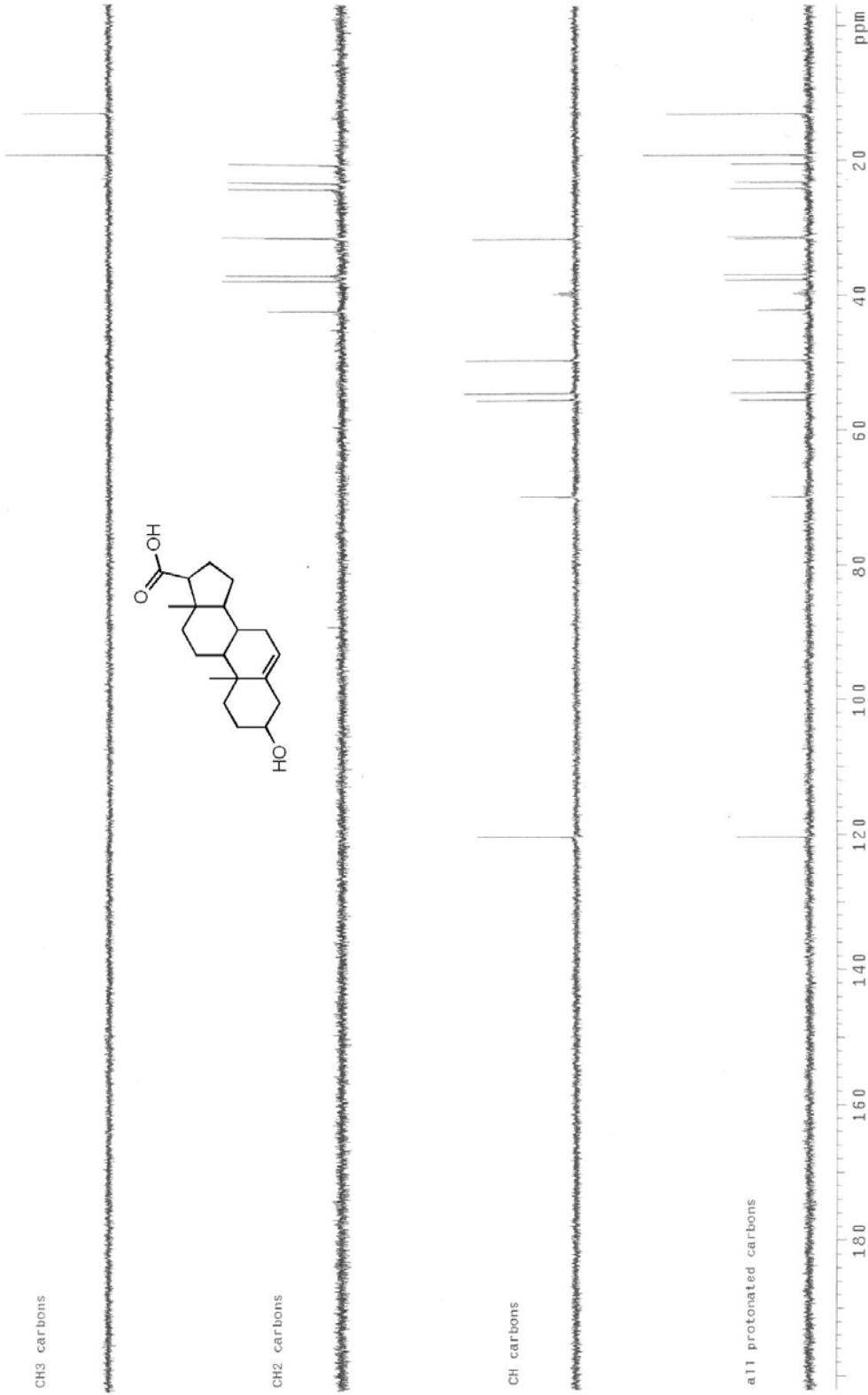
ESPECTRO 4, RMN ¹³C del 3β-hidroxi-5-pregnen-20-ona



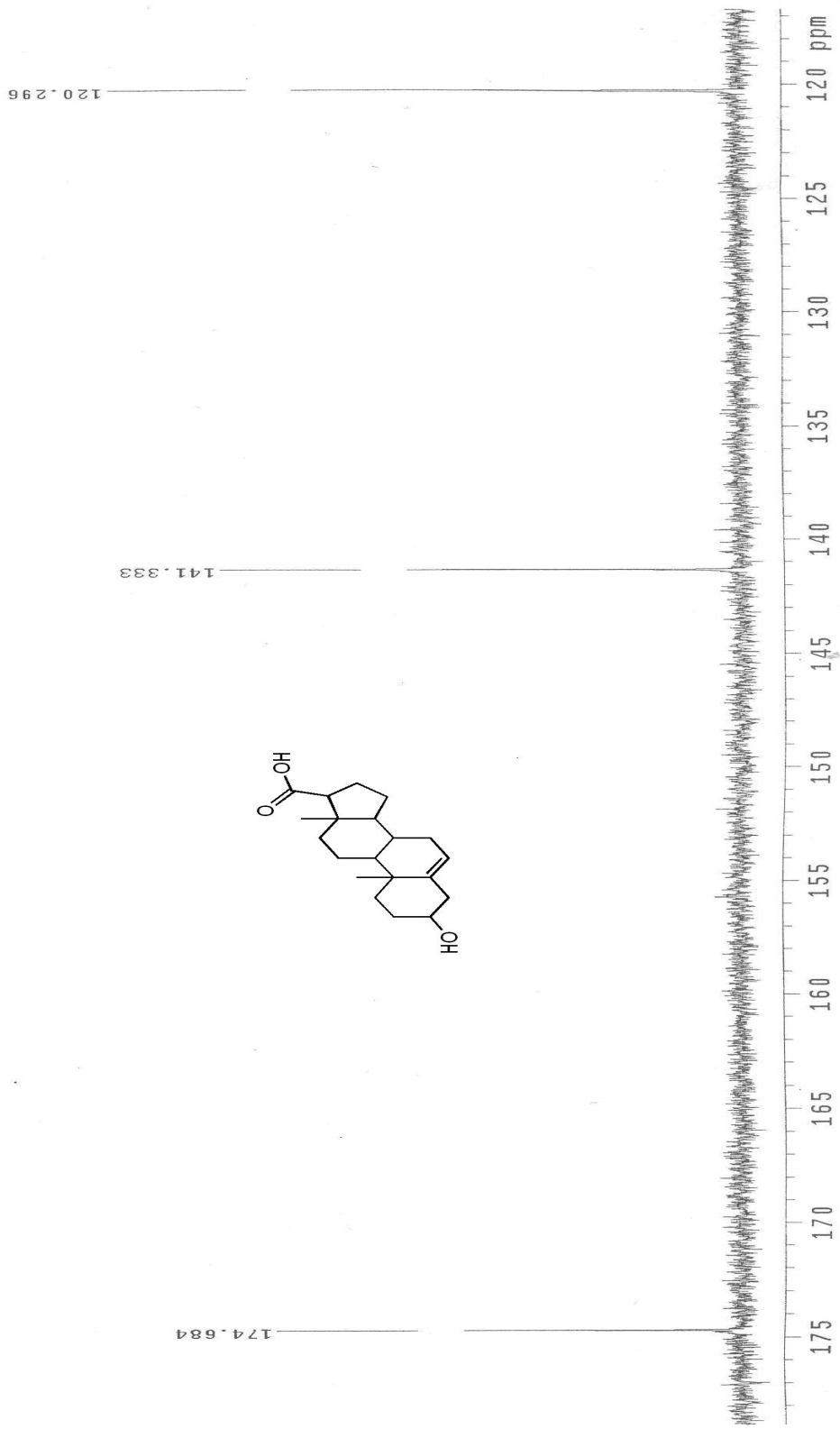
ESPECTRO 5, IR del ácido 3β-hidroxi-5-pregnen-20-oico



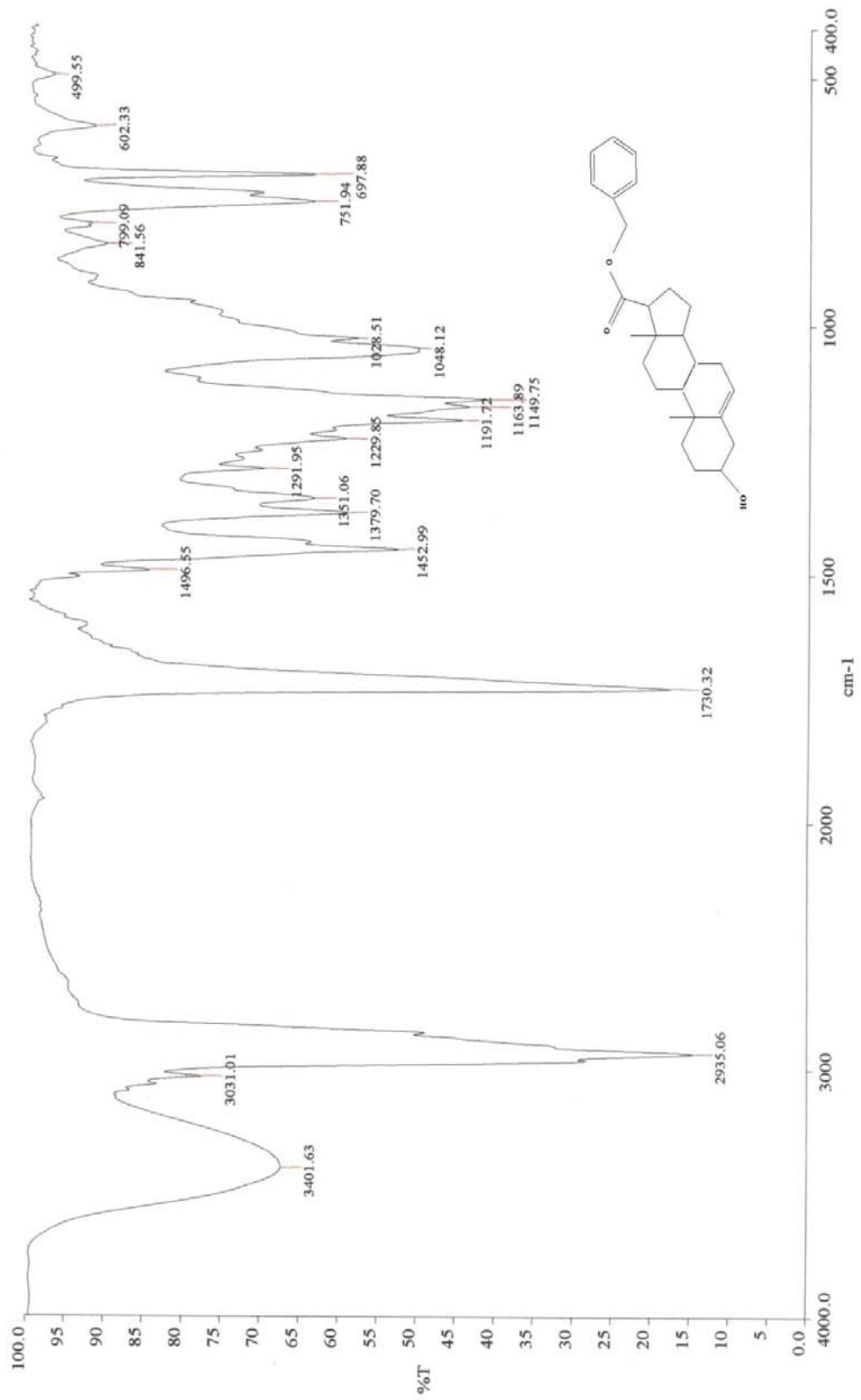
ESPECTRO 6, RMN ¹H del ácido 3β-hidroxi-5-pregnen-20-oico.



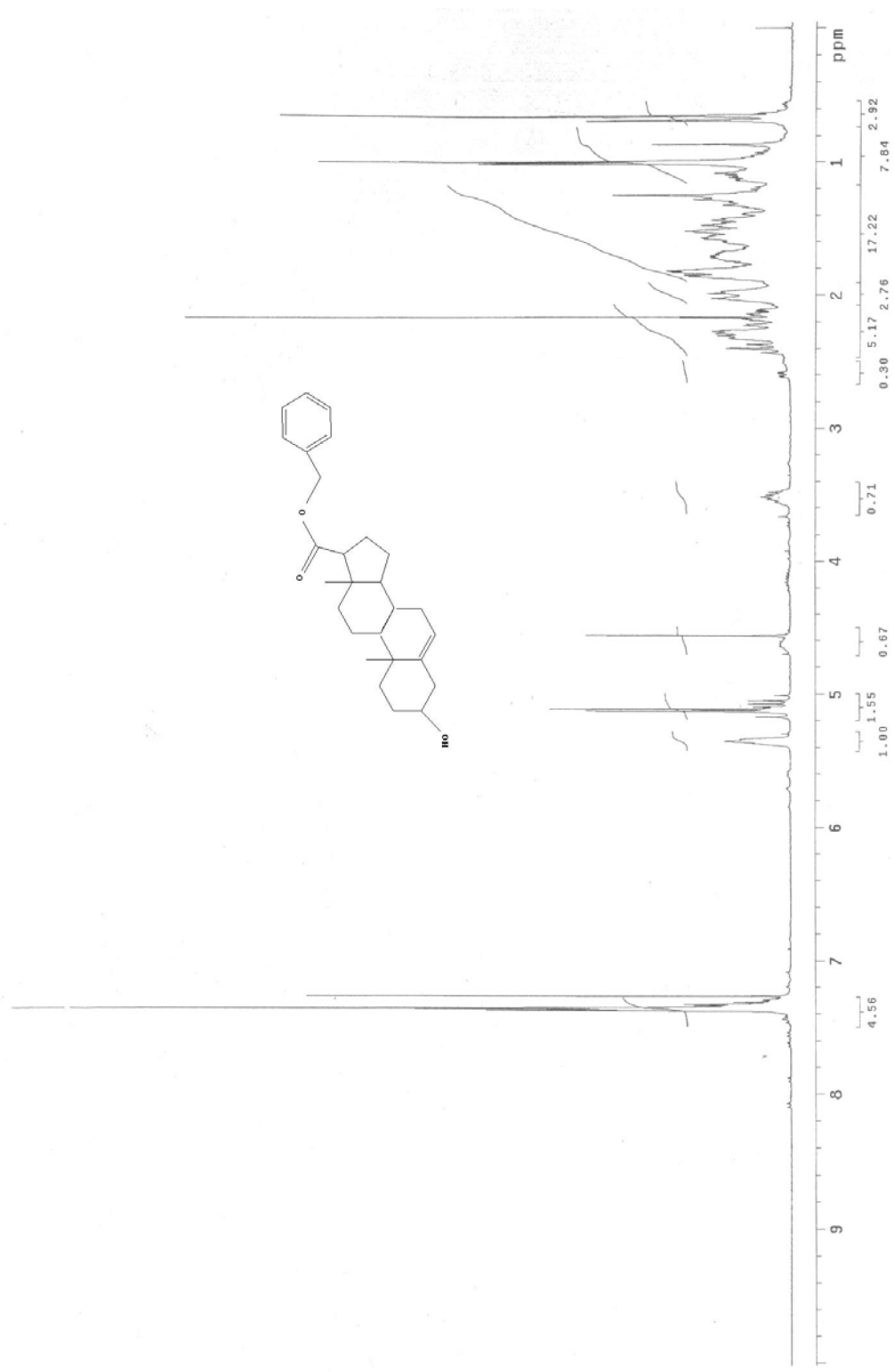
ESPECTRO 7, RMN ¹³C del ácido 3β-hidroxi-5-pregnen-20-oico



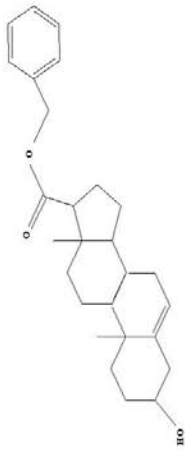
ESPECTRO 8, RMN ¹³C del ácido 3β-hidroxi-5-pregnen-20-oico



ESPECTRO 9, IR del 17- carboxilato de bencil-3 β -hidroxi-5-androsteno



ESPECTRO 10, RMN ¹H del 17- carboxilato de bencil-3β-hidroxi-5-androsteno



CH3 carbons



CH2 carbons



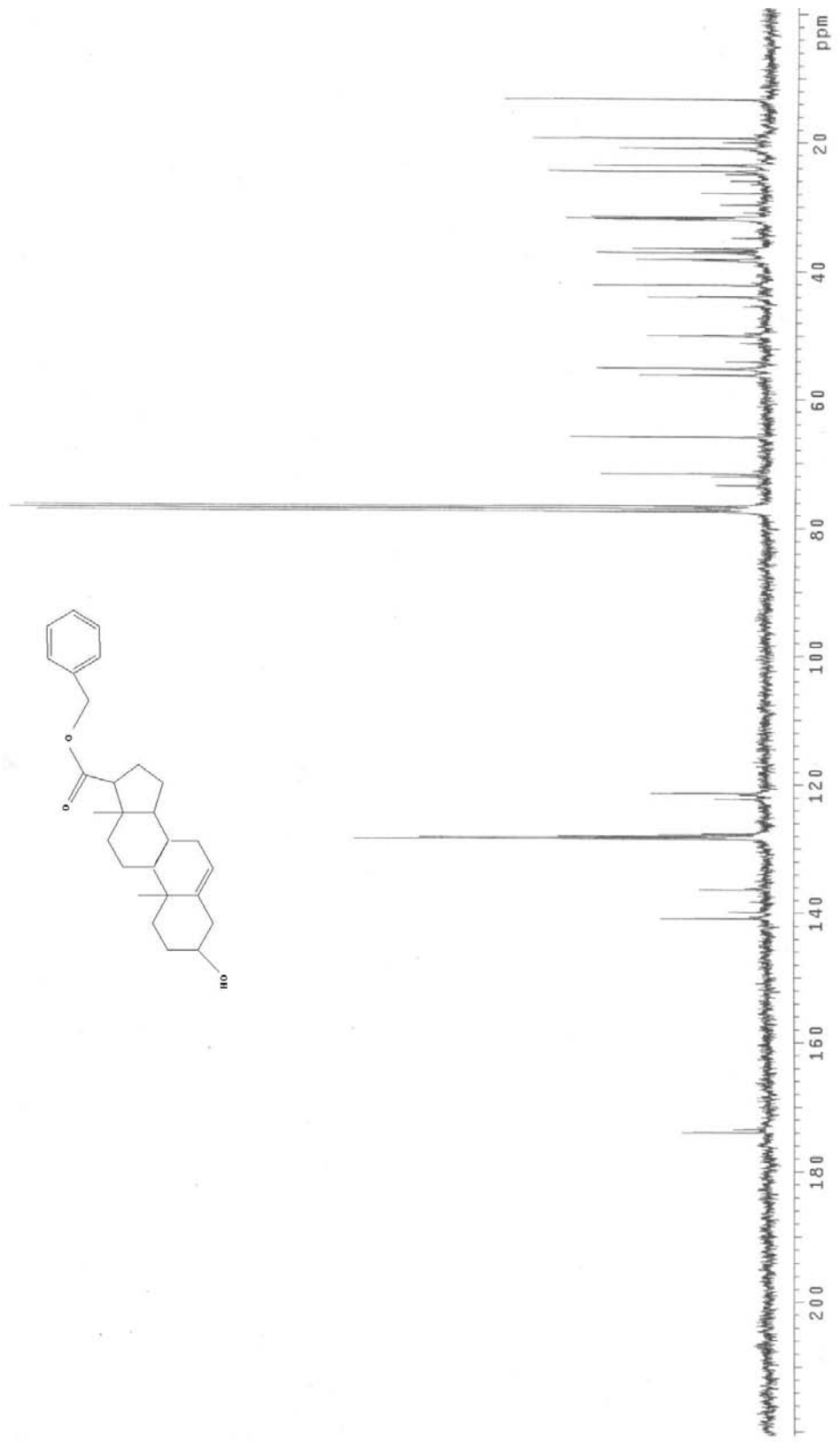
CH carbons



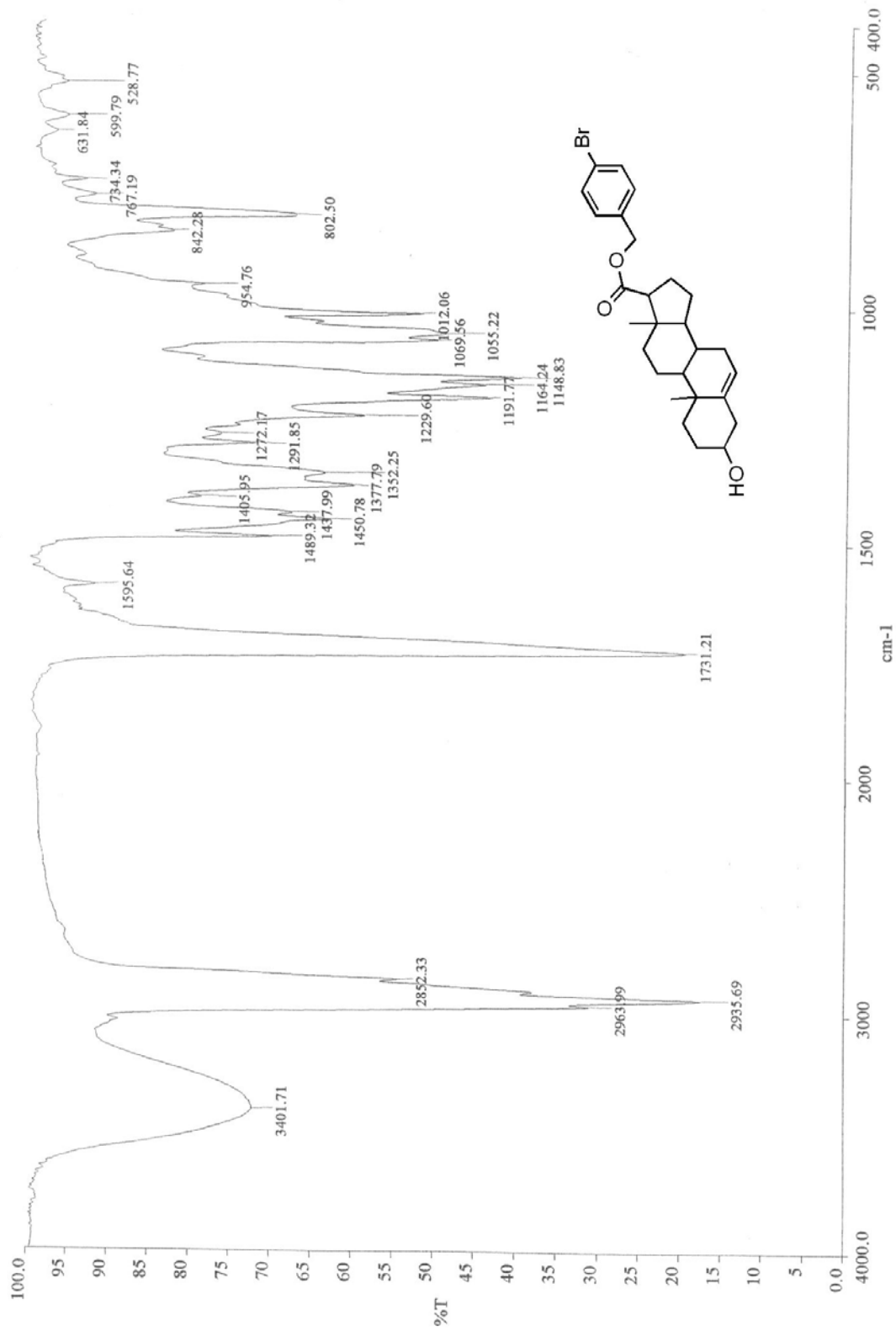
all protonated carbons



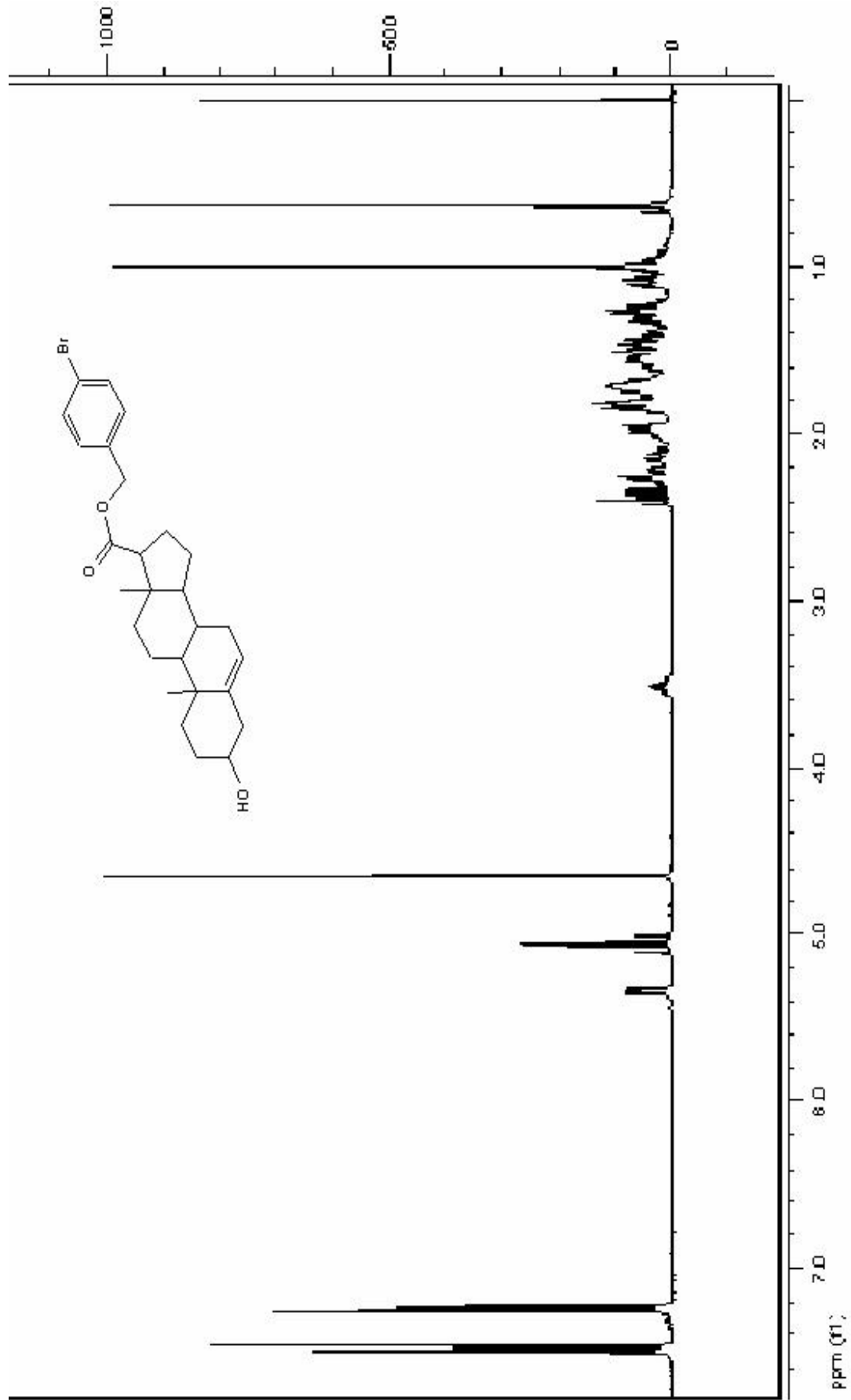
ESPECTRO 11, RMN ^{13}C del 17- carboxilato de bencil-3β-hidroxi-5-androsteno



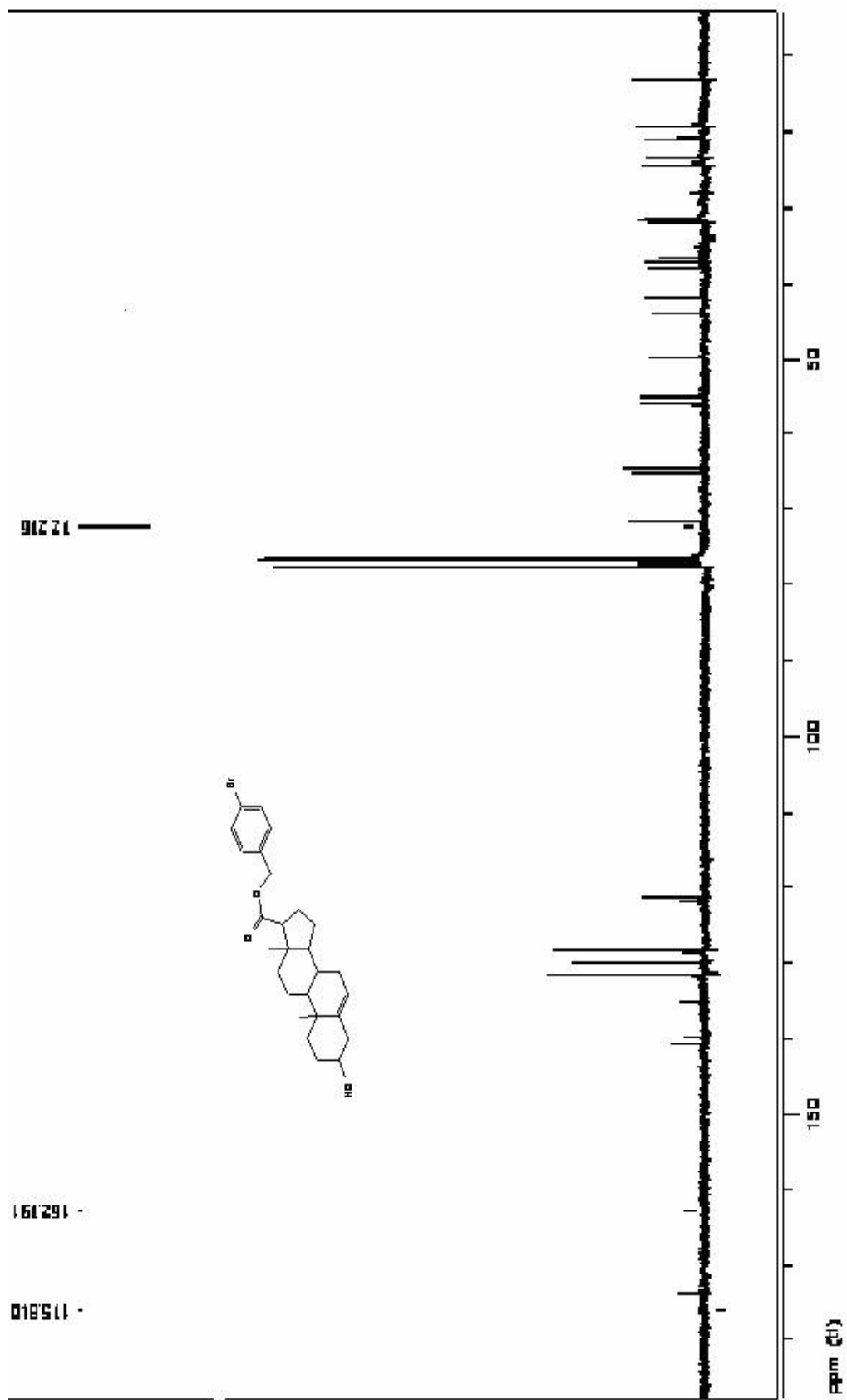
ESPECTRO 12, RMN ¹³C del 17- carboxilato de bencil-3β-hidroxi-5-androsteno



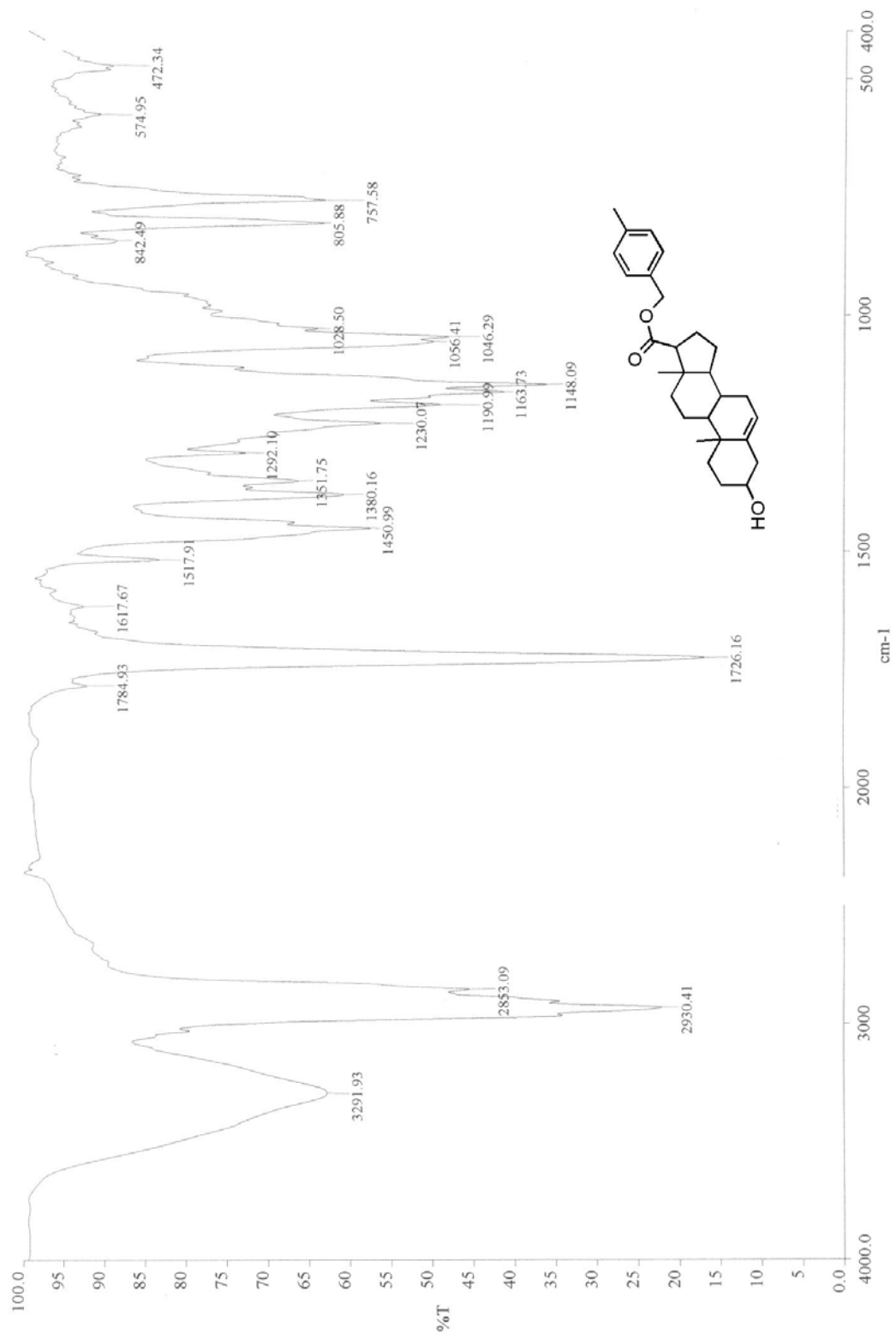
ESPECTRO 13, IR del 17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno



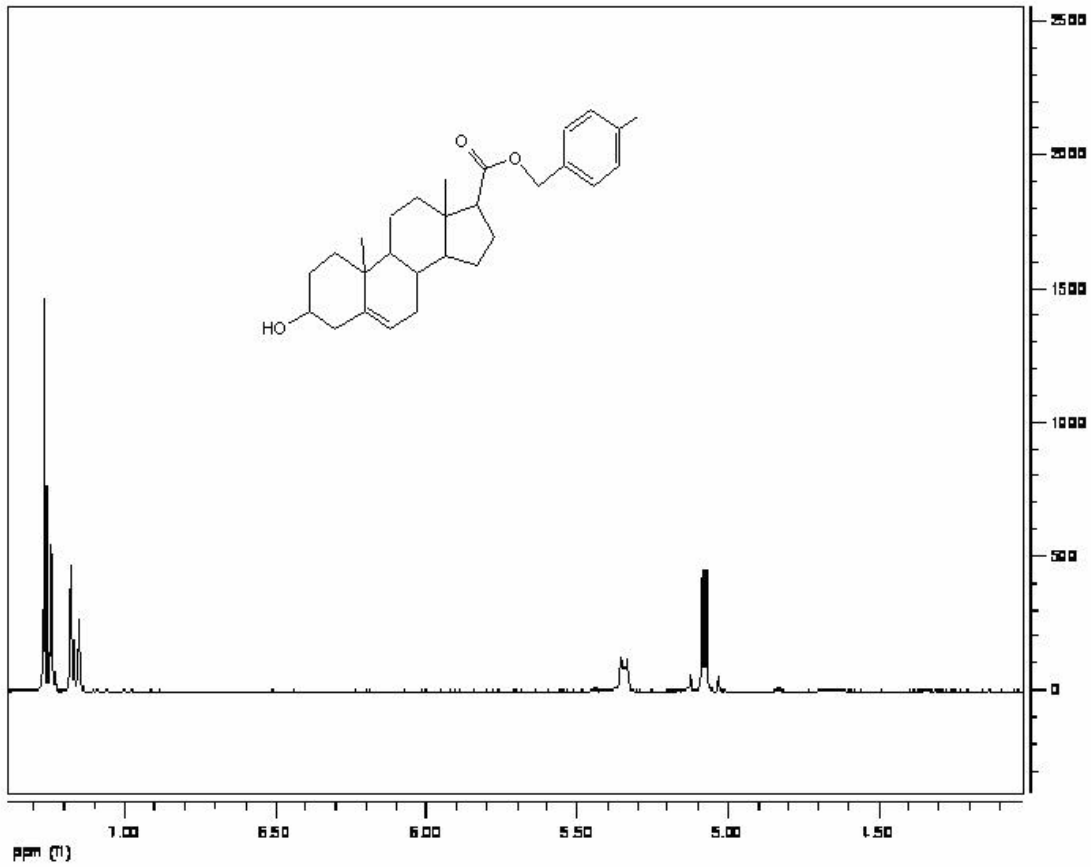
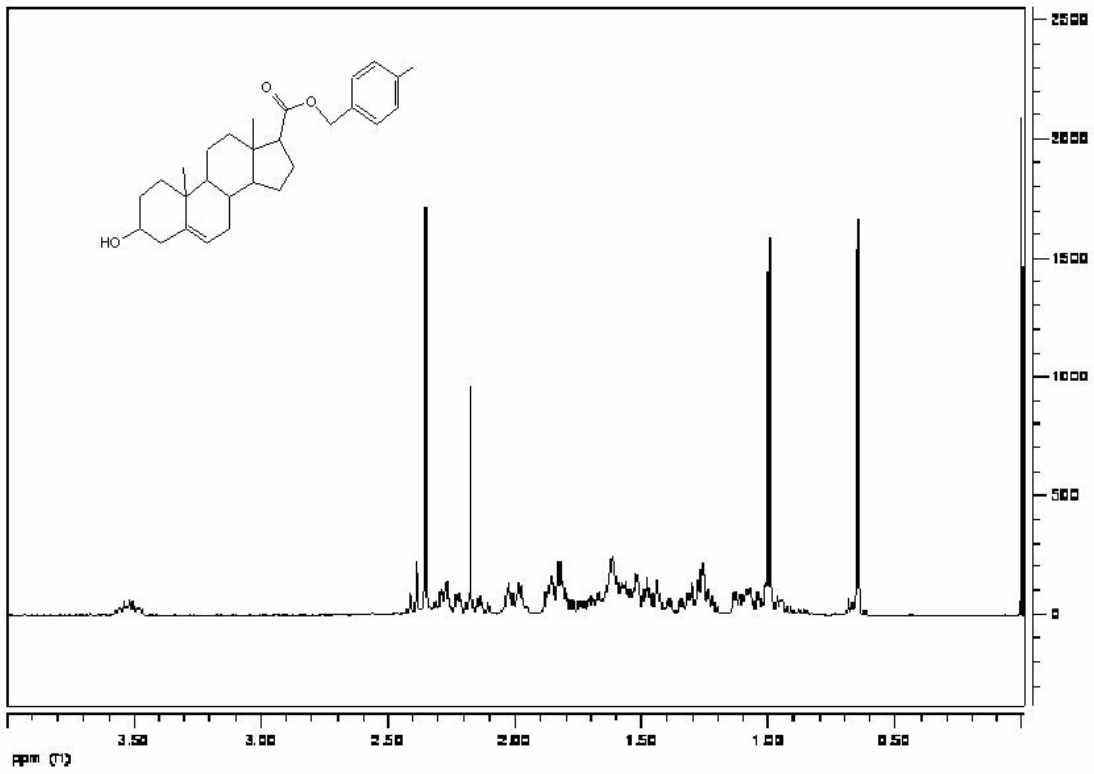
ESPECTRO 14, RMN ^1H del 17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno



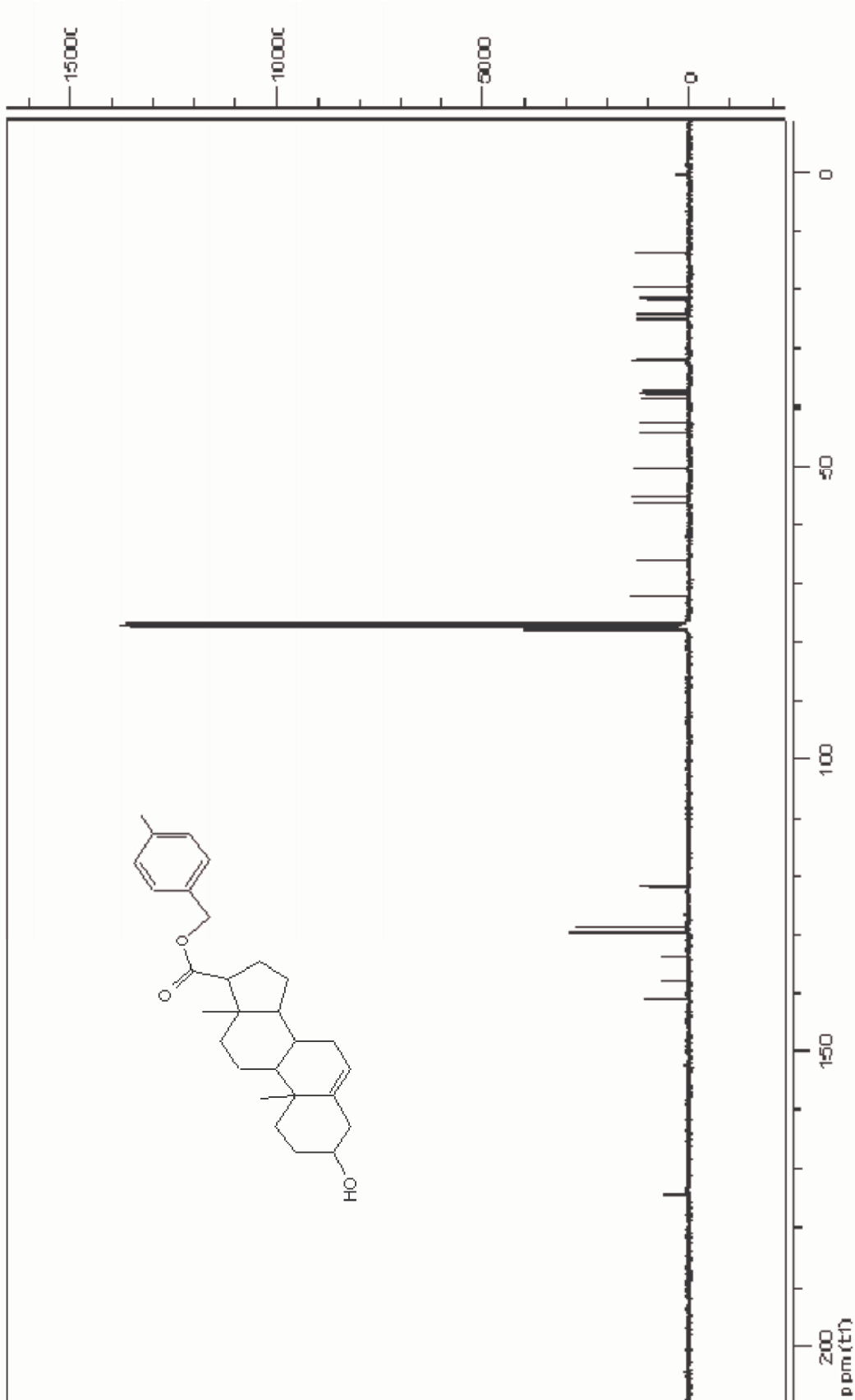
ESPECTRO 15, RMN ^{13}C del 17-carboxilato de *p*-bromobencil-3 β -hidroxi-5-androsteno



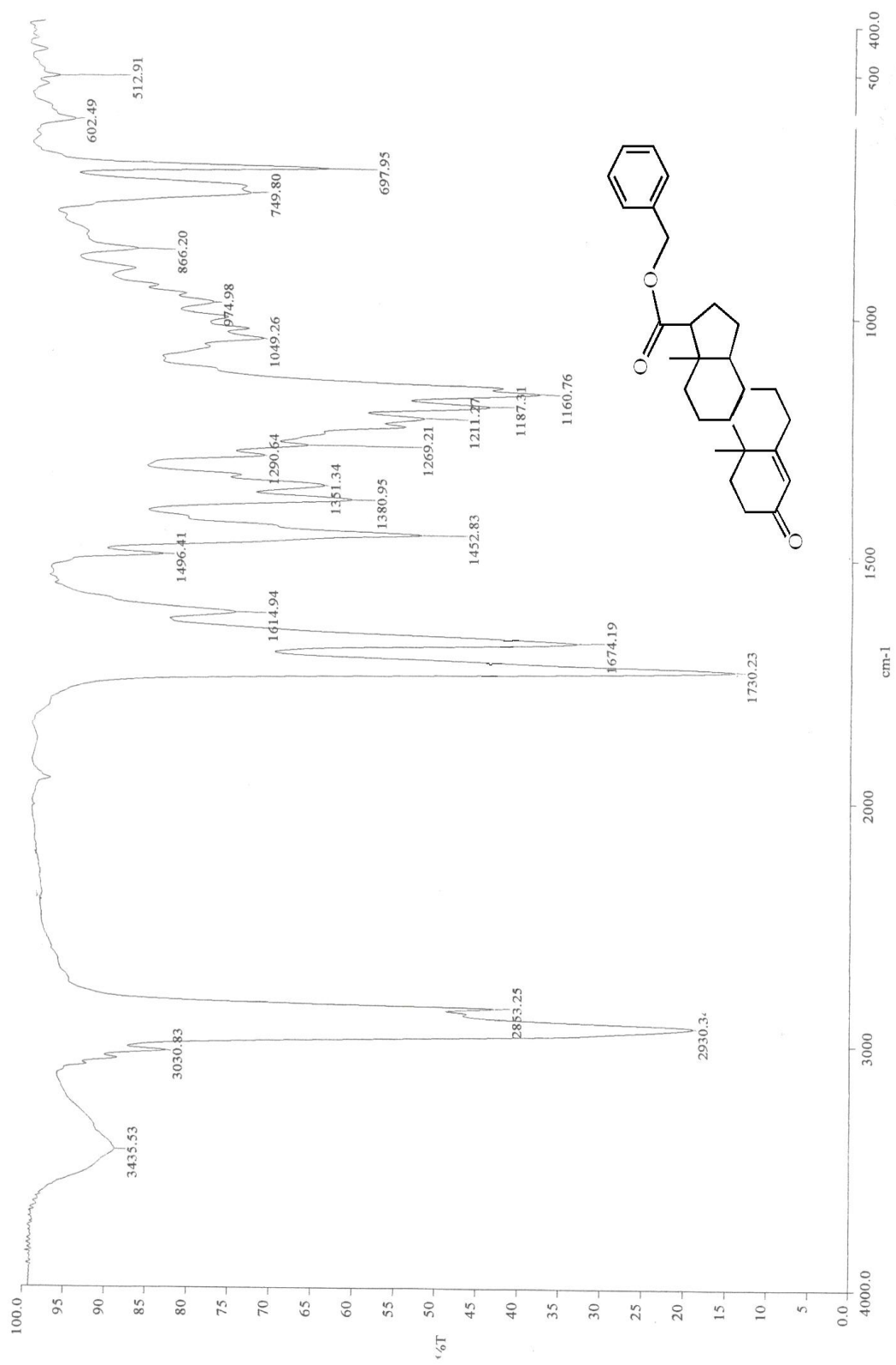
ESPECTRO 16, IR del 17-carboxilato de *p*-metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno



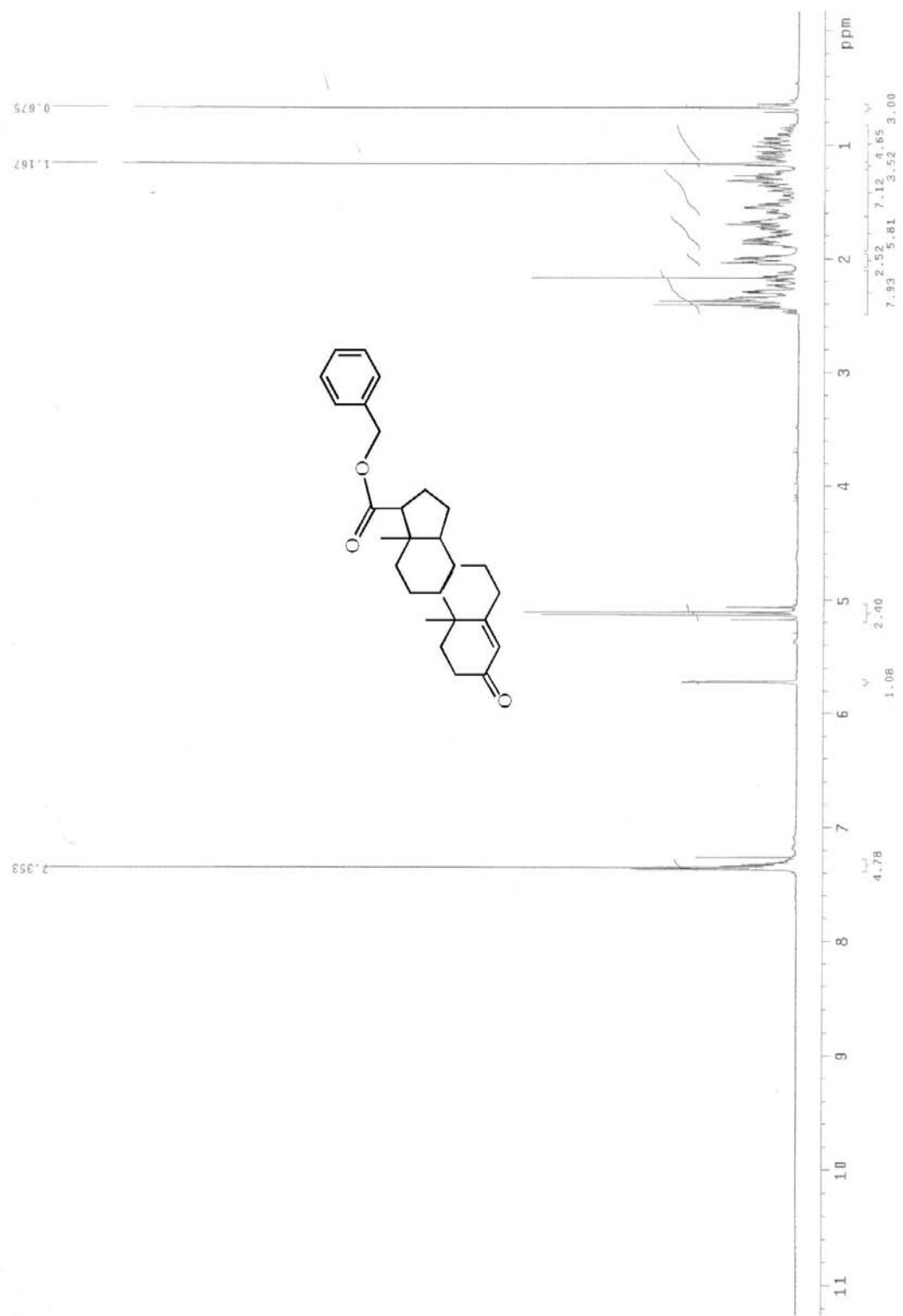
ESPECTRO 17. RMN ¹H del 17-carboxilato de p-metilbencil-3β-hidroxi-5-androsteno



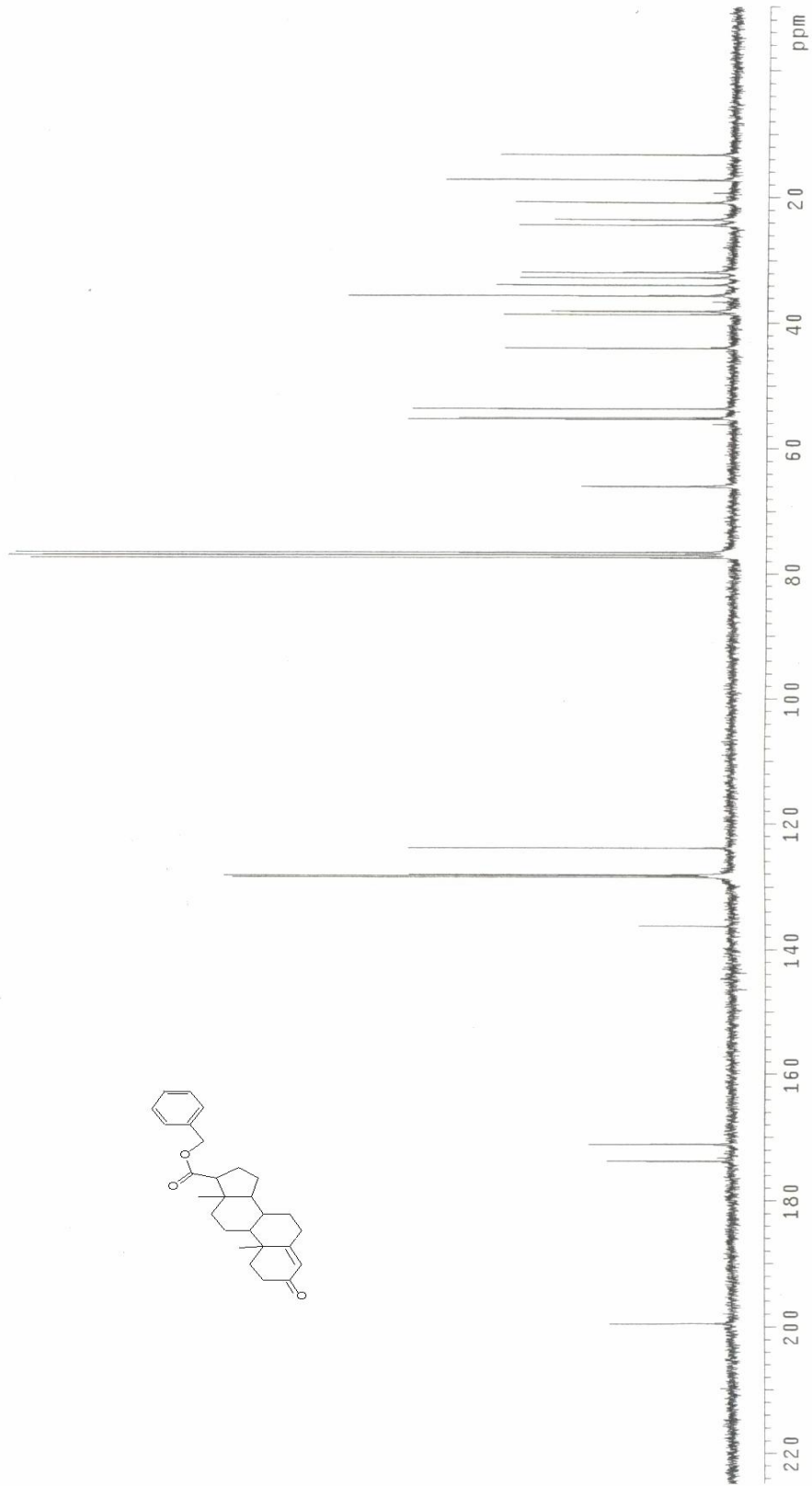
ESPECTRO 18, RMN ^{13}C del 17-carboxilato de *p*-metilbencil-3 β -hidroxi-5-androsteno



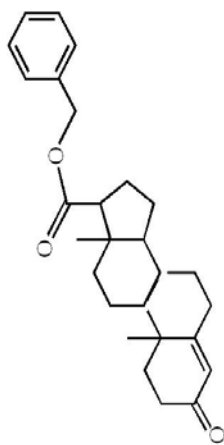
ESPECTRO 19, IR del 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno



ESPECTRO 20, RMN ¹H de 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno



ESPECTRO 21, RMN ^{13}C de 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno



CH3 carbons



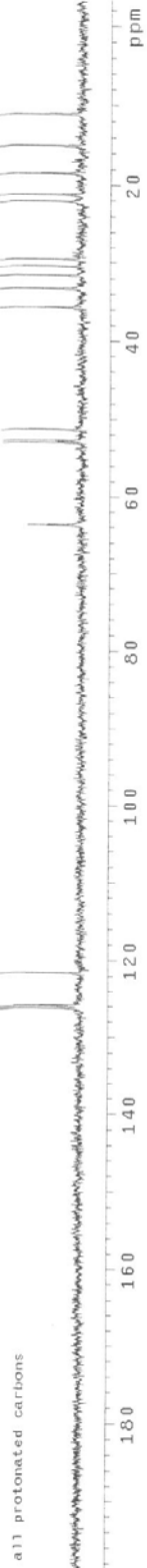
CH2 carbons



CH carbons



all protonated carbons



ESPECTRO 22, RMN ^{13}C de 17-carboxilato de bencil-3-oxo-4-androsteno