



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Nuevos derivados de la deshidroepiandrosterona
como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa y/o
antagonistas del receptor androgénico

Dra. Guillermina Yazmín Arellano Salazar

Dr. Eugene Bratoeff Titeff
Asesor



Ciencia Nueva
DOCTORADOS UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo
VOCAL:	Dr. Gustavo Alberto García de la Mora
VOCAL:	Dr. Jesús Sandoval Ramírez
VOCAL:	Dr. José Norberto Farfán García
SECRETARIO:	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

- ✚ Laboratorio 125, Departamento de Farmacia, Conjunto "E", Facultad de Química, UNAM.
- ✚ Laboratorio G-006, Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco, bajo la dirección de la Dra. Marisa Cabeza Salinas.

COMITÉ TUTOR:

Dr. Eugene Bratoeff, Tutor

Dra. Marisa Cabeza Salinas

Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

Este trabajo fue presentado en los siguientes congresos:

Actividad Académica QuimiUNAM 2011:

Auditorio “Alfonso Caso”, UNAM, México, D.F.

“Nuevos derivados de la deshidroepiandrosterona como posibles inhibidores de la enzima 5 α -reductasa y/o del receptor androgénico”.

Del 16 al 18 de noviembre de 2011.

M. en C. Guillermina Yazmín Arellano Salazar.

Modern Therapeutics 2012: Advances in Physiology, Pharmacology and Pharmaceutical Sciences.

Toronto, Ontario, Canada. June 12-15, 2012. University of Toronto.

“Novel Dehydroepiandrosterone Derivatives as Antiandrogens”.

Marisa Cabeza^a, Yazmín Arellano^b, Araceli Sánchez^a, Yvonne Heuze^a and Eugene Bratoeff^b. Department of Biological Systems and Animal Production Metropolitan University-Xochimilco^a, Mexico D.F., Mexico; Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry^b, National University of Mexico City, Mexico D.F., Mexico.

30 Congreso Latinoamericano de Química 2012

Cancún, México, del 27 al 31 de octubre de 2012.

“Nuevos derivados de la deshidroepiandrosterona como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa y/o antagonistas del receptor androgénico”.

G. Yazmín Arellano S.¹, Marisa Cabeza², Eugene Bratoeff¹. ¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México. ²Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal. Universidad Metropolitana- Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100. México, D.F. 04960, México.

Este trabajo generó las siguientes publicaciones:

- ❖ Arellano, Y., Bratoeff, E., Garrido, M., Soriano, J., Heuze and Cabeza, M. (2011)
Steroids **76**, 1241-1246.
- ❖ Bratoeff, E., Sánchez, A., Arellano, Y., Heuze, Y, Soriano, J. and Cabeza, M. (2012)
Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. ISSN 1475-6374 online.

Ami hijo

Ami Mamá

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por brindarme la oportunidad de formarme como doctora y así realizar un gran sueño.

*Al CONACyT por la beca otorgada
No. de becario 162110*

*A la DGAPA por el apoyo otorgado
Proyecto IN211312*

Al Dr. Bratoeff por haberme dado la oportunidad de trabajar con él y por todas sus enseñanzas a lo largo de este tiempo.

A mi Comité Tutor, la Dra. Marisa y el Dr. Guillermo por su formación y enseñanzas durante mis estudios de doctorado.

A mi hermano, por ayudarme cada vez que lo necesito.

A mis grandes amigos Rosy Chávez, Omar Torres, Alecita Chávez e Ilsa Hernández porque siempre están conmigo.

A mis compañeros del laboratorio 125, con los cuales pasé gratos momentos y en especial a Tania Moctezuma, de quien aprendí muchísimo, así como a Alejandro Posada por ayudarme incondicionalmente.

A Marisela Gutiérrez, a Giny Duarte, a la Dra. Isabel Aguilar y a Elenita Ramírez, por sus consejos y ayuda.

A Jose Tenopala y a Rosy Viñas por su apoyo incondicional durante mis estudios.

A cada una de las personas que me acompañaron y apoyaron durante esta etapa de mi vida.

A todo el personal de la USAI, por la realización de los espectros presentados en este trabajo.

A los miembros del jurado asignado, por todas las propuestas hechas para mejorar el presente trabajo de tesis.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	<i>vi</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>ix</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>xi</i>
ÍNDICE DE GRÁFICAS	<i>xv</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	7
3.1 Generalidades sobre la próstata	
3.2 Hiperplasia prostática benigna	8
3.3 Dihidrotestosterona	10
3.4 Enzima 5 α -reductasa	11

	Índice
	Página
3.4.1 Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa	14
3.5 Generalidades sobre el cáncer	15
3.5.1 Cáncer de próstata	
3.5.2 Factores de riesgo	
3.5.3. Pruebas para la detección del cáncer de próstata	17
3.5.4. Aspectos generales de las opciones de tratamiento	
3.5.4.1 Terapia hormonal	18
3.5.4.2. Tratamientos basados en antiandrógenos esteroidales	
IV. PROPUESTA	21
V. HIPÓTESIS	23
VI. OBJETIVOS	24
6.1 Objetivo general	
6.2 Objetivos particulares	
VII.RUTAS SINTÉTICAS	25
VIII. PARTE EXPERIMENTAL	28
8.1 Parte Química	
8.1.1. Materia prima y equipo	
8.1.2. Ruta sintética 1	30
8.1.2.1. Reacción de esterificación de la deshidroepiandrosterona (3 β -hidroxiandrost-5-en-17-ona)	
8.1.2.2. Datos físicos y espectroscópicos de los ésteres derivados de la DEHA (Benzoatos de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo)	31
8.1.2.3. Reacción de formilación de Vilsmeier-Haack para los ésteres derivados de la deshidroepiandrosterona (benzoatos de 17-cloro- 16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo)	38
8.1.2.4. Datos físicos y espectroscópicos de los benzoatos de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	39
8.1.2.5. Reacción de sustitución para los benzoatos de 17- cloro-16-formilandrostan-5,16-dien-3 β -ilo	47
8.1.2.6. Datos físicos y espectroscópicos de los benzoatos de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo.....	49
8.1.3. Ruta sintética 2	58
8.1.3.1. Reacción de formilación de Vilsmeier-Haack para el acetato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	
8.1.3.2. Datos físicos y espectroscópicos del acetato de 17- cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	
8.1.3.3. Reacción de síntesis del 16-formil-17-metoxiandrost- 5,16-dien-3 β -ol	59

	Índice
	Página
8.1.3.4. Datos físicos y espectroscópicos del 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ol	60
8.1.3.5. Reacción de esterificación del 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ol con derivados del ácido benzoico	61
8.1.3.6. Datos físicos y espectroscópicos de los benzoatos de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	62
8.2 Parte Biológica	71
8.2.1. Materiales y métodos	
8.2.1.1. Material biológico	
8.2.1.2. Material radioactivo y finasterida	
8.2.1.3. Equipo	
8.2.1.4. Aislamiento y purificación de la finasterida	
8.2.2. Actividad biológica de los nuevos esteroides	
8.2.3. Animales y tejidos	
8.2.4. Solubilización de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 a partir de microsomas de hígado de rata	
8.2.5. Ensayos <i>in vitro</i>	73
8.2.5.1. Caracterización de la enzima 5 α -reductasa tipo 1	
8.2.5.1.1. Determinación de la concentración de proteína dependiente de la actividad de la 5AR-1	
8.2.5.1.2. Determinación de la actividad de la 5 α -reductasa tipo 1 en función del pH	
8.2.5.1.3. Determinación de la actividad de la enzima tipo 1	
8.2.5.1.4. Determinación de la actividad de la enzima tipo 2	
8.2.5.1.5. Extracción y purificación de DHT formada a partir de T (actividades de las 5 α -reductasas tipo 1 y 2)	
8.2.5.1.6. Determinación de la concentración inhibitoria 50 de los nuevos esteroides sobre las actividades de las 5 α -reductasas tipo 1 y 2	
8.2.5.1.7. Ensayo de competencia de unión al receptor androgénico	
8.2.6. Ensayos <i>in vivo</i>	77
IX. RESULTADOS	78
9.1. Ensayos <i>in vitro</i>	
9.1.1. Concentración de proteína dependiente de la actividad de la 5 α -reductasa	
9.1.2. Actividad de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 dependiente del pH	
9.2. Actividad biológica de los nuevos esteroides	81
9.2.1. Ensayos <i>in vitro</i>	

	Índice
	Página
9.2.1.1. Determinación de la concentración inhibitoria 50 de los nuevos esteroides en próstata humana	
9.2.1.2. Unión de los nuevos esteroides al receptor androgénico	
9.2.2. Ensayos <i>in vivo</i>	83
9.2.2.1. Ensayo del órgano del flanco	
9.2.2.2. Efecto de los nuevos esteroides sobre el peso de la próstata y de las vesículas seminales	
X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	86
10.1 Resultados de la Parte Química	
10.2. Resultados de la Parte Biológica	107
XI. CONCLUSIONES	109
XII. PERSPECTIVAS	111
XIII. REFERENCIAS	112
ANEXO 1	
Espectros	
1.1-1.4 Benzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	117
2.1-2.4 <i>p</i> -Fluorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	119
3.1-3.4 <i>p</i> -Clorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	121
4.1-4.4 <i>p</i> -Bromobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	123
5.1-5.4 <i>p</i> -Yodobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	125
6.1-6.4 <i>p</i> -Metilbenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	127
7.1-7.4.1 Benzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	129
8.1-8.4.1 <i>p</i> -Fluorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	132
9.1-9.4.1 <i>p</i> -Clorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	135
10.1-10.4.1 <i>p</i> -Bromobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	138
11.1-11.4.1 <i>p</i> -Yodobenzoato de 17-cloro-16-formilanandrost-5,16-dien-3 β -ilo	141
12.1-12.4 <i>p</i> -Metilbenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	144
13.1-13.4 Benzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	146
14.1-14.4 <i>p</i> -Fluorobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	148
15.1-15.4 <i>p</i> -Clorobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	150

		Índice
		Página
16.1-16.4	<i>p</i> -Bromobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	152
17.1-17.4	<i>p</i> -Yodobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	154
18.1-18.4	<i>p</i> -Metilbenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	156
19.1-19.4	Acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	158
20.1-20.4	16-Formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ol	160
21.1-21.4	Benzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo ..	162
22.1-22.4.1	<i>p</i> -Fluorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	164
23.1-23.4.1	<i>p</i> -Clorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	167
24.1-24.4.1	<i>p</i> -Bromobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	170
25.1-25.5.1	<i>p</i> -Yodobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	173
26.1-26.4.1	<i>p</i> -Metilbenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	176
 ANEXO 2		
Artículos		179

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

SÍMBOLO

5 α -DHT	5 Alfa-dihidrotestosterona
aa	Aminoácidos
ADP	Fosfato de adeninucleótido
5AR	Enzima 5 α -reductasa
5AR-1	Enzima 5 α -reductasa Tipo 1
5AR-2	Enzima 5 α -reductasa Tipo 2
5AR-3	Enzima 5 α -reductasa Tipo 3
5ARIs	Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa
AcOEt	Acetato de etilo
APE	Antígeno Prostático Específico
BC	Bicalutamida
CaP	Cáncer de Próstata
CaPRH	Cáncer de Próstata Refractario a Hormonas
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DES	Dietilestilbestrol
DFS	Double Focus Sector
DHEA	Deshidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido

SÍMBOLO

DTT	Ditiotreitol
E	Enzima
E ⁺	Electrófilo o sitio electrofílico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectrometría de Masas
Enz	Enzima
FAB	Bombardeo de Átomos Rápidos
Flu	Flutamida
[³ H]T	Testosterona tritiada
HAP	Hidroxiapatita
HF	Hidroxiflutamida
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
Hz	Hertz
I	Inhibidor
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
J _{H-F}	Constante de acoplamiento Hidrógeno-Flúor
J _m	Constante de acoplamiento <i>meta</i> -
J _o	Constante de acoplamiento <i>orto</i> -
J _p	Constante de acoplamiento <i>para</i> -
Km	Constante de velocidad
Lubrol PX	Monodeciliglicolnonaetilenéter
m	Multiplete
MIB	Mibolerona
NA	No presentó actividad
Nu:	Nucleófilo o sitio nucleofílico
NADP ⁺	Forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido
OPB	Obstrucción Prostática Benigna
ppm	Partes por millón
R	Fosfato de adenindinucleótido
RA	Receptor Androgénico
RBA	Capacidad de unión relativa al receptor androgénico
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Singlete
sa	Señal ancha
SNC	Sistema Nervioso Central
T	Testosterona
TEMD	Buffer a base de tris-HCl, EDTA, molibdato de sodio, DTT y glicerol, ajustado a pH = 8
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tacto Rectal
USFDA	United States Food and Drug Administration
V _{máx}	Velocidad máxima
VMH	Vilsmeier Haack

SÍMBOLO

δ	Desplazamiento químico
ν	Número de onda

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Nombre	Página
1	Esquema del sistema reproductor masculino en el que se observa la próstata	8
2	Fármacos utilizados para el tratamiento de la HPB	10
3	Conversión de la T a 5 α -DHT por la enzima 5 α -reductasa dependiente de NADPH	11
4	Mecanismo de reducción de la T	13
5	Mecanismo de interacción entre los 4-azaesteroides y las isoenzimas de la 5AR	14
6	Episterida	15
7	Fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer de próstata	19
8	Deshidroepiandrosterona	21
9	Series de compuestos a sintetizar	22
10	Ruta sintética 1	26
11	Ruta sintética 2	27
12	Reacción de esterificación de la DHEA	30
13	Benzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	31
14	<i>p</i> -Fluorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	32
15	<i>p</i> -Clorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	33
16	<i>p</i> -Bromobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	35
17	<i>p</i> -Yodobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	36
18	<i>p</i> -Metilbenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	37
19	Reacción de formilación de Vilsmeier–Haack para los ésteres derivados de la DHEA	38

No.	Nombre	Página
20	Benzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	39
21	<i>p</i> -Fluorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	40
22	<i>p</i> -Clorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	42
23	<i>p</i> -Bromobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	43
24	<i>p</i> -Yodobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	45
25	<i>p</i> -Metilbenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	46
26	Reacción de sustitución para los benzoatos de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	47
27	Benzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	49
28	<i>p</i> -Fluorobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	50
29	<i>p</i> -Clorobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	52
30	<i>p</i> -Bromobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	53
31	<i>p</i> -Yodobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	55
32	<i>p</i> -Metilbenzoato de 17-(1 <i>H</i> benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	56
33	Reacción de formilación de Vilsmeier -Haack para el acetato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo	58
34	Acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	59
35	Síntesis del 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ol	59
36	16-Formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ol	60
37	Reacción de esterificación del 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ol con diferentes derivados del ácido benzoico	61
38	Benzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo ...	62
39	<i>p</i> -Fluorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	63
40	<i>p</i> -Clorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	65
41	<i>p</i> -Bromobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	66
42	<i>p</i> -Yodobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	68
43	<i>p</i> -Metilbenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	69

ÍNDICE DE TABLAS

No.	Nombre	Página
1	Propiedades de las isoenzimas 5AR	12
2	Simbología utilizada para las señales de IR	29
3	Simbología utilizada para las señales de RMN- ¹ H	30
4	Propiedades físicas del benzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo ...	31
5	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del benzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo	31-32
6	Propiedades físicas del <i>p</i> -fluorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo	32
7	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -fluorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo	32-33
8	Propiedades físicas del <i>p</i> -clorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo	33
9	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -clorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo	34
10	Propiedades físicas del <i>p</i> -bromobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo	35
11	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -bromobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo	35-36
12	Propiedades físicas del <i>p</i> -yodobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo	36
13	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -yodobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo	36-37

No.	Nombre	Página
14	Propiedades físicas del <i>p</i> -metilbenzoato de 17- oxoandrost-5-en-3 β -ilo	37
15	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -metilbenzoato de 17- oxoandrost-5-en-3 β -ilo	37-38
16	Propiedades físicas del benzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	39
17	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del benzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	39-40
18	Propiedades físicas del <i>p</i> -fluorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	40
19	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -fluorobenzoato de 17-cloro-16-formil-androst-5,16-dien-3 β -ilo ...	41
20	Propiedades físicas del <i>p</i> -clorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	42
21	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -clorobenzoato de 17-cloro-16-formil-androst-5,16-dien-3 β -ilo	42-43
22	Propiedades físicas del <i>p</i> -bromobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	43
23	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -bromobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo ..	43-44
24	Propiedades físicas del <i>p</i> -yodobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	45
25	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -yodobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo ...	45-46
26	Propiedades físicas del <i>p</i> -metilbenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo	46
27	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -metilbenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo ..	46-47
28	Proporción de moles a reaccionar para la reacción de introducción del anillo de benzimidazol	48
29	Proporción de moles a reaccionar de acuerdo al sustrato utilizado	
30	Propiedades físicas del benzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	49
31	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del benzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	49-50
32	Propiedades físicas del <i>p</i> -fluorobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	50
33	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -fluorobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	51
34	Propiedades físicas del del <i>p</i> -clorobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	52
35	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del del <i>p</i> -clorobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo	52-53
36	Propiedades físicas del <i>p</i> -bromobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo ...	53

No.	Nombre	Página
37	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -bromobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo	54
38	Propiedades físicas del <i>p</i> -yodobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo	55
39	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -yodobenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo	55-56
40	Propiedades físicas del <i>p</i> -metilbenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo	56
41	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -metilbenzoato de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo	57
42	Propiedades físicas del acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo	58
43	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo	58-59
44	Propiedades físicas del 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ol	60
45	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ol	60-61
46	Propiedades físicas del benzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo	62
47	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del benzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo	62-63
48	Propiedades físicas del <i>p</i> -fluorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo	63
49	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -fluorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo	64
50	Propiedades físicas del <i>p</i> -clorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo	65
51	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -clorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo	65-66
52	Propiedades físicas del <i>p</i> -bromobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo	66
53	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -bromobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo	66-67
54	Propiedades físicas del <i>p</i> -yodobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo	68
55	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -yodobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo	69
56	Propiedades físicas del <i>p</i> -metilbenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo	69

No.	Nombre	Página
57	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del <i>p</i> -metilbenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo	69-70
58	Eficiencia de la 5AR-1 para la conversión de T a DHT a diferentes pHs	80
59	Concentración necesaria de finasterida y de los nuevos esteroides para inhibir las actividades de 5 α -reductasa tipo 1 y 2 al 50% (CI ₅₀)	82
60	Desplazamiento de los protones correspondientes a la ¹ H-RMN de los benzoatos de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo. Espectros 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2 y 6.2	88
61-61.1	Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ¹³ C-RMN de los benzoatos de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo. Espectros 1.3, 2.3, 3.3, 4.3, 5.3 y 6.3	89
62	Desplazamiento de los protones correspondientes a la ¹ H-RMN de los benzoatos de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 7.2, 8.2, 9.2, 10.2, 11.2 y 12.2	92
63-63.1	Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ¹³ C-RMN de los benzoatos de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 7.3, 8.3, 9.3, 10.3, 11.3 y 12.3	93
64-64.1	Desplazamiento de los protones correspondientes a la ¹ H-RMN de los benzoatos de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 13.2, 14.2, 15.2, 16.2, 17.2 y 18.2	96
65-65.1	Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ¹³ C-RMN de los benzoatos de 17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 13.3, 14.3, 15.3, 16.3, 17.3 y 18.3	98
66	Desplazamiento de los protones correspondientes a la ¹ H-RMN del acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo. Espectro 19.2	101
67	Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ¹³ C-RMN del acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo. Espectro 19.3	
68	Desplazamiento de los protones correspondientes a la ¹ H-RMN del 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ol. Espectro 20.2	102
69	Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ¹³ C-RMN del 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ol. Espectro 20.3	
70	Desplazamiento de los protones correspondientes a la ¹ H-RMN de los benzoatos de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2 y 26.2	104
71-71.1	Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ¹³ C-RMN de los benzoatos de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 21.3, 22.3, 23.3, 24.3, 25.3 y 26.3	105

ÍNDICE DE GRÁFICAS

No.	Nombre	Página
1	Actividad de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 en presencia de diferentes concentraciones de proteína	79
2	Actividad de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 a diferentes pHs	
3	Cinética enzimática de la 5 α -reductasa tipo 1 a pH de 7.5 .	80
4	Eficiencia enzimática de la 5 α -reductasa tipo 1 diferentes pHs	81
5	Tamaño de la mancha pigmentada del órgano del flanco en presencia o ausencia del tratamiento con finasterida y con los nuevos esteroides	84
6	Efecto de los nuevos esteroides sobre el peso de la próstata y de las vesículas seminales	85

ABSTRACT

Prostate conditions currently occupy the second place in disease in males. Two common conditions include Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) and Prostate Cancer (PCa), which depend on the presence of androgens.

Within the androgens, dihydrotestosterone plays an important role in the development of prostate cancer as well as in BPH, therefore, the biogenesis and inhibition of dihydrotestosterone (DHT) as an option for the prevention and treatment of these conditions has been explored. This thesis presents the development of novel inhibitors of 5 α -reductase enzyme (5ARIs), the enzyme responsible for transforming testosterone (T) to DHT, which leads to a lower risk of adverse effects associated with androgen deprivation therapy.

The goal of the current research was to develop 5 α -reductase inhibitors, without altering the androgen metabolism and thereby avoiding the different adverse effects that accompany the treatment that is used nowadays, or alternatively, to find chemical entities capable of inhibiting the androgen receptor in androgen derivatives which are less aggressive, due to their compatibility with the men's organism, for the treatment of prostate cancer.

The aim of this study was to synthesize derivatives of 3 β -dehydroepiandrosterone esters with or without substituents at C16 and C17 with possible therapeutic potential for the treatment of BPH and / or PCa, either by inhibition of the activity of the enzyme 5 α -reductase and / or antagonizing the AR.

In case of 5 α -reductase enzyme, it has been reported that this enzyme contains a pocket capable of forming a link with the vinylic chloride, with benzimidazole and with the methoxyl group. In addition, it has also been reported that high electron density at C3 and C17 increases the inhibitory activity on the enzyme. Furthermore, our research group had demonstrated that the ester group at the 3 β -position of the DEHA derivatives play an important role in the reduction of the weight of the prostate gland and are potent inhibitors of the enzyme activity. It is worth to mention that these esters (alicyclic compounds) did not bind to the androgen receptor.

Finally, with the intention of generating new chemical species that could act as antagonists to the RA, it was considered appropriate to maintain the presence of the ester group to ensure its bioavailability, and to introduce a isostere group in C17 of its natural ligand (hydroxyl group), in this case a methoxyl group.

The biological effect of these steroids was demonstrated *in vivo* as well as *in vitro* experiments. In the *in vivo* experiments, we measured the activity of 18 steroids on the diameter of the pigmented spot of the flank organs as well as the weight of the prostate gland in gonadectomized hamsters treated with testosterone. For the studies *in vitro*, we determined the IC₅₀ values by measuring the concentration of the steroidal derivatives that inhibits 50% of the activity of 5 α -reductase type 1 and 2 enzyme which are present in rat liver and human prostate respectively. The binding capacity of these derivatives to the androgen receptors (AR) obtained from rat's prostate was also determined.

I

RESUMEN

Las afecciones prostáticas ocupan en la actualidad el segundo lugar respecto a las enfermedades en el sexo masculino. Dos afecciones frecuentes son la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) y el Cáncer de Próstata (CaP), las cuales dependen de la presencia de andrógenos.

Dentro de los andrógenos, la dihidrotestosterona (DHT) juega un papel preponderante tanto en el desarrollo de la próstata como en la HPB y el CaP, por lo que se ha explorado la inhibición de la biogénesis de la dihidrotestosterona como una opción en la prevención y tratamiento de estos padecimientos. En este trabajo de tesis se presenta el desarrollo de nuevos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa (5ARIs), enzima responsable de transformar la testosterona (T) a DHT, que conlleven a un menor riesgo de efectos adversos asociados con la terapia consistente en la privación de andrógenos.

Por lo anterior, este trabajo de tesis se enfocó en sintetizar nuevas especies químicas para el tratamiento de cualquiera de estas dos enfermedades, generando compuestos capaces de inhibir la vía que cataliza la enzima 5 α -reductasa sin alterar, en la medida de lo posible, el metabolismo de andrógenos y evitar con ello los diferentes efectos adversos que acompañan a los tratamientos que se usan hoy en día para la HPB y el CaP; o en su defecto, encontrar entidades químicas derivadas de los andrógenos capaces de inhibir al receptor androgénico (RA), que resultaran menos agresivas por su compatibilidad con el organismo de los varones para el tratamiento del CaP. Por lo que el objetivo de este trabajo fue sintetizar diferentes 3 β -

ésteres derivados de la deshidroepiandrosterona (DHEA) con o sin sustituyentes en C16 y C17 con posible potencial terapéutico para el tratamiento de la HPB y/o el CaP, ya fuera mediante la inhibición de la actividad de la enzima 5α -reductasa y/o como antagonistas del RA, tomando como principio el hecho de que se sabe que el insertar en la posición 3β - del esteroide un grupo éster aumenta la biodisponibilidad del mismo, garantizando con ello su llegada a la diana, ya sea la enzima 5α -reductasa o el RA.

Además, en el caso de la enzima, se ha reportado que presenta una hendidura de carácter altamente lipofílico, hendidura que posiblemente permita interactuar con los nuevos sustituyentes que se propuso introducir en C17 dentro los nuevos derivados (-Cl vinílico, benzimidazol y -OMe). Además de que también se ha publicado que sustituyentes con elevada densidad electrónica en C3 y C17 aumentan la actividad inhibitoria del esteroide sobre la enzima. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que el grupo éster en la posición 3β - en derivados de la DEHA juega un papel importante en la disminución del peso de la glándula prostática y son potentes inhibidores la actividad de la enzima, además de que no unen al receptor androgénico, haciéndolos específicos contra la actividad enzimática, lo cual llevaría a generar nuevas entidades con actividad específica, lo cual es deseable al momento de proponer un nuevo posible fármaco, pues esto disminuye significativamente la aparición de efectos adversos.

Finalmente, con la intención de generar nuevas especies químicas que pudieran actuar como antagonistas del RA se consideró conveniente mantener la presencia del grupo éster para garantizar su biodisponibilidad, así como introducir un grupo isótero de su ligante natural en C17 (grupo hidroxilo), en este caso un grupo metoxilo.

El efecto biológico de estos esteroides se evaluó mediante ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*. En los ensayos *in vivo* se midió la actividad de 18 esteroides en el diámetro de la mancha pigmentada del órgano del flanco así como sobre el peso de la próstata y de las vesículas seminales de hámsters cepa dorada gonadectomizados tratados con testosterona. Para los estudios *in vitro*, se determinaron los valores de CI_{50} midiendo la concentración de los nuevos esteroides que inhibían el 50% de la actividad de la enzima 5α -reductasa presente en extractos de hígado de rata y de próstata humana respectivamente. También se determinó la capacidad de unión de estos derivados hacia el RA a partir de extractos de próstata de rata.

II INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han revertido los principales tipos de enfermedades epidemiológicas alrededor del mundo, ahora las enfermedades con mayor incidencia son los padecimientos crónico-degenerativos tales como la diabetes, el cáncer, la hipertensión y padecimientos cardiovasculares. Particularmente, las afecciones prostáticas constituyen un problema de salud pública en todo el mundo, ya que a consecuencia del envejecimiento, después de los 50 años, más de la mitad de los varones presentan hiperplasia prostática benigna y a los 80 años prácticamente el 100% padecen este trastorno; además de que el cáncer de próstata es el tumor más frecuente en hombres, no sólo en México sino en todo el mundo, muriendo cada año alrededor de seis mil hombres mayores de 55 años a consecuencia de esta enfermedad en nuestro país⁸ y alrededor de 27,360 en todo el mundo¹.

Con el fin de encontrar tratamientos eficaces para liberar los síntomas urinarios que presentan los pacientes con HPB, así como mejorar su calidad de vida y reducir las complicaciones por la obstrucción de la vejiga, existen varios tipos de tratamientos; uno de ellos, y que es de nuestro particular interés, es el farmacológico, que se basa en la reducción del tono muscular del músculo liso de la próstata (el cual contribuye al componente dinámico de la Obstrucción Prostática Benigna (OPB)) y/o a la reducción del volumen de la glándula) a través de:

❖ Antagonistas α -adrenérgicos

La obstrucción de la vejiga debido a la HPB se debe parcialmente al efecto dinámico del tono del músculo liso de la próstata mediado por los α -adrenoreceptores. Los antagonistas α -adrenérgicos han mostrado resultados tanto objetivos como subjetivos en la mejoría de aproximadamente el 80% de los pacientes. Existen varios antagonistas α -adrenérgicos de uso clínico, p. ej. la prazosina, la terazosina y la doxazosina, que presentan cierta incidencia de efectos adversos cardiovasculares; así como nuevos agentes como la alfuzosina y la tamsulosina.

❖ Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa

Agentes como la finasterida y la dutasterida bloquean la actividad de la enzima 5 α -reductasa, y con ello la conversión de T a DHT, reduciendo el tamaño de la próstata con un efecto mínimo en la potencia sexual y la libido⁴. La finasterida fue el primer inhibidor de la enzima 5 α -reductasa aprobado por la USFDA (United States Food and Drug Administration) en 1992 para el tratamiento de la HPB. Reduce los niveles en plasma de la DHT en un 70% a un 90% con la consecuente reducción en el tamaño de la próstata, sin embargo, su máximo efecto lo exhibe después de 6 a 9 meses de tratamiento.

Por otro lado, la dutasterida es aproximadamente 60 veces más activa que la finasterida y fue aprobada en el 2002 por la USFDA para el uso en el tratamiento de la HPB. Reduce los niveles de DHT por abajo del 90% después de un año de administración oral, lo cual resulta en una disminución en el tamaño de la próstata¹.

El uso por periodos de tiempo tan prolongados al que deben someterse los pacientes con HPB para su tratamiento, les provoca, entre otros efectos, daño hepático, lo cual genera la necesidad de encontrar nuevos fármacos capaces de inhibir la actividad de la enzima de manera efectiva, a tiempos más cortos de tratamiento y evitando los efectos hepatotóxicos.

Por otro lado, entre los tratamientos utilizados dentro del protocolo para pacientes con CaP está la quimioterapia. Gracias a los avances de ésta, se ha podido progresar de manera por demás sustancial en el tratamiento de pacientes con este padecimiento. La meta de la quimioterapia es eliminar todas las células cancerosas hasta la remisión de la enfermedad o hasta un punto en el que su avance se detiene. Sin embargo, la quimioterapia presenta algunos inconvenientes:

- ❖ La efectividad del fármaco.
- ❖ La resistencia de las células cancerosas a los fármacos iniciales o bien, éstas llegan a desarrollarla en etapas posteriores del tratamiento.
- ❖ Los fármacos no son selectivos y afectan también a las células sanas. A pesar de que las células neoplásicas difieren de las células normales en sus requerimientos

nutrimentales, desafortunadamente no difieren lo suficiente en el aspecto biológico y bioquímico. Las células más afectadas son las que también se dividen rápidamente como las del folículo piloso, el tracto gastrointestinal y la médula ósea, ocasionando efectos secundarios al paciente. El tipo y la intensidad de los efectos secundarios dependerá del fármaco y el paciente.

Lo anterior se ve reflejado en una baja eficacia del tratamiento y una pobre calidad de vida con beneficios mínimos para los pacientes.

Para solucionar estos problemas, la investigación en quimioterapia así como para los diversos tratamientos farmacológicos, se enfocan en descubrir y diseñar nuevas especies químicas que incrementen el número de fármacos para combatir el padecimiento en cuestión y que tengan mayor selectividad, reduciendo con ello el número de efectos colaterales y mejorando las probabilidades de remisión.

Una de las formas de obtención de nuevos fármacos se basa en la modificación estructural de una molécula líder con el fin de optimizar su actividad farmacológica. Este proceso de búsqueda suele ser más productivo debido a que existe una gran probabilidad de que una molécula obtenida por modificación estructural de una molécula líder presente actividad farmacológica; además, ofrece ventajas económicas, ya que tanto los métodos de síntesis como de ensayos farmacológicos de análogos serán semejantes a los utilizados en la molécula líder; incluso, si no llegan a conseguirse análogos más activos, se pueden obtener datos que permitan una correlación estructura-actividad que dé la opción de avanzar en la detección de grupos farmacofóricos esenciales para la actividad biológica^{1,1}.

En este contexto se propuso como molécula de partida a la deshidroepiandrosterona (DHEA) debido al interés clínico significativo que presenta basado en múltiples observaciones, además de ser el esteroide más abundante en los humanos.

Descubrimientos *in vitro*, modelos animales y observaciones en poblaciones humanas sustentan la utilidad de la DHEA como un agente terapéutico. Los beneficios periféricos asociados con la administración de la DHEA incluyen el aumento en la densidad de los huesos, mejoran la función inmune así como la hidratación de la piel. También se han observado efectos positivos sobre el sistema nervioso central (SNC), los cuales incluyen el aumento en la neuroprotección, mejoran la sensación de bienestar, libera de la depresión y reduce los síntomas negativos de la esquizofrenia. Se ha descrito también que mejora el aprendizaje y la memoria, aunque los resultados en esta área han sido inconsistentes.

Por otro lado, varios efectos producidos por la DHEA u otros andrógenos fueron bloqueados por la flutamida (FLU), un antiandrógeno no esterooidal, lo cual confirma los efectos androgénicos de la misma⁹. Además de que se han reportado algunos derivados de la DHEA como inhibidores de la enzima 5AR y antagonistas del RA¹⁰, que producen una disminución en el tamaño de tumores cancerosos de próstata^{5,11-12} y antagonizan los efectos de la DHT de igual manera que el androst-5-en-3 β ,17 β -diol (adiol) en cultivos de líneas celulares LNCaP¹³.

Previamente, nuestro grupo de trabajo reportó que el grupo éster en la posición 3 β - de derivados de la DHEA juega un papel importante en la disminución del peso de la glándula prostática y son potentes inhibidores de la actividad de la enzima 5 α -reductasa presente en próstata (valores bajos de CI₅₀) además de que no unen al receptor androgénico¹⁴.

Siendo por lo tanto nuestra propuesta, el llevar a cabo ciertas modificaciones estructurales específicas en algunos sitios metabólicos susceptibles dentro de la molécula de la DHEA, con el fin de generar nuevas entidades químicas capaces de inhibir la actividad de la enzima 5 α -reductasa y/o ser antagonistas del receptor androgénico para poder ser utilizadas en el tratamiento de la HPB y/o el CaP, y que puedan mostrar una mayor especificidad, efectos a tiempos más cortos y menos efectos adversos en los pacientes durante el tratamiento de dichos padecimientos. Estas series de compuestos contienen un éster derivado del ácido benzoico en la posición 3 β - de la DHEA, pueden contener una función -CHO y -Cl vinílicos en la posición -16 y -17 respectivamente, y pueden mostrar un sustituyente en C-17, ya sea un anillo de benzimidazol o un grupo metoxilo, conservando el grupo formilo vinílico.

III ANTECEDENTES

3.1 Generalidades sobre la próstata

La próstata, una glándula exclusivamente masculina, está ubicada enfrente del recto y debajo de la vejiga, como se muestra en la Figura 1. El tamaño de la próstata varía con la edad, en los hombres más jóvenes, la próstata es del tamaño de una nuez, pero puede ser mucho más grande en hombres de más edad.

La función de la próstata consiste en producir un líquido que protege y nutre a los espermatozoides presentes en el semen. Inmediatamente detrás de la próstata se encuentran las vesículas seminales, que producen el mayor volumen del líquido para el semen. La uretra, que es el conducto que transporta a la orina y al semen fuera del cuerpo a través del pene, pasa por el centro de la próstata¹⁵.

La próstata comienza a desarrollarse antes del nacimiento y continúa su crecimiento hasta que el hombre alcanza la edad adulta. Este crecimiento es promovido por hormonas masculinas llamadas andrógenos. El andrógeno principal es la testosterona, la cual se produce en los testículos. La enzima 5 α -reductasa (5AR) transforma la T en DHT, la cual le envía una señal a la próstata para que crezca. Mientras las hormonas masculinas estén presentes, la próstata permanece del tamaño normal para un adulto. En los varones mayores de 45 años, la parte interior de la próstata (alrededor de la uretra) a menudo sigue creciendo causando una

condición común llamada hiperplasia prostática benigna (HPB). Cuando se presenta esta afección, el tejido de la próstata puede presionar la uretra, lo que causa problemas al paso de la orina. La HPB puede ser un problema de salud grave, pero no es cáncer¹⁶.

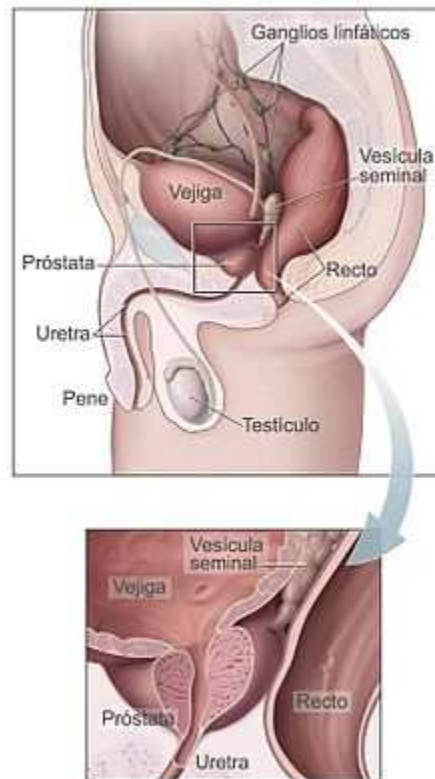


Figura 1
Esquema del sistema reproductor masculino

3.2 Hiperplasia prostática benigna

La hiperplasia prostática benigna (HPB) también es conocida como hipertrofia prostática benigna, crecimiento prostático benigno u obstrucción prostática benigna.

La HPB es definida de acuerdo a criterios clínicos como la presencia de una obstrucción del flujo de salida de la vejiga y el crecimiento prostático benigno. Esto es conocido también como prostatismo. El crecimiento de la próstata es prácticamente universal en los hombres debido a la edad, cuando el tamaño de esta glándula es muy grande puede llegar a comprimir la uretra, lo que lleva a una obstrucción significativa parcial o casi total de los canales de la uretra, lo cual impide el paso del flujo de la orina y una retención urinaria aguda en algunos hombres. La HPB provoca síntomas como dificultad para orinar, necesidad frecuente de orinar, disuria (dolor al orinar), aumento en el riesgo de infecciones del tracto urinario y retención urinaria. No se ha encontrado una relación directa entre la severidad de los síntomas y el tamaño de la próstata. Algunos hombres presentan síntomas severos de obstrucción urinaria con un crecimiento prostático mínimo, mientras que otros presentan síntomas mínimos con próstatas grandes¹⁷.

La patogénesis de la HPB no es bien conocida hasta el momento, sin embargo, algunas causas posibles son:

- ❖ Conversión de la T plasmática de los testículos por la 5AR en DHT, la cual promueve el crecimiento prostático¹⁸.
- ❖ Un aumento de los niveles de estradiol (la enzima aromatasa convierte la T a estradiol) como resultado de la edad. Los estrógenos actúan sinérgicamente con la DHT para inducir a los receptores androgénicos así como el crecimiento prostático.
- ❖ Activación de los adrenorreceptores α_1 , lo que incrementa el tono del músculo liso del cuello de la vejiga y la próstata.

La HPB se presenta, en general, en los hombres mayores de 45 años y su prevalencia aumenta con la edad. La evidencia de los estudios de autopsias, sugiere que más del 90% de los hombres mayores de 70 años presentan HPB. Sin embargo, a pesar de la alta prevalencia, la mortalidad asociada con la HPB es baja, y la presencia de complicaciones serias no es frecuente.

La elección del tratamiento apropiado se basa en la severidad de los síntomas, en el grado en que afectan el estilo de vida del individuo y en la presencia de cualquier otra condición médica. Las opciones de tratamiento incluyen, una espera con vigilancia cuidadosa, diversas terapias con medicamentos y diversos métodos quirúrgicos¹⁹.

Medicamentos

Bloqueadores α_1 -adrenérgicos

La terapia médica actual puede incluir el uso de bloqueadores α_1 -adrenérgicos como la doxazosina, prazosina, tamsulosina y terazosina, también utilizados frecuentemente en el tratamiento de la hipertensión arterial. Estos medicamentos se usan en el tratamiento de la HPB ya que relajan los músculos del cuello vesical y facilitan la micción. Dos tercios de las personas tratadas con bloqueadores α_1 -adrenérgicos manifiestan mejoría de los síntomas.

Inhibidores de la enzima 5α -reductasa

Agentes como la finasterida y la dutasterida (Figura 2) bloquean a la enzima 5α -reductasa, y con ello la conversión de T a DHT, reduciendo el tamaño de la próstata con un efecto mínimo en la potencia sexual y la libido⁴. La finasterida fue el primer inhibidor de la enzima 5α -reductasa aprobado por la USFDA (United States Food and Drug Administration) en

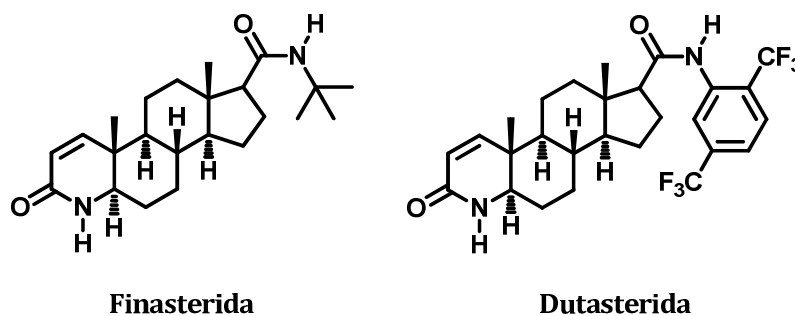
1992 para el tratamiento de la HPB. Reduce los niveles en plasma de la DHT en un 70 a un 90% con la consecuente reducción en el tamaño de la próstata, sin embargo, su máximo efecto lo exhibe después de 6 a 9 meses de tratamiento.

Por otro lado, la dutasterida es aproximadamente 60 veces más activa que la finasterida y fue aprobada en el 2002 por la USFDA para el uso en el tratamiento de la HPB. Reduce los niveles de DHT por debajo del 90% después de un año de administración oral, lo cual resulta en una disminución en el tamaño de la próstata¹.

El uso por periodos de tiempo tan prolongados al que deben someterse los pacientes con HPB para su tratamiento, les provoca, entre otros efectos, daño hepático, lo cual genera la necesidad de encontrar nuevos fármacos capaces de inhibir la actividad de la enzima de manera efectiva, a tiempos más cortos de tratamiento y evitando los efectos hepatotóxicos.

Cirugía

La cirugía se aconseja generalmente en los casos con síntomas de incontinencia, hematuria recurrente, retención urinaria e infecciones urinarias recurrentes. La elección del tipo de procedimiento quirúrgico generalmente se basa en la severidad de los síntomas y el tamaño y forma de la próstata.



Finasterida **Dutasterida**
Figura 2
Fármacos utilizados para el tratamiento de la HPB

3.3 Dihidrotestosterona

La dihidrotestosterona (DHT) juega un papel importante en el mantenimiento de la próstata en mamíferos. Este andrógeno ha sido asociado con la HPB, una enfermedad predominante en varones adultos²⁰. Aunque una prostatectomía es requerida cuando la progresión de la enfermedad causa infecciones recurrentes, sangrado o hidronefrosis²¹, una terapia alternativa que alivie los síntomas de la HPB puede ser disminuyendo los niveles de DHT vía la inhibición de la enzima esteroidea 5 α -reductasa o a través de antagonistas del receptor androgénico²².

Diferentes estudios bioquímicos han demostrado que la próstata está sujeta al estímulo de la DHT (Figura 3), ya que su unión a receptores prostáticos es de mayor afinidad, además de haberse demostrado la presencia de la enzima 5AR en este tejido²³.

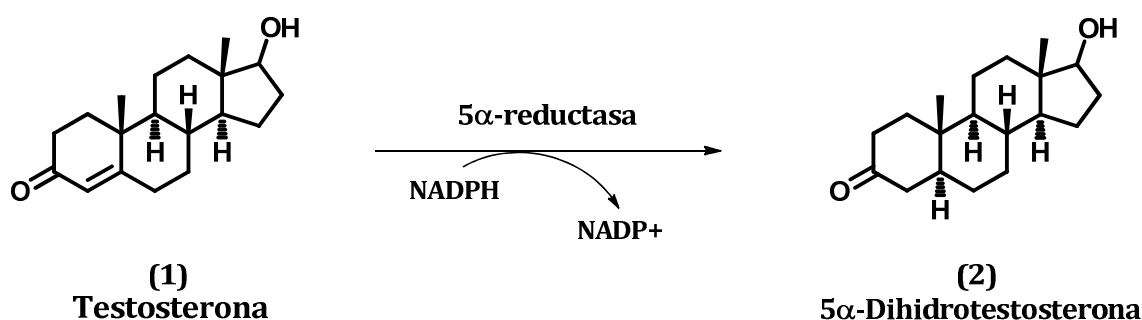


Figura 3
Conversión de la T a 5α-DHT por la enzima 5α-reductasa dependiente de NADPH

Dado que la T y la DHT tienen un receptor común, parece sorprendente que el efecto de la DHT no sea mimetizado por la T. Esto podría explicarse considerando que la DHT tiene mayor afinidad por el RA que la T y por lo tanto amplifica la señal androgénica. Se ha informado que el complejo DHT-receptor tiene una mayor afinidad por los elementos de respuesta hormonal del ADN que el complejo T-receptor²⁴⁻²⁶. Por lo tanto, la conversión local de T a DHT por la enzima 5AR sirve como una amplificación del efecto androgénico. Dicha amplificación podría ser menos crítica en donde la T es suficiente para provocar dicho efecto, como el desarrollo anabólico, pero esencial para los tejidos que son dependientes de DHT como la próstata, vesículas seminales y las glándulas sebáceas.

3.4 Enzima 5α-reductasa

La enzima 5α-reductasa (3-oxo-esteroide-4-en-deshidrogenasa) EC 1.3.99.5, es una proteína hidrofóbica de membrana²⁷⁻³⁰ que cataliza la reducción dependiente de NADPH de T a DHT. Se han identificado tres isoformas de esta enzima en humanos^{1,28,31}, la isoforma tipo 1 (5AR-1) predomina en las glándulas sebáceas de la piel y el hígado y su actividad óptima se realiza en medio básico; mientras que la isoforma tipo 2 (5AR-2) es más abundante en la próstata, vesículas seminales, hígado y epidídimo^{1,32} y presenta su mayor actividad a pH ácido. La isoforma tipo 3 (5AR-3) se describió recientemente y se ha detectado en el cáncer de próstata refractario al tratamiento hormonal (CaPRH Cáncer de Próstata Refractario a Hormonas), es ubicua en mamíferos, además de localizarse en tejidos no androgénicos como el páncreas y el cerebro^{1,31}.

Tanto la T como la DHT se unen al RA, sin embargo, la DHT se une al receptor con aproximadamente una afinidad 2 a 10 veces mayor que la T, se disocia de éste de una manera mucho más lenta, además de que su unión con el RA resulta en una conformación que es mucho más resistente a la degradación. Una actividad elevada de la enzima 5AR resulta en grandes cantidades disponibles del ligante más potente para promover el crecimiento de la próstata, por lo que la inhibición de la actividad de ésta es una herramienta muy valiosa para reducir la

proliferación. La Tabla 1 muestra las características y propiedades bioquímicas de las isoenzimas 5AR-1 y 5AR-2¹.

PROPIEDADES	5AR-1	5AR-2
Tamaño	259 aa	254 aa
Peso molecular	29.5 kDa	28.4 kDa
pH óptimo	6-8.5	5-5.5
Estado bioquímico	Hidrofóbica	Hidrofóbica
Distribución tisular	Hígado, piel, folículos pilosos, cerebro, ovarios, próstata, testículos	Próstata, epidídimo, vesículas seminales, piel de los genitales, útero, pecho, placenta, testículos
Expresión en próstata	Normal (baja), alta en HPB y cáncer	Normal e HPB (alta), baja en cáncer
Nombre del gen	SRD5A1	SRD5A2
Localización cromosomal	5p15	2p23

Tabla 1 | Propiedades de las isoenzimas 5AR¹. aa = aminoácidos.

El mecanismo por el cual actúa la enzima 5 α -reductasa es mediante la donación directa de un hidruro *pro-S* por parte del cofactor NADPH a la cara α menos impedida de la T, una vez que ha sido activada la enona por una interacción electrostática entre la enzima y la T, el enolato generado es estabilizado por la enzima y subsecuentemente es protonado para generar la 5 α -DHT^{33,34} (Figura 4).

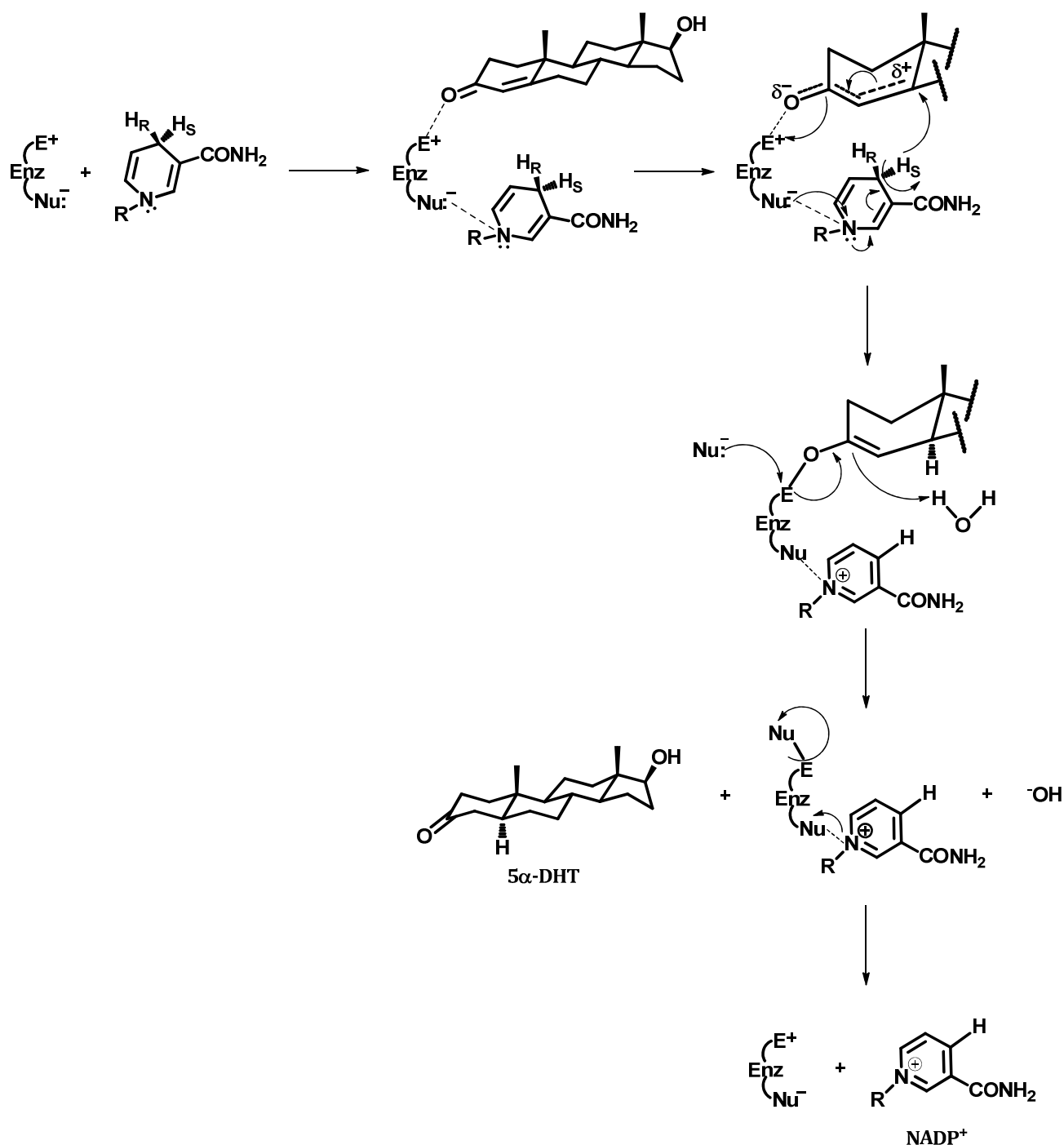


Figura 4

Mecanismo de reducción de la T

Enz = enzima; **E⁺** = electrófilo o sitio electrofílico; **Nu⁻** = nucleófilo o sitio nucleofílico; **R** = fosfato de adenindinucleótido (ADP); **5 α -DHT** = 5 alfa-dihidrotestosterona; **NADP⁺** = forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido^{34.1}.

Ninguna de las isoenzimas ha sido purificada a la fecha debido a su naturaleza inestable, por lo que los inhibidores de éstas han sido diseñados por modificación del sustrato¹.

3.4.1 Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa

Los inhibidores de la 5AR más estudiados han sido los 4-azaesteroides^{1,35,36}. Los azaesteroides son esteroides modificados químicamente que se obtienen al sustituir un átomo de carbono por uno de nitrógeno en diferentes posiciones del anillo A, se han producido una variedad de estos compuestos que se ha encontrado inhiben la actividad de 5AR. La finasterida (4-aza-17 β -N-(*t*-butil)carboxamido-5 α -androst-1-en-3-ona) y la dutasterida (4-aza-17 β -N-[2,5-bis(trifluorometil)fenil]carboxamido-5 α -androst-1-en-3-ona) (Figura 2), pertenecen al grupo designado como 4-azaesteroides 17 β -sustituidos y son una de las clases más estudiadas de inhibidores de la 5AR. Ambos fármacos muestran características de inhibidores competitivos en ensayos cinéticos de corto plazo, pero en los análisis de reacciones a largo plazo han mostrado que son inhibidores irreversibles debido a la formación de intermediarios muy estables.

Las interacciones entre los 4-azaesteroides y las isoenzimas de la 5AR se describen por un mecanismo de dos pasos:



Figura 5

Mecanismo de interacción entre los 4-azaesteroides y las isoenzimas de la 5AR

E = enzima; I = inhibidor; K_i = constante de inhibición para el primer paso del equilibrio (se alcanza rápidamente); k_3 = constante de velocidad para el segundo paso, es dependiente del tiempo (se alcanza más lentamente).

Se ha observado que la finasterida presenta mayor afinidad por la 5AR-2, actúa como un sustrato alternativo para esta isoforma y en un inicio se une de una manera sumamente estable formando un aducto NADP-dihidrofinasterida el cual finalmente es procesado a dihidrofinasterida; este aducto es un potente inhibidor análogo, lo cual hace a la finasterida uno de los inhibidores no covalentes conocidos más potentes. La finasterida también es un inhibidor de la 5AR-1, pero el aducto de dihidrofinasterida se forma con una constante de velocidad mucho más lenta que el de la 5AR-2. Por lo que se realiza una intensa investigación con el fin de encontrar inhibidores efectivos de ambas isoformas, principalmente cuyo grado de inhibición aumente con respecto a la isoforma tipo I, lo cual resultaría ventajoso^{36,1}

La finasterida fue el primer inhibidor de la enzima 5 α -reductasa aprobado por la USFDA en 1992 para el tratamiento de la HPB, reduce los niveles en plasma de la DHT en un 70 a 90% con la consecuente reducción en el tamaño de la próstata, sin embargo, su máximo efecto lo exhibe después de 6 a 9 meses de tratamiento¹.

Por otro lado, la dutasterida es un inhibidor dual específico de la 5AR. Estudios enzimáticos indican que es un inhibidor competitivo irreversible muy potente de ambas isoformas 5AR-1 y 5AR-2 en humanos. Forma un complejo estable con ambas isoenzimas el cual presenta un grado de disociación lento (Tabla 2). La dutasterida es aproximadamente 60 veces más potente que la finasterida y fue aprobada en el 2002 por la USFDA para su uso en el

tratamiento de la HPB. Reduce los niveles de DHT por abajo del 90% después de un año de administración oral, lo cual resulta en una disminución en el tamaño de la próstata¹.

La finasterida y la dutasterida son los dos únicos fármacos esteroidales usados en la clínica, aunque existen otros, como la episterida aún en estudios de fase clínica; lo cual sugiere la necesidad de encontrar nuevos fármacos para el tratamiento de dicho padecimiento, que sean efectivos a tiempos más cortos y que produzcan menos efectos adversos. Esto debido a que dentro de los efectos secundarios de cada medicamento están, en el caso de la finasterida, impotencia (1.1% a 18.5%), trastornos en la eyaculación (8,4%), alteración de la función sexual (2,5%), ginecomastia (2,2%), disfunción eréctil (1,3 %), y dolor testicular³⁷; y por otro lado, la dutasterida puede provocar la incapacidad para tener o mantener una erección, la disminución del deseo sexual, problemas con la eyaculación, cambios en los senos (como aumento de tamaño, aparición de bultos, dolor o secreción de los pezones), inflamación de la cara, la lengua o la garganta, dificultad para respirar o tragar y descamación de la piel³⁸.

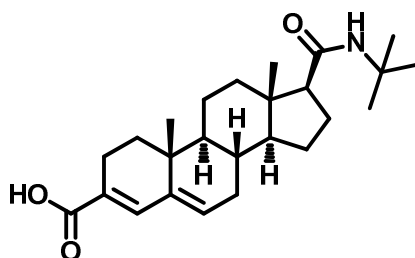


Figura 6
Episterida

3.5 Generalidades sobre el cáncer

El cáncer es un proceso en el cual las células de un órgano crecen fuera de control. Hay muchos tipos de cáncer, pero todos ellos se caracterizan por una proliferación anormal de las células, las cuales pueden invadir otros tejidos, fenómeno que las células normales no pueden hacer. De este modo, las células cancerosas forman un tumor.

Las células cancerosas entran al torrente sanguíneo o a los vasos linfáticos y pueden viajar a otras partes del cuerpo para formar nuevos tumores que reemplazan a los tejidos normales. Este proceso se llama metástasis. Otro mecanismo de propagación del cáncer es por invasión, que es la migración y la penetración directa por las células cancerosas en los tejidos vecinos.

No importa a dónde se propague el cáncer, siempre recibe el nombre de su lugar de origen. Los diferentes tipos de cáncer pueden comportarse de manera muy diferente; por ejemplo, el cáncer de pulmón y el de seno son enfermedades muy diferentes que crecen a ritmos desiguales y responden a diferentes tratamientos. Es por eso que las personas con cáncer necesitan un tratamiento dirigido a su propio tipo de cáncer.

Algunos tumores no son cancerosos y se consideran benignos, ya que crecen en un solo lugar y no pueden diseminarse ni invadir otras partes del cuerpo. Aún así pueden ser peligrosos si presionan órganos vitales, tales como el cerebro. Con frecuencia, el tratamiento incluye la cirugía. Los tumores benignos no suelen crecer nuevamente³⁹.

3.5.1 Cáncer de próstata

En México, el cáncer de próstata (CaP) se ha incrementado en un 30%, siendo la segunda causa de cáncer entre los hombres de 40 años y la primera en varones de 65⁴², además de que es el cáncer de mayor incidencia en hombres en los Estados Unidos y en Europa, lo que lo convierte en un grave problema de salud mundial.

Varios tipos de células se encuentran en la próstata, pero casi todos los casos de cáncer de próstata se desarrollan a partir de las células de la glándula. Algunos cánceres de próstata pueden crecer y propagarse rápidamente, pero la mayoría de éstos crecen lentamente³⁹.

3.5.2 Factores de riesgo

Un factor de riesgo es todo aquello que afecta la probabilidad de padecer una enfermedad. Sin embargo, los factores de riesgo no lo indican todo. Muchas personas con uno o más factores de riesgo nunca padecen cáncer, mientras que otras que ya tienen la enfermedad puede que no hayan tenido factores de riesgo conocidos.

A la fecha no se entienden completamente las causas del cáncer de próstata, pero los investigadores han encontrado varios factores que pueden contribuir al riesgo de padecer esta enfermedad. Para otros, la asociación de estos factores con el riesgo de padecer CaP aún no está claro³⁹.

A continuación se enumeran dichos posibles factores:

- ❖ Edad
- ❖ Raza o grupo étnico
- ❖ Antecedentes familiares
- ❖ Inflamación de la próstata

3.5.3 Pruebas para la detección del cáncer de próstata

La detección del CaP implica buscar la presencia de cáncer antes de que produzca síntomas. Esto resulta útil para descubrir el cáncer en una fase temprana, cuando puede ser más fácil de tratar⁴⁰.

Las pruebas que se realizan habitualmente para detectar el cáncer de próstata son⁴¹:

- ❖ **Tacto rectal (TR):** se inserta un dedo enguantado y lubricado en el recto del paciente para palpar la próstata, con el fin de determinar su tamaño y sentir si hay bultos u otras anomalías.

- ❖ **Prueba del antígeno prostático específico (APE):** es un examen de sangre en el que se miden los niveles de APE . El APE es una proteína que produce la próstata. Los niveles de APE en la sangre pueden ser más elevados en los hombres que presentan CaP. Otras afecciones que afectan la próstata también pueden causar una elevación en los niveles del APE.

- ❖ **Ultrasonido**

3.5.4 Aspectos generales de las opciones de tratamiento

Existen diferentes tipos de tratamientos para todos los pacientes con cáncer de próstata. Algunos tratamientos son estándar (el que se usa en la actualidad) y otros están en investigación en fase de estudios clínicos. La elección del tratamiento más adecuado para el cáncer es una decisión que idealmente involucra al paciente, su familia y al equipo de atención médica³⁹. Entre éstos se encuentran:

- ❖ Vigilancia expectante
- ❖ Cirugía
- ❖ Radioterapia
- ❖ Criocirugía
- ❖ Quimioterapia
- ❖ Terapia biológica
- ❖ Terapia hormonal

3.5.4.1 Terapia hormonal

La terapia hormonal consiste en el uso de hormonas con el fin de detener el crecimiento de las células cancerosas. Las hormonas masculinas (en especial la T) pueden estimular el crecimiento del CaP. Con el fin de detener este crecimiento se pueden administrar hormonas femeninas o medicamentos que reducen la producción de las hormonas masculinas.

La terapia hormonal utilizada en el tratamiento del CaP puede incluir lo siguiente:

- ❖ Los estrógenos (hormonas que producen características sexuales femeninas): Pueden impedir que los testículos produzcan testosterona, sin embargo, los estrógenos rara vez se utilizan debido al riesgo en los efectos secundarios.
- ❖ Los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante, también pueden impedir que los testículos produzcan T. Algunos ejemplos son el leuprolide, el goserelín y el busarelín.
- ❖ Los fármacos que pueden impedir que las glándulas suprarrenales produzcan andrógenos, entre ellos el ketoconazol y la aminoglutetimida.
- ❖ La orquidectomía, que es la cirugía que se realiza para extirpar los testículos, principal fuente de hormonas masculinas, con el fin de reducir la producción de estas hormonas.

Cabe mencionar que los hombres tratados con este tipo de terapia desarrollan bochornos, deterioro de la función sexual y pérdida del apetito sexual.

- ❖ Los antiandrógenos esteroidales: Su función consiste en suprimir la acción biológica de los andrógenos (hormonas que producen las características sexuales masculinas), ya sea bloqueando los receptores androgénicos o impidiendo la función de ciertas enzimas conocidas como isoformas, que actúan en diferentes tejidos. Por lo que se refiere a los antiandrógenos, pueden estar constituidos por moléculas con una estructura esteroideal, como los que han sido desarrollados por nuestro grupo de investigación, o ser de tipo no esteroideal.

Los antiandrógenos comerciales ocasionan alteraciones hormonales, fallas cardíacas, retención de líquidos, efectos nocivos en las células del hígado (hepatotóxicos), disminución del deseo sexual, vómito y diarrea, entre otros síntomas; además, un tratamiento varía entre 600 y 2,000 pesos al mes.

Por lo tanto, investigaciones en este campo están enfocadas en anular, en la medida de lo posible, estas reacciones adversas de los antiandrógenos que se han sintetizado, y además, tienen por objeto diseñar un proceso de síntesis rentable, con altos rendimientos y bajos costos⁴².

3.5.4.2 Tratamientos basados en antiandrógenos esteroidales

El crecimiento de la glándula prostática, tanto el normal como el maligno, son completamente dependientes de los andrógenos disponibles. La privación de éstos se puede alcanzar por la supresión de la secreción testicular, ya sea por castración médica (dietilestilbestrol (DES) o ketokonazol) o quirúrgica (orquiectomía bilateral), sin embargo, como estos procedimientos no afectan la producción de andrógenos adrenales, son combinados frecuentemente con antagonistas del receptor androgénico como la hidroxiflutamida (HF) o la bicalutamida (BC)^{7,13,44} (Figura 6).

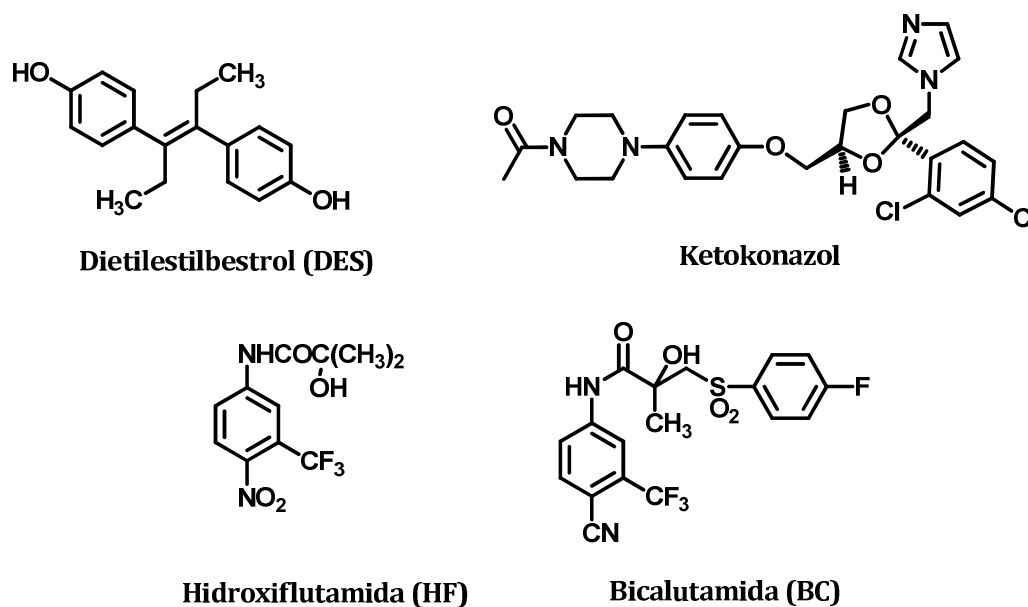


Figura 7
Fármacos utilizados para el tratamiento del Cáncer de Próstata

Los antagonistas de andrógenos pueden bloquear eficientemente la expresión de genes que codifican al receptor androgénico y ofrecer así una opción útil de tratamiento para el cáncer de próstata dependiente de andrógenos. El RA presenta una alta afinidad por sus ligandos esteroidales fisiológicos, la testosterona y la dihidrotestosterona, el metabolito activo de la T (Figura 3).

La HF y BC, potentes antiandrógenos no esteroidales inhiben la unión de la DHT y de la T al RA, y son tratamientos temporales efectivos contra el cáncer de próstata. Sin embargo, después de un período de tratamiento, el cáncer se vuelve resistente a los antiandrógenos y su progresión es llamada andrógeno independiente. Por lo que encontrar nuevos antagonistas esteroidales con alta afinidad al RA, que impartan estabilidad metabólica *in vivo* así como actividad farmacológica, pero con algunos sitios metabólicos susceptibles inactivos por

modificaciones estructurales específicas, serían de gran utilidad contra el tratamiento de este padecimiento¹³; considerando también el hecho de que generen menos efectos secundarios a los antes ya mencionados.

IV PROPUESTA

Por lo expuesto anteriormente proponemos generar nuevas entidades químicas de naturaleza esteroidea derivadas de la deshidroepiandrosterona, ya que es el andrógeno circulante en sangre más abundante en humanos^{13,45}, y por lo tanto, fácilmente metabolizable, accesible comercialmente, además de ser un metabolito intermediario en la vía de biosíntesis de hormonas sexuales, entre ellas la testosterona (T) y otros C-19 esteroides¹³. Además de que algunos derivados de la DEHA han presentado potencial antiandrógeno en estudios sobre líneas celulares de cáncer y debido a sus efectos benéficos en varias condiciones patológicas^{5,9,10-13} (Figura 8).

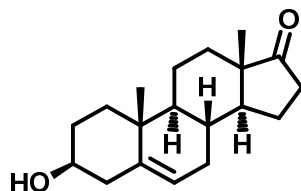


Figura 8
Deshidroepiandrosterona (DHEA)

Se generarán dos series de compuestos derivados de la DHEA, conteniendo diversos grupos éster en la posición 3 β - derivados del ácido benzoico, para favorecer la llegada del esteroide a la molécula diana, al facilitar su permeabilidad a través de la membrana celular y con ello hacerlo más biodisponible; introduciendo la serie homóloga de los halógenos en la

posición *-para* del ácido, para determinar si es posible observar una relación estructura-actividad, teniendo como referencia al ácido benzoico (ausencia de sustituyentes) y un grupo electrodonador, en este caso el ácido *p*-toluico.

Por otro lado, en una primer serie de compuestos, se introducirá en C-17 un anillo de benzimidazol, el cual como se sabe, pertenece a las llamadas “estructuras privilegiadas” dentro de la química médica, pues posee una gran importancia y recurrencia en su uso debido a su amplia gama de actividades biológicas y también por ser una entidad con una amplia variedad de usos en fármacos⁴⁶.

Además, se ha observado que sustituyentes en C-17 y C-3 con elevadas densidades electrónicas aumentan la actividad inhibitoria del esteroide⁴⁷, mientras que el sustituyente en C-17 podría inhibir efectivamente a la enzima vía la unión a una hendidura de carácter altamente lipofílico dentro de ésta³³.

Por otro lado, pensando en un posible efecto antagonista hacia el receptor androgénico (RA), se generará otra serie de compuestos en la que se mantendrán en C-3 los ésteres derivados del ácido benzoico y se sustituirá el grupo -OH en C-17, presente tanto en la DHT como en la T, por un grupo -OMe, el cual al ser un grupo isótero del hidroxilo estaría mimetizándolo y de esta forma, al no ser el sustituyente natural en estos esteroides, podría inhibir al RA; ya que se han observado en dicho receptor dos interacciones determinantes para la unión de los ligantes, la primera por puentes de hidrógeno a través de los extremos de éste, y la segunda por interacciones hidrofóbicas de Van der Waals por la parte interna de la molécula, lo cual muestra una clara complementación en la unión por parte del núcleo hidrofóbico del esteroide, y pocos residuos polares por parte del ligante, que aseguran el anclaje y la selectividad del mismo⁴⁸; sin descartar la posibilidad de que también esta serie pudiera inhibir la actividad de 5AR y a su vez, que la primer serie de compuestos pudieran tener un efecto antagonista hacia el RA, lo cual únicamente es posible determinar una vez que se realicen las pruebas biológicas (Figura 9).

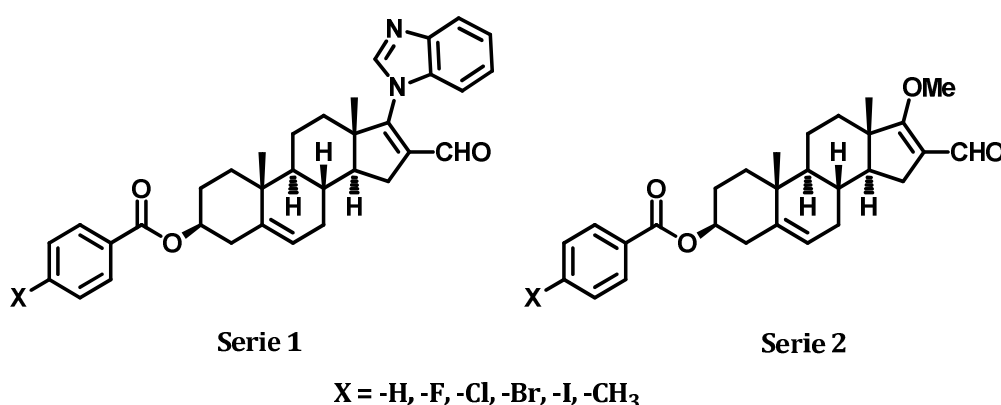


Figura 9
Series de compuestos a sintetizar

V HIPÓTESIS

Debido a la importante actividad biológica que juegan los antiandrógenos esteroidales para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata, se espera que las entidades químicas sintetizadas en este trabajo tengan una actividad inhibitoria hacia cualquiera de las actividades de la enzima 5α -reductasa y/o presenten algún efecto antagónico hacia el receptor androgénico sin generar, al ser derivados de la deshidroepiandrosterona, efectos colaterales tan severos como los que se presentan con los fármacos usados en la actualidad.

VI OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Generar nuevos conocimientos acerca de los posibles tratamientos para la hiperplasia prostática benigna así como para el cáncer de próstata a partir de sintetizar nuevas especies químicas derivadas de la deshidroepiandrosterona (DHEA) con un sustituyente en C-17 y un éster derivado del ácido benzoico en C-3 del esqueleto de la DEHA, con el fin de ser utilizadas para el tratamiento de cualquiera de estas dos enfermedades, ya sea mediante la inhibición de la enzima 5 α -reductasa y/o como antagonistas del receptor androgénico.

6.2 Objetivos Particulares

- 1) Sintetizar nuevos compuestos derivados de la deshidroepiandrosterona conteniendo un grupo benzimidazol en C-17.
 - 2) Sintetizar nuevos compuestos C-17 derivados de la deshidroepiandrosterona metoxilados en C-17.
 - 3) Purificar e identificar por métodos espectroscópicos y espectrométricos las estructuras propuestas.
 - 4) Determinar y analizar la actividad biológica (*in vivo* e *in vitro*) de los esteroides con respecto al estándar comercial finasterida (Proscar®), uno de los fármacos de uso actual.
-

VII RUTAS SINTÉTICAS

Las rutas sintéticas propuestas para llegar a los productos planteados se presentan a continuación:

Ruta sintética 1:

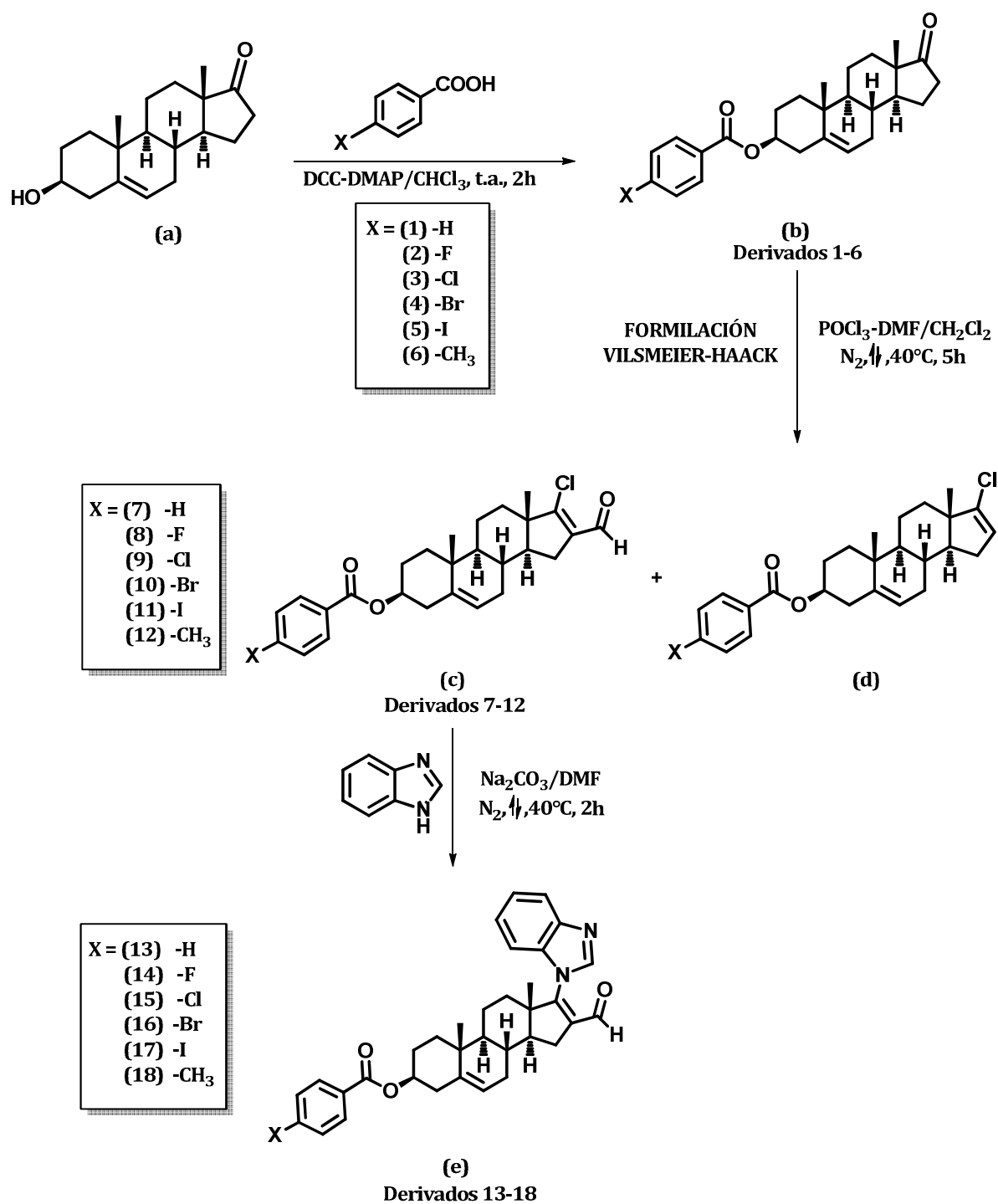


Figura 10

Ruta sintética 1

DCC = dicitohexilcarbodiimida; DMAP = dimetilaminopiridina; DMF = dimetilformamida

Ruta sintética 2:

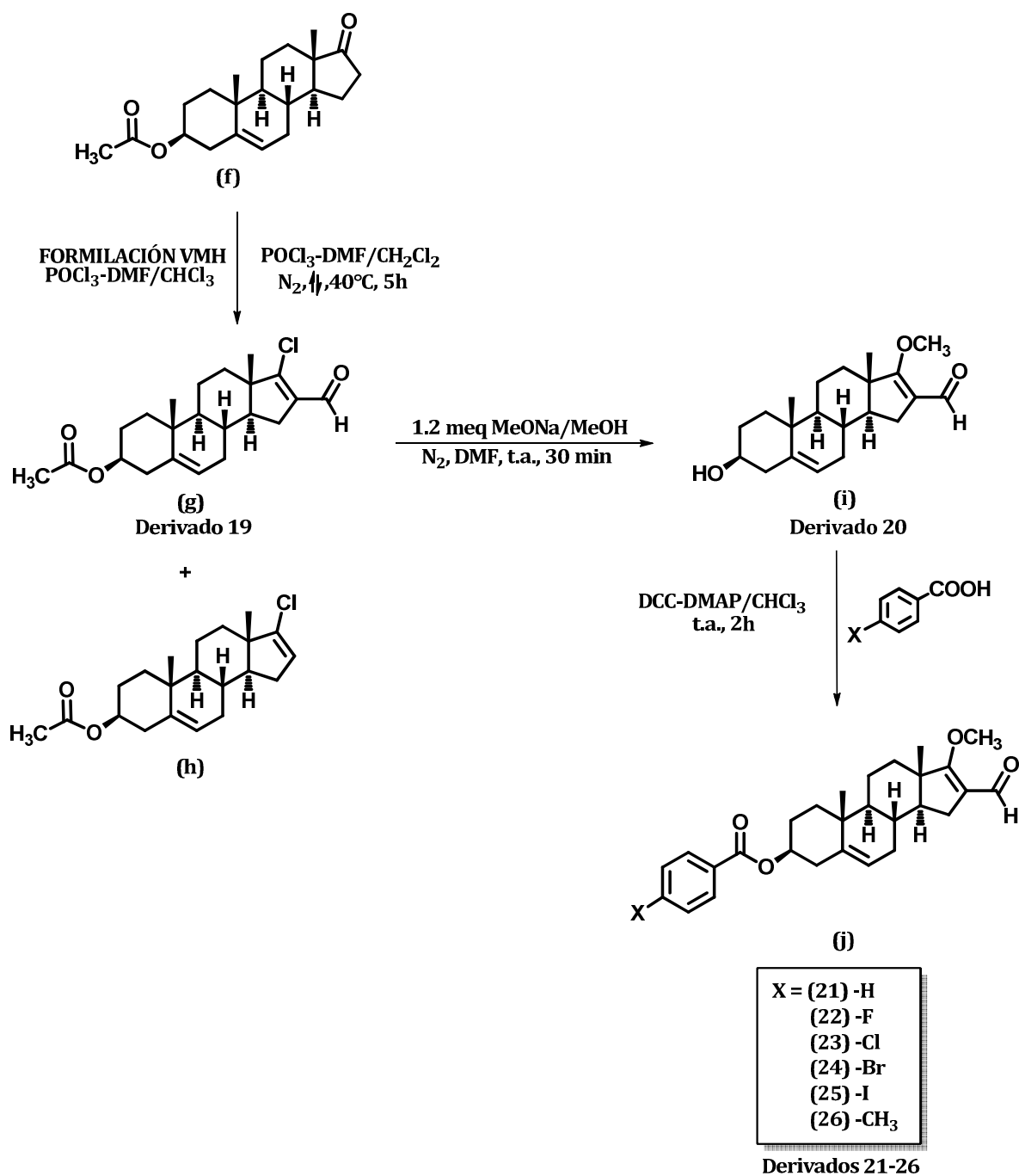


Figura 11

Ruta sintética 2

VMH = Vilsmeier-Haack; DMF = dimetilformamida; DCC = dicitlohexilcarbodiimida; DMAP = dimetilaminopiridina

VIII

DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental se dividió en dos partes. En la primera se describe la parte química, donde se llevaron a cabo las rutas de síntesis propuestas, así como la caracterización física (punto de fusión) y espectroscópica tanto de los intermediarios como de los compuestos finales.

En la segunda parte se describe la parte biológica, en donde se llevaron a cabo los ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* de los nuevos compuestos, para evaluar su capacidad inhibitoria hacia la actividad de 5 α -reductasa, así como su capacidad de unión hacia el receptor androgénico.

8.1 PARTE QUÍMICA

8.1.1. Materia prima y equipo

A continuación se describen los equipos y materiales empleados para la purificación y el análisis físico, espectroscópico y espectrométrico de los nuevos derivados de la DHEA.

La materia prima utilizada se obtuvo comercialmente en grado reactivo de Aldrich®.

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

Para la evaporación de los disolventes se empleó un rotaevaporador marca Büchi modelo R-205.

La pureza de los compuestos y el avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina (ccf), utilizando cromatoplasmas de gel de sílice (60GF254, Merck®) en diferentes sistemas de elución de hexano-acetato de etilo adecuados para cada compuesto. Para visualizar las placas se empleó una solución de CoCl_2 al 2% en H_2SO_4 2N y una lámpara de luz UV marca Spectroline modelo CM-10 ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

Para la purificación de los compuestos se empleó cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice 60 (Merck®) o Florisil® (Aldrich) y una mezcla de elución adecuada para cada compuesto.

Los equipos utilizados para la caracterización de los intermediarios y de los compuestos finales fueron los siguientes:

Para la espectrofotometría de absorción en el infrarrojo (IR) se utilizó un espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer modelo 1605 utilizando la técnica de pastilla de bromuro de potasio.

La intensidad de las señales en el IR se describe de la siguiente manera:

Símbolo	Intensidad de la señal
D	Débil
M	Media
F	Fuerte

Tabla 2 | Simbología utilizada para las señales de IR.

Para la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN^{-1}H) y de carbono (RMN^{-13}C) se utilizaron los equipos Inova Varian de 400 MHz y de 300 MHz respectivamente, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) están reportados en partes por millón (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) para RMN^{-1}H y CDCl_3 para RMN^{-13}C ; las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz (Hz).

La multiplicidad de las señales y las constantes de acoplamiento se representaron de la siguiente manera (Tabla 3):

Símbolo	Tipo de señal
s	Singlete
d	Doblete
dd	Doble de dobles
m	Multiplete
sa	Singlete ancho
J_o	Constante de acoplamiento <i>orto</i> -
J_m	Constante de acoplamiento <i>meta</i> -
J_{H-F}	Constante de acoplamiento hidrógeno-flúor

Tabla 3 | Simbología utilizada para las señales de RMN-¹H.

Por último, para la espectrometría de masas (EM) se empleó un espectrómetro de masas Thermo-FS (Double Focus Sector) con un analizador másico de doble sector (magnético y eléctrico, geometría inversa), mediante la técnica de Bombardeo de Átomos Rápidos (FAB) utilizando una matriz de alcohol *m*-nitrobenzílico y átomos de cesio a una temperatura menor de 50°C mediante la detección de iones positivos. El ión molecular se indica como M⁺.

8.1.2. Ruta sintética 1

8.1.2.1 Reacción de esterificación de la deshidroepiandrosterona (3β-hidroxiandrost-5-en-17-ona)

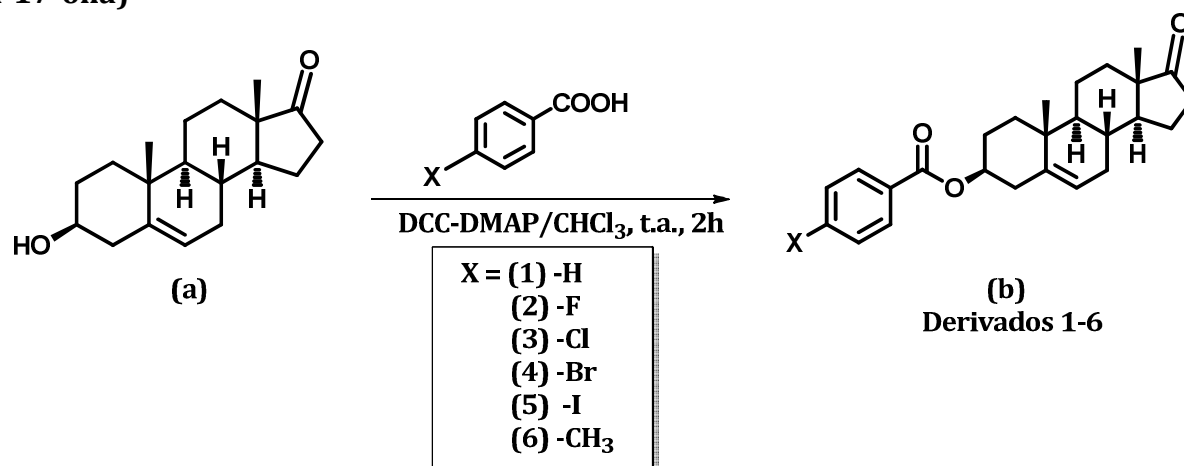


Figura 12
Reacción de esterificación de la DHEA

Metodología:

En un matraz bola de 50 mL provisto con un agitador magnético, se colocó 1 g (3.5 mmol) de DHEA (a) (3β-hidroxiandrost-5-en-17-ona) y se disolvieron en 5 mL de CHCl₃. Por otro lado, 848 mg (7.0 mmol) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) se disolvieron en 5 mL de CHCl₃ así como 2.147 g (10.5 mmol) de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), y también 14 mmol del derivado de ácido benzoico correspondiente. Una vez disuelto cada reactivo por separado se adicionaron al matraz de reacción y se agregaron 15 mL más de cloroformo. Al matraz se le colocó un tapón y se agitó por 2-2.5 h a temperatura ambiente. Conforme fue transcurriendo la reacción se observó la formación de un sólido color blanco.

Una vez terminada la reacción, se adicionaron 30 mL de hexano y se filtró por medio de una filtración rápida. Se lavó con hexano y a las aguas de filtrado se le adicionaron 30 mL de CHCl_3 . Se virtió la mezcla a un embudo de separación y se realizaron seis lavados con 60 mL de solución de HCl al 10 % cada una (H_2O : HCl 7:3), posteriormente se realizó un lavado con una solución saturada de NaHCO_3 y por último otro lavado con 60 mL de agua. Se secó con Na_2SO_4 anhidro y se eliminó el disolvente con un rotaevaporador. Finalmente se recrystalizó el sólido obtenido de acetato de etilo, recuperándose un sólido color blanco.

8.1.2.2. Datos físicos y espectroscópicos de los ésteres derivados de la DHEA (Benzoatos de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo)

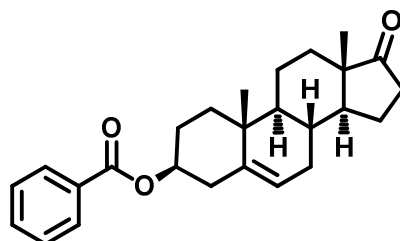


Figura 13
Benzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_3$
Peso molecular (uma)	392
Aspecto físico	Cristales blancos
Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	261-62 $^{\circ}$
Rendimiento	82 %

Tabla 4| Propiedades físicas del benzoato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo^{49,50,51}.

IR (cm^{-1}); Espectro 1.1			
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)		
2,960 (M)	ν_{as} , 18- CH_3 , 19- CH_3		
2,948 (M)	Ciclopentilo		
2,920 (M)	Ciclohexilo		
1,465 (D)	δ_{as} , 18- CH_3 , 19- CH_3 ; δ , - CH_2 -		
1,454 (D)	Ciclopentilo		
1,371 (D)	δ_{s} , 18- CH_3 , 19- CH_3		
3,081 (D); 3,031 (D)	ν_{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático		
1,662 (D)	Ciclohexenilo		
810 (D); 797 (D)	$\text{R}_2\text{R}_1\text{C}=\text{CR}_3\text{H}$ cíclica		
714 (D); 688 (M)	Monosustitución aromática		
1,735 (M)	ν , - $\text{C}=\text{O}$, cetona, C-17		
1,711 (F)	ν , - $\text{C}=\text{O}$, éster, C-3 β		
1,253 (M); 1,272 (M)	$\nu_{\text{s,as}}$, R-CO-O-; $\nu_{\text{s,as}}$, -C-O-R		
RMN- ^1H (ppm); Espectro 1.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
Ha (2H)	8.04	d	$J_o = 8.0$
Hc (1H)	7.55	t	$J_o = 8.0$
Hb (2H)	7.43	t	$J_o = 8.0$
H6 (1H)	5.46	d	$J = 4.0$
H3 (1H)	4.85	m	

RMN- ¹ H (ppm)			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H18 (3H)	1.10	s	
H19 (3H)	0.90	s	
RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 1.3			
Carbono	δ (ppm)		
C17, C=O	221.03		
C=O, éster	165.97		
C5	139.93		
C1'	132.75		
C4'	130.74		
C2', C6'	129.52		
C3', C5'	128.26		
C6	121.99		
C3	74.31		
C19	19.40		
C18	13.55		
EM-FAB (m/z); Espectro 1.4			
M ⁺ +1	393		

Tabla 5 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del benzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo^{49,50,51}.

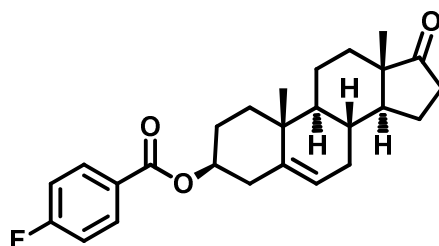


Figura 14
p-fluorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₆ H ₃₁ FO ₃
Peso molecular (uma)	410
Aspecto físico	Cristales blancos
Punto de fusión (°C)	211-12 °
Rendimiento	59 %

Tabla 6 | Propiedades físicas del *p*-fluorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo.

IR (cm ⁻¹), Espectro 2.1	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,851 (M)	ν _s , -CH ₂ -
1,466 (D)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; δ, -CH ₂ -
2,948 (F); 1452 (D)	Ciclopentilo
1,372 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
1,229 (M)	ν, C-F
3,111 (D); 3,069 (D); 3,050 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
847 (D); 801 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
771 (M); 689 (D)	Disustitución aromática

IR (cm ⁻¹)	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
1,741 (F)	ν, -C=O, cetona, C-17
1,709 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,270 (F); 1,246 (F)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 2.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
Ha (2H)	8.05	dd	J _o = 7.2; J _{H-F} = 5.6
Hb (2H)	7.10	t	J _o = 8.8; J _{H-F} = 8.8
H6 (1H)	5.46	d	J = 4.0
H3 (1H)	4.85	m	
H18 (3H)	1.09	s	
H19 (3H)	0.90	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 2.3	
Carbono	δ (ppm)
C17, C=O	221.13
C=O, éster	167.08
C4'-F	165.16
C5	139.99
C2', C6'	132.25, 132.15
C1'	127.14
C6	122.28
C3', C5'	115.65, 115.43
C3	74.66
C19	19.55
C18	13.71

EM-FAB (m/z); Espectro 2.4	
M ⁺ +1	411

Tabla 7 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-fluorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo.

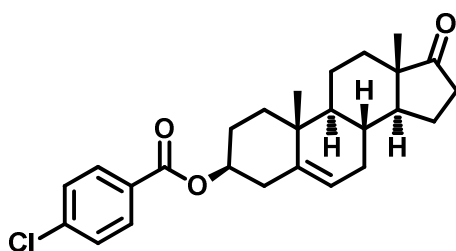


Figura 15
p-Clorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₆ H ₃₁ ClO ₃
Peso molecular (uma)	426
Aspecto físico	Cristales blancos
Punto de fusión (°C)	234-35 °
Rendimiento	82 %

Tabla 8 | Propiedades físicas del *p*-clorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo⁴⁹.

IR (cm ⁻¹); Espectro 3.1	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,947 (M)	Ciclopentilo
2,844 (M)	ν _s , -CH ₂ -
1,467 (D)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; δ, -CH ₂ -
1,370 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
1,014 (M)	C-Cl; ν, Ar-Cl
810 (M)	ν, C-Cl
810 (D); 798 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
761 (M); 683 (D)	Disustitución aromática
1,739 (F)	ν, -C=O, cetona, C-17
1,719 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,270 (F); 1118 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 3.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
Ha (2H)	7.98	d	J _o = 8.0
Hb (2H)	7.41	d	J _o = 8.8
H6 (1H)	5.46	d	J = 4.0
H3 (1H)	4.85	m	
H18 (3H)	1.10	s	
H19 (3H)	0.90	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 3.3	
Carbono	δ (ppm)
C17, C=O	221.08
C=O, éster	165.09
C5	139.74
C4'-Cl	139.17
C2', C6'	130.92
C1'	129.13
C3', C5'	128.60
C6	122.12
C3	74.61
C19	19.39
C18	13.54

EM-FAB (m/z); Espectro 3.4	
M ⁺ +1	427

Tabla 9| Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-clorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo⁴⁹.

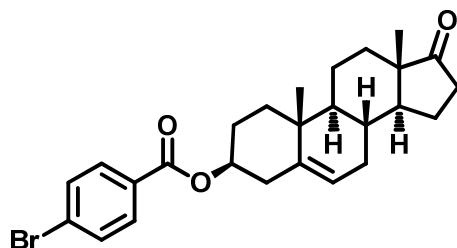


Figura 16
p-bromobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₆ H ₃₁ BrO ₃
Peso molecular (uma)	470
Aspecto físico	Cristales blancos
Punto de fusión (°C)	227-28 °
Rendimiento	74 %

Tabla 10| Propiedades físicas del *p*-bromobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo.

IR (cm⁻¹); Espectro 4.1

No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,946 (M)	Ciclopentilo
2,852 (M)	ν _s , -CH ₂ -
1,454 (D)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; Ciclopentilo
1,647 (D)	Ciclohexenilo
1,067 (M)	C-Br; ν, Ar-Br
757 (M); 681 (M)	Disustitución aromática
1,738 (F)	ν, -C=O, cetona, C-17
1,719 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,270 (F); 1,117 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R

RMN-¹H (ppm); Espectro 4.2

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
Ha (2H)	7.90	d	J _o = 8.8
Hb (2H)	7.57	d	J _o = 8.4
H6 (1H)	5.45	d	J = 5.2
H3 (1H)	4.85	m	
H18 (3H)	1.09	s	
H19 (3H)	0.89	s	

RMN-¹³C (ppm); Espectro 4.3

Carbono	δ (ppm)
C17, C=O	221.25
C=O, éster	165.39
C5	139.80
C2', C6'	131.99
C3', C5'	131.23
C1'	129.40
C4'-Br	127.58
C6	122.36
C3	74.80
C19	19.55
C18	13.64

EM-FAB (<i>m/z</i>); Espectro 4.4	
M ⁺ +1	471
M ⁺ +3	473

Tabla 11 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-bromobenzoato de 17- oxoandrost-5-en-3β-ilo.

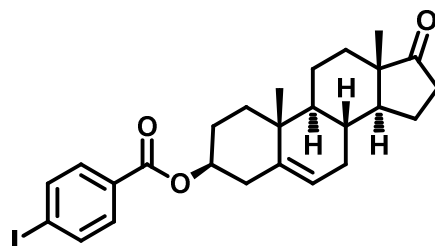


Figura 17
p-yodobenzoato de 17- oxoandrost-5-en-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₆ H ₃₁ IO ₃
Peso molecular (uma)	518
Aspecto físico	Cristales blancos
Punto de fusión (°C)	240-42 °
Rendimiento	79 %

Tabla 12 | Propiedades físicas del *p*-yodobenzoato de 17- oxoandrost-5-en-3β-ilo.

IR (cm ⁻¹); Espectro 5.1	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,839 (M)	ν _s , -CH ₂ -
1,453 (M)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; Ciclopentilo
1,371 (M)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,035 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
844 (M); 828 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
755 (M); 685 (D)	Disustitución aromática
532 (D); 475 (D); 459 (D)	C-I; Anillo aromático
1,731 (F)	ν, -C=O, cetona, C-17
1,713 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,269 (F); 1,116 (F)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 5.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
Ha (2H)	7.79	d	J _o = 8.4
Hb (2H)	7.73	d	J _o = 8.8
H6 (1H)	5.45	d	J = 4.0
H3 (1H)	4.84	m	
H18 (3H)	1.09	s	
H19 (3H)	0.89	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 5.3	
Carbono	δ (ppm)
C17, C=O	221.25
C=O, éster	165.61
C5	139.98
C2', C6'	137.75
C3', C5'	131.15

RMN- ¹³ C (ppm)	
Carbono	δ (ppm)
C1'	130.31
C6	122.28
C4'-I	100.68
C3	74.79
C19	19.55
C18	13.70

EM-FAB (m/z); Espectro 5.4	
M ⁺ +1	519

Tabla 13 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-yodobenzoato de 17- oxoandrost-5-en-3β-ilo.

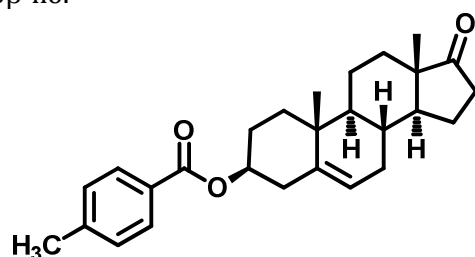


Figura 18
p-Metilbenzoato de 17- oxoandrost-5-en-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₃₄ O ₃
Peso molecular (uma)	406
Aspecto físico	Cristales blancos
Punto de fusión (°C)	214-16 °
Rendimiento	80 %

Tabla 14 | Propiedades físicas del *p*-metilbenzoato de 17- oxoandrost-5-en-3β-ilo⁴⁹.

IR (cm ⁻¹); Espectro 6.1	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,947 (M)	Ciclopentilo
2,851 (M)	Ciclohexilo
2,924 (F)	ν _{as} , -CH ₂ -
1,453 (D)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; H ₃ C-Ar; Ciclopentilo
1,438 (D)	Ciclohexilo
1,379 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,028 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
1,665 (D)	Ciclohexilo
843 (D); 808 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
1,736 (F)	ν, -C=O, cetona, C-17
1,701 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,270 (M); 1,245 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 6.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
Ha (2H)	7.92	d	J _o = 8.4
Hb (2H)	7.22	d	J _o = 8.0
H6 (1H)	5.45	d	J = 5.2
H3 (1H)	4.84	m	

RMN- ¹ H (ppm)			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H (Ar-CH ₃ , 3H)	2.40	s	
H18 (3H)	1.09	s	
H19 (3H)	0.89	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 6.3	
Carbono	δ (ppm)
C17, C=O	221.34
C=O, éster	166.19
C4'-CH ₃	143.52
C5	140.09
C3', C5'	129.68
C2', C6'	129.12
C1'	128.08
C6	122.07
C3	74.21
CH ₃	20.46
C19	19.55
C18	13.68

EM-FAB (m/z); Espectro 6.4	
M ⁺ + 1	407

Tabla 15 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-metilbenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo⁴⁹.

8.1.2.3. Reacción de formilación de Vilsmeier-Haack para los ésteres derivados de la deshidroepiandrosterona (Benzoatos de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo)

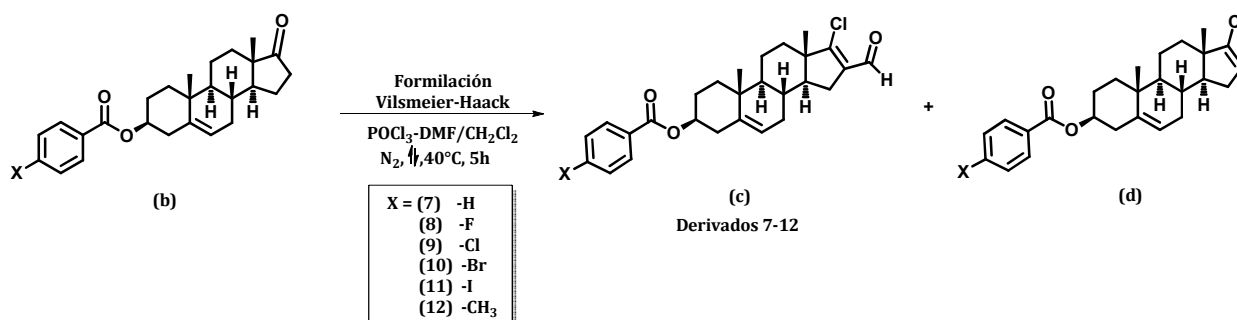


Figura 19

Reacción de formilación de Vilsmeier-Haack para los ésteres derivados de la DHEA

Metodología:

En un matraz bola de dos bocas provisto con un agitador magnético se adicionaron 4.2 mL (45.3 mmol) de oxiclورو de fósforo (POCl_3), se adaptó un refrigerante en posición de reflujo y un embudo de adición con 4.2 mL (55.0 mmol) de N,N-dimetilformamida (DMF). Se colocó el matraz sobre un baño de hielo-agua y se adicionó gota a gota la DMF. Por otro lado se disolvieron 500 mg (1.27 mmol) del 3β-benzoato de la deshidroepiandrosterona correspondiente (**b**) (benzoatos de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo) en 5 mL de CHCl_3 , y una vez disueltos se adicionaron gota a gota a la mezcla de reacción; una vez terminada la adición, se

retiró el baño de hielo-agua y se calentó a reflujo moderado por 7 h bajo atmósfera de nitrógeno.

Terminado el tiempo de reacción, se diluyó la mezcla de reacción con CHCl_3 y se adicionó a 200 mL de una solución saturada y fría de NaHCO_3 . Posteriormente se vertió en un embudo de separación y se le adicionaron 100 mL más de solución saturada de NaHCO_3 y se agitó hasta que terminó la efervescencia (desprendimiento de $\text{CO}_2(\text{g})$). Se realizaron tres extracciones con 125 mL de CHCl_3 cada una, se secaron los extractos clorofórmicos con Na_2SO_4 anhidro y finalmente se evaporó el disolvente en un rotaevaporador obteniéndose un sólido de color amarillo.

El producto crudo se purificó a través de una columna cromatográfica de sílica gel 60 con una mezcla de elución de hexano:acetato de etilo 98:2, obteniéndose un sólido blanco.

8.1.2.4. Datos físicos y espectroscópicos de los benzoatos de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo

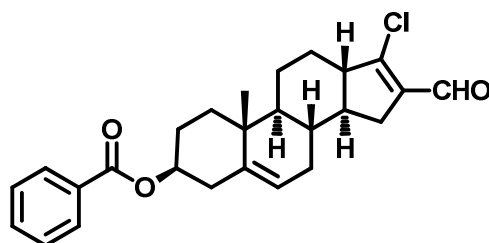


Figura 20
Benzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	$\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{ClO}_3$
Peso molecular (uma)	438.5
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	188-90 $^{\circ}$
Rendimiento	43 %

Tabla 16 | Propiedades físicas del benzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo.

IR (cm^{-1}); Espectro 7.1	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,929 (M)	ν_{as} , $-\text{CH}_2-$
2,860 (M)	ν_{s} , 18- CH_3 , 19- CH_3
1,451 (M)	δ_{as} , 18- CH_3 , 19- CH_3 ; Ciclopentilo
1,372 (D)	δ_{s} , 18- CH_3 , 19- CH_3
3,065 (D); 3,032 (D)	ν_{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
848 (D); 823 (D)	$\text{R}_2\text{R}_1\text{C}=\text{CR}_3\text{H}$ cíclica
713 (M); 684 (D)	Monosustitución aromática
789 (D)	ν , C-Cl, C-17
1,708 (F)	ν , $-\text{C}=\text{O}$, éster, C-3 β
1,272 (F); 1,253 (M)	$\nu_{\text{s,as}}$, R-CO-O-; $\nu_{\text{s,as}}$, $-\text{C}-\text{O}-\text{R}$
1,664 (F)	ν , $-\text{C}=\text{O}$, aldehído, C-16
2,833 (D)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 7.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.99	s	
Ha (2H)	8.04	d	J _o = 7.2
Hc (1H)	7.55	t	J _o = 7.2
Hb (2H)	7.43	t	J _o = 7.6
H6 (1H)	5.45	d	J = 5.2
H3 (1H)	4.86	m	
H18 (3H)	1.11	s	
H19 (3H)	1.00	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 7.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	188.28
C=O, éster	166.11
C17-Cl	162.49
C5	140.12
C16	136.56
C4'	132.93
C1'	130.83
C2', C6'	129.67
C3', C5'	128.40
C6	122.12
C3	74.38
C18	19.44
C19	15.13

EM-FAB (m/z); Espectro 7.4 y 7.4.1	
M ⁺ +1	439

Tabla 17 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del benzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo.

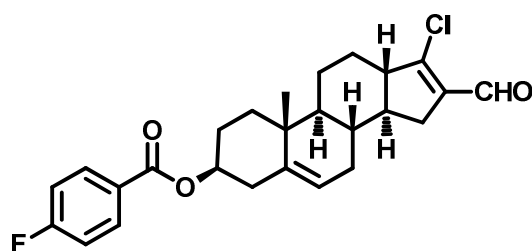


Figura 21

***p*-Fluorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo**

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₃₀ ClFO ₃
Peso molecular (uma)	456.5
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	194-96 °
Rendimiento	47 %

Tabla 18 | Propiedades físicas del *p*-fluorobenzoato de 17-cloro-16-formil-androst-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm ⁻¹); Espectro 8.1	
No. de onda (v)	Asignación (Grupo Funcional)
2,957 (M)	v _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ , Ciclopentilo
2,932 (M)	v _{as} , -CH ₂ -
2,853 (M)	v _s , -CH ₂ -
1,453 (D)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; Ciclopentilo
1,443 (D)	Ciclohexilo
1,377 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,052 (D)	v _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
847 (D); 810 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
764 (M); 688 (D)	Disustitución aromática
1,223 (M)	v, Ar-F
793 (D)	v, C-Cl, C-17
1,714 (F)	v, -C=O, éster, C-3β
1,286 (M); 1,278 (M)	v _{s,as} , R-CO-O-; v _{s,as} , -C-O-R
1,663 (F)	v, -C=O, aldehído, C-16
2,909 (M)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 8.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.99	s	
Ha (2H)	8.05	dd	J _o = 8.8; J _{H-F} = 5.6
Hb (2H)	7.09	dd	J _o = 8.6; J _{H-F} = 9.0
H6 (1H)	5.44	d	J = 4.0
H3 (1H)	4.85	m	
H18 (3H)	1.10	s	
H19 (3H)	1.00	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 8.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	188.20
C=O, éster	167.10
C4'-F	165.14
C17-Cl	162.37
C5	140.26
C16	136.80
C2', C6'	132.26, 132.17
C1'	127.01
C6	122.26
C3', C5'	115.67, 115.45
C3	74.60
C18	19.44
C19	14.86

EM-FAB (m/z); Espectro 8.4 y 8.4.1	
M ⁺ +1	457

Tabla 19 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-fluorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo.

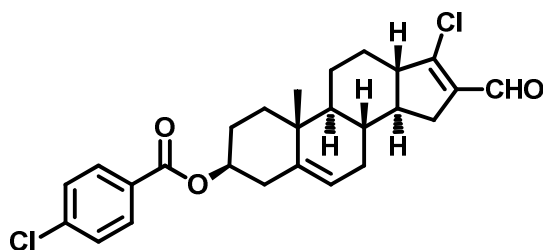


Figura 22
p-Clorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₃₀ Cl ₂ O ₃
Peso molecular (uma)	472
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	196-98 °
Rendimiento	45 %

Tabla 20| Propiedades físicas del *p*-clorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm⁻¹); Espectro 9.1

No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,960 (D)	ν _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
2,929 (M)	ν _{as} , -CH ₂ -
2,852 (M)	ν _s , -CH ₂ -; Ciclohexilo
1,463 (D)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; δ, -CH ₂ -
1,452 (D)	Ciclopentilo
1,442 (D)	Ciclohexilo
1,376 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,038 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
853 (D); 845 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
757 (M); 686 (M)	Disustitución aromática
811 (D)	ν, C-Cl, C-17
1,091 (M)	ν, Ar-Cl; C-Cl, C-17
1,718 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,287 (M); 1,276 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R
1,664 (F)	ν, -C=O, aldehído, C-16
2,850 (D); 2,735 (D)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN-¹H (ppm); Espectro 9.2

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.99	s	
Ha (2H)	7.96	d	J _o = 8.4
Hb (2H)	7.40	d	J _o = 8.4
H6 (1H)	5.44	d	J = 4.8
H3 (1H)	4.84	m	
H18 (3H)	1.11	s	
H19 (3H)	1.00	s	

RMN-¹³C (ppm); Espectro 9.3

Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	188.24
C=O, éster	165.23
C17-Cl	162.42

Carbono	RMN- ¹³ C (ppm) δ (ppm)
C5	139.98
C16	139.34
C4'-Cl	136.56
C2', C6'	131.08
C1'	129.27
C3', C5'	128.76
C6	122.24
C3	74.71
C18	19.42
C19	15.12

EM-FAB (*m/z*); Espectro 9.4M⁺+1 473

Tabla 21 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-clorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo.

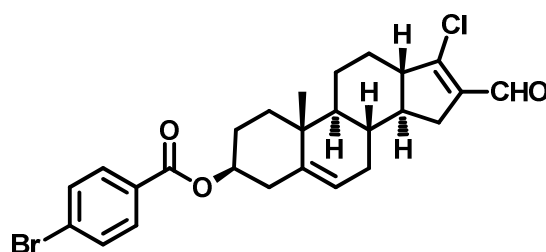


Figura 23

p-Bromobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₃₀ BrClO ₃
Peso molecular (uma)	516.5
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	174-76 °
Rendimiento	58 %

Tabla 22 | Propiedades físicas del *p*-bromobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm⁻¹); Espectro 10.1

No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,928 (M)	ν _{as} , -CH ₂ -; Ciclohexilo
2,855 (M)	ν _s , -CH ₂ -; Ciclohexilo
1,463 (D)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; δ, -CH ₂ -
1,436 (D)	Ciclohexilo
1,373 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,036 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
850 (D); 830 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
754 (M); 712 (D)	Disustitución aromática
800 (D)	ν, C-Cl, C-17
1,008 (M)	ν, Ar-Br
1,711 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,269 (F); 1,113 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R
1,668 (F)	ν, -C=O, aldehído, C-16
2,888 (M); 2,885 (M)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 10.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.99	s	
Ha (2H)	7.89	d	J _o = 8.8
Hb (2H)	7.56	d	J _o = 8.8
H6 (1H)	5.44	d	J = 4.0
H3 (1H)	4.84	m	
H18 (3H)	1.11	s	
H19 (3H)	1.00	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 10.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	188.24
C=O, éster	165.36
C17-Cl	162.43
C5	139.96
C16	136.55
C2', C6'	131.75
C3', C5'	131.22
C1'	129.72
C4'-Br	128.01
C6	122.24
C3	74.74
C18	19.41
C19	15.12

EM-FAB (m/z); Espectro 10.4 y 10.4.1	
M ⁺ +1	517
M ⁺ +3	519

Tabla 23 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-bromobenzoato de 17-cloro-16-formilandro-5,16-dien-3β-ilo.

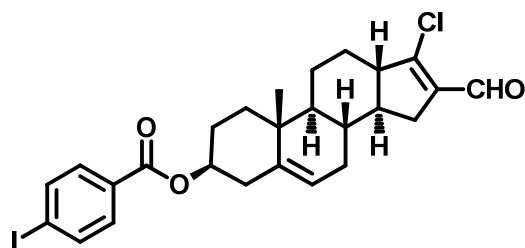


Figura 24
***p*-Yodobenzoato de 17- cloro-16-formilandro-5,16-dien-3β-ilo**

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₃₀ ClIO ₃
Peso molecular (uma)	564.5
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	205-07 °
Rendimiento	33 %

Tabla 24 | Propiedades físicas del *p*-yodobenzoato de 17-cloro-16-formilandro-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm⁻¹); Espectro 11.1

No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,939 (M)	ν _s , -CH ₂ -; Ciclohexilo
2,858 (D)	ν _s , -CH ₂ -
1,452 (D)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
1,373 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,035 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
846 (D); 819 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
755 (M); 686 (D)	Disustitución aromática
819 (D)	ν, C-Cl, C-17
587 (D); 555 (D); 462 (D)	ν, Ar-I
1,707 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,271 (F); 1,103 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R
1,664 (F)	ν, -C=O, aldehído, C-16
2,855 (D)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN-¹H (ppm); Espectro 11.2

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.99	s	
Ha (2H)	7.79	d	J _o = 8.4
Hb (2H)	7.73	d	J _o = 8.8
H6 (1H)	5.44	d	J = 5.2
H3 (1H)	4.84	m	
H18 (3H)	1.10	s	
H19 (3H)	1.00	s	

RMN-¹³C (ppm); Espectro 11.3

Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	188.20
C=O, éster	165.59
C17-Cl	162.37
C5	140.00

RMN- ¹³ C (ppm)	
Carbono	δ (ppm)
C2', C6'	137.77
C16	136.58
C3', C5'	131.15
C1'	130.34
C6	122.24
C4'-I	100.66
C3	74.74
C18	19.42
C19	15.13

EM-FAB (m/z); Espectro 11.4 y 11.4.1	
M ⁺ +1	565
M ⁺ +3	567

Tabla 25 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-yodobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo.

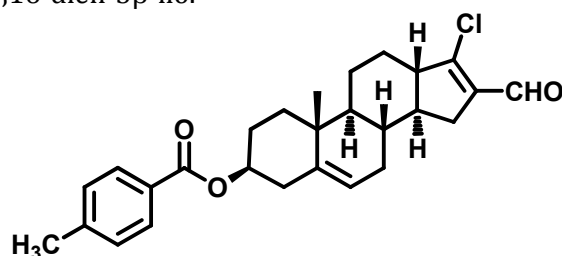


Figura 25
p-Metilbenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₃₃ ClO ₃
Peso molecular (uma)	452.5
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	214-16 °
Rendimiento	26 %

Tabla 26 | Propiedades físicas del *p*-metilbenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm ⁻¹); Espectro 12.1	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,928 (F)	ν _{as} , -CH ₂ -; Ciclohexilo
2,857 (M)	ν _s , -CH ₂ -; Ciclohexilo
1,453 (D)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; H ₃ C-Ar
1,372 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; H ₃ C-Ar
3,033 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
840 (D); 823 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
754 (M); 690 (D)	Disustitución aromática
823 (D)	ν, C-Cl, C-17
1,706 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,273 (F); 1,109 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R
1,672 (F)	ν, -C=O, aldehído, C-16
2,893 (M); 2,727 (D)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 12.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.99	s	
Ha (2H)	7.92	d	J _o = 8.0
Hb (2H)	7.23	d	J _o = 8.8
H6 (1H)	5.44	d	J = 5.2
H3 (1H)	4.84	m	
H (Ar-CH ₃ , 3H)	2.40	s	
H18 (3H)	1.11	s	
H19 (3H)	1.00	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 12.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	188.20
C=O, éster	165.17
C17-Cl	162.40
C4'-CH ₃	143.53
C5	140.22
C16	136.58
C2', C6'	129.70
C3', C5'	129.07
C1'	128.14
C6	122.03
C3	74.17
CH ₃ -Ar	20.48
C18	19.43
C19	15.13

EM-FAB (m/z); Espectro 12.4	
M ⁺ +1	453

Tabla 27 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-metilbenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo.

8.1.2.5. Reacción de sustitución para los benzoatos de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo

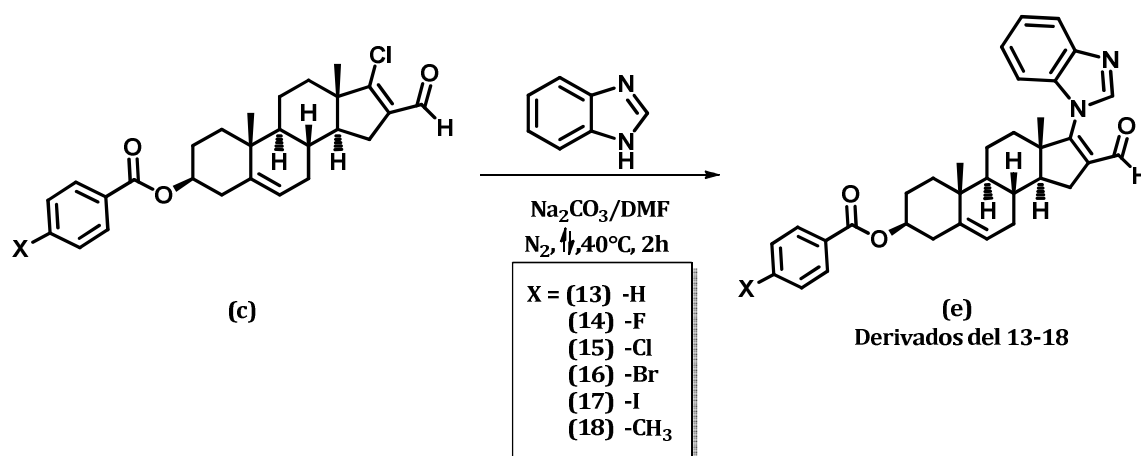


Figura 26
Reacción de sustitución para los benzoatos de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo

Metodología:

En un matraz bola de 50 mL provisto con un agitador magnético, se pesaron 250 mg (0.4-0.6 mmol) de los benzoatos de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo (**c**) en cuestión, se adicionaron 3 o 6 mmol de benzimidazol y 6 o 12 mmol de carbonato de sodio según la reacción deseada (Tabla 29 y 30), así como 5 mL de DMF como disolvente. Se colocó un refrigerante en posición de reflujo y se calentó a reflujo de 1 a 2 h bajo atmósfera de nitrógeno.

Una vez terminado el tiempo de reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se virtió la mezcla de reacción sobre 20 mL de hielo con agitación constante. Se filtró al vacío el sólido obtenido y se lavó tres veces con agua helada.

El producto crudo se purificó a través de una columna cromatográfica de Florisil® malla < 200 con una mezcla de elución hexano:acetato de etilo 96:4, obteniéndose un sólido blanco.

REACTIVO	mmol
Benzoatos de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo (X = -H, -F, -Br)	1
Benzimidazol	3
Carbonato de sodio	6
Benzoatos de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo (X = -Cl, -I, -CH ₃)	1
Benzimidazol	6
Carbonato de sodio	12

Tabla 28 | Proporción de moles a reaccionar para la reacción de introducción del anillo de benzimidazol.

VMH-3 β -Benzoatos 250 mg	mmol	Benzimidazol (mg)	Benzimidazol (mmol)	Na ₂ CO ₃ (mg)	Na ₂ CO ₃ (mmol)	Tiempo de reacción (h)
- H	0.6	212	1.8	382	3.6	1.15
- F	0.5	177	1.5	318	3.0	2
- Cl	0.5	354	3.0	636	6.0	2
- Br	0.5	177	1.5	318	3.0	2
- I	0.4	283	2.4	509	4.8	1
- CH ₃	0.5	354	3.0	636	6.0	1

Tabla 29 | Proporción de moles a reaccionar de acuerdo al sustrato utilizado.

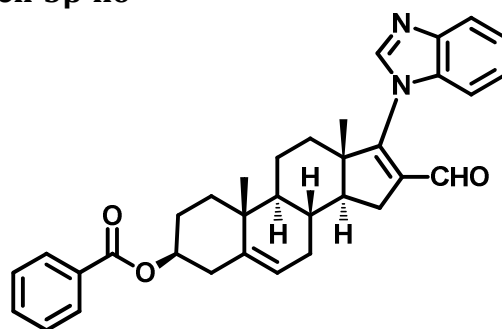
8.1.2.6. Datos físicos y espectroscópicos de los benzoatos de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo

Figura 27

Benzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₃₄ H ₃₆ N ₂ O ₃
Peso molecular (uma)	520
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	262-63 °
Rendimiento	77 %

Tabla 30 | Propiedades físicas del benzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm ⁻¹); Espectro 13.1	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,962 (M)	ν _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
2,941 (M)	Ciclopentilo
2,913 (M)	Ciclohexilo
2,865 (D)	ν _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; Ciclopentilo
1,473 (D)	δ, -CH ₂ -
1,452 (M)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; Ciclohexilo; Ciclopentilo
1,376 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,049 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
819 (D); 811 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
719 (M); 698 (D)	Monosustitución aromática
990 (D); 590 (D)	Benzimidazol, C-17
1,709 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,274 (F); 1,220 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R
1,618 (M)	-C=C-CHO
1,661 (F)	ν, -C=O, aldehído, C-16
2,865 (D)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 13.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.59	s	
Ha (2H)	8.05	dd	J _o = 8.4; J _m = 1.2
Hd (1H)	7.99	sa	
He,h (2H)	7.86	m	
Hc (1H)	7.55	t	J _o = 7.6

RMN- ¹ H (ppm)			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
Hb (2H)	7.43	t	J _o = 8.0
Hf,g (2H)	7.35	m	
H6 (1H)	5.48	d	J = 5.2
H3 (1H)	4.88	m	
H18 (3H)	1.22	s	
H19 (3H)	1.12	s	

RMN-¹³C (ppm); Espectro 13.3

Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	187.93
C=O, éster	166.11
C17	141.58
Ca	140.17
C4'	132.93
C1'	130.84
C5	140.22
C3', C5'	129.67
C2', C6'	128.43
Cc	124.81
Cd	123.57
Cb	122.04
Ce	120.78
C3	74.33
C18	20.57
C19	19.45

EM-FAB (m/z); Espectro 13.4

M⁺+1 521

Tabla 31 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del benzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo.

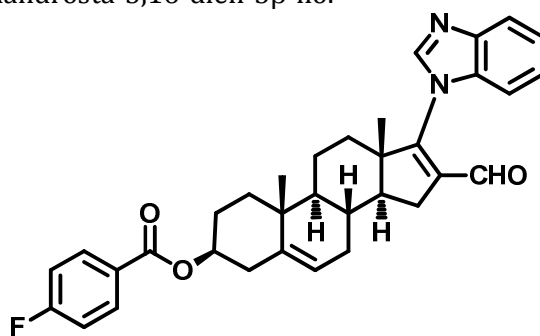


Figura 28

p-Fluorobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₃₄ H ₃₅ FN ₂ O ₃
Peso molecular (uma)	538
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	242-43 °
Rendimiento	64 %

Tabla 32 | Propiedades físicas del *p*-fluorobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm ⁻¹); Espectro 14.1	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,926 (F)	ν _{as} , -CH ₂ -; Ciclohexilo
2,854 (M)	ν _s , -CH ₂ -; Ciclohexilo; Ciclopentilo
1,454 (M)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; Ciclopentilo
1,376 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
854 (D); 768 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
744 (D); 688 (D)	Disustitución aromática
1,238 (D)	ν, Ar-F
985 (D)	Benzimidazol, C-17
1,714 (M)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,272 (M); 1,117 (D)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R
1,674 (D)	ν, -C=O, aldehído, C-16
2,854 (M)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 14.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.59	s	
Ha (2H)	8.05	dd	J _o = 9.0; J _{H-F} = 5.6
Hd (1H)	7.99	sa	
He,h (2H)	7.86	m	
Hf,g (2H)	7.35	m	
Hb (2H)	7.10	t	J _o = 8.0; J _{H-F} = 8.0
H6 (1H)	5.47	d	J = 4.8
H3 (1H)	4.86	m	
H18 (3H)	1.24	s	
H19 (3H)	1.11	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 14.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	187.94
C=O, éster	167.09
C4'-F	165.15
Ca	141.59
C17	140.08
C2', C6'	132.24, 132.15
C1'	127.05
Cc	124.81
Cd	123.57
Cb	122.12
Ce	120.79
C5	140.22
C3', C5'	115.66, 115.44
C3	74.52
C18	20.57
C19	19.44

EM-FAB (m/z); Espectro 14.4	
M ⁺ +1	539

Tabla 33 Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-fluorobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo.

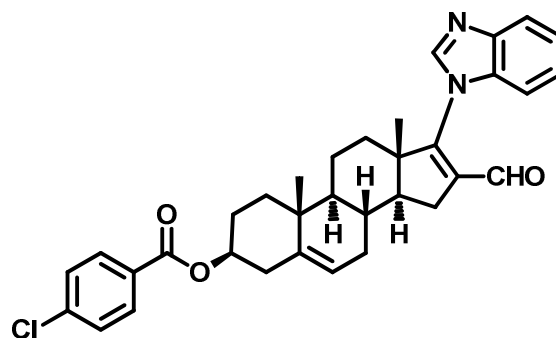


Figura 29

p-Clorobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₃₄ H ₃₅ ClN ₂ O ₃
Peso molecular (uma)	554.5
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	242-43 °
Rendimiento	64 %

Tabla 34 | Propiedades físicas del *p*-clorobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm⁻¹); Espectro 15.1

No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,941 (M)	Ciclopentilo
2,858 (M)	ν _s , -CH ₂ -; Ciclohexilo
1,472 (M)	δ, -CH ₂ -
1,372 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,057 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
815 (D); 846 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
738 (M); 685 (D)	Disustitución aromática
815 (D); 1,089 (M)	ν, Ar-Cl
591 (D); 472 (D)	Benzimidazol, C-17
1,716 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,269 (F); 1,218 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R
1,616 (D)	-C=C-CHO
1,665 (F)	ν, -C=O, aldehído, C-16
2,858 (M)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN-¹H (ppm); Espectro 15.2

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.59	s	
Hd (1H)	7.99	sa	
Ha (2H)	7.97	d	J _o = 8.8
He,h (2H)	7.85	m	
Hb (2H)	7.40	d	J _o = 8.4
Hf,g (2H)	7.35	m	
H6 (1H)	5.47	d	J = 5.2
H3 (1H)	4.86	m	
H18 (3H)	1.22	s	
H19 (3H)	1.11	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 15.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	187.92
C=O, éster	165.23
Ca	141.57
C5	140.02
C16	139.37
C2', C6'	131.07
C3', C5'	129.27
C1'	128.76
Cc	124.80
Cd	123.57
Cb	122.16
C6	120.78
C3	74.65
C18	20.56
C19	19.43

EM-FAB (m/z); Espectro 15.4	
M ⁺ +1	555
M ⁺ +3	557

Tabla 35 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-clorobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo.

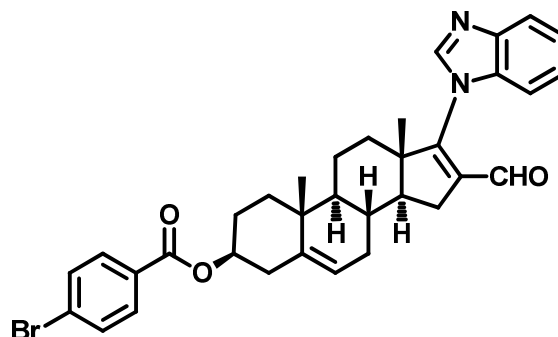


Figura 30

***p*-Bromobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo**

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₃₄ H ₃₅ BrN ₂ O ₃
Peso molecular (uma)	598
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	223-25 °
Rendimiento	67 %

Tabla 36 | Propiedades físicas del *p*-bromobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm⁻¹); Espectro 16.1			
No. de onda (v)	Asignación (Grupo Funcional)		
2,947 (M)	Ciclopentilo		
2,860 (M)	ν_s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; ν_s , -CH ₂ ; Ciclohexilo		
1,449 (M)	Ciclohexilo		
1,375 (D)	δ_s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃		
3,059 (D)	ν_{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático		
IR (cm⁻¹)			
No. de onda (v)	Asignación (Grupo Funcional)		
847 (D); 815 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica		
758 (M); 683 (D)	Disustitución aromática		
1,009 (M)	ν , Ar-Br		
590 (D); 501 (D)	Benzimidazol, C-17		
1,716 (F)	ν , -C=O, éster, C-3 β		
1,268 (F); 1,217 (M)	$\nu_{s,as}$, R-CO-O-; $\nu_{s,as}$, -C-O-R		
1,617 (D)	-C=C-CHO		
1,664 (F)	ν , -C=O, aldehído, C-16		
2,860 (M)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi		
RMN-¹H (ppm); Espectro 16.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.59	s	
Hd (1H)	7.99	sa	
Ha (2H)	7.89	d	J _o = 8.4
He,h (2H)	7.86	m	
Hb (2H)	7.57	d	J _o = 8.8
Hf,g (2H)	7.35	m	
H6 (1H)	5.48	d	J = 4.4
H3 (1H)	4.86	m	
H18 (3H)	1.22	s	
H19 (3H)	1.11	s	
RMN-¹³C (ppm); Espectro 16.3			
Carbono	δ (ppm)		
CH=O, formilo	187.91		
C=O, éster	165.59		
Ca	141.57		
C5	140.01		
C2', C6'	131.76		
C3', C5'	131.22		
C16	129.73		
C1'	128.02		
Cc	124.77		
Cd	123.56		
Cb	122.17		
C6	120.79		
C3	74.68		
C18	20.56		
C19	19.43		
EM-FAB (m/z); Espectro 16.4			
M+1	599		

Tabla 37 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-bromobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo.

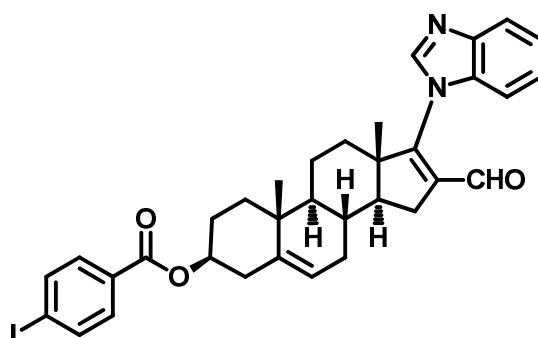


Figura 31

p-Yodobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il-16-formilandrosta-5,16-dien-3-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₃₄ H ₃₅ IN ₂ O ₃
Peso molecular (uma)	646
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	228-30 °
Rendimiento	60 %

Tabla 38 | Propiedades físicas del *p*-yodobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il-16-formilandrosta-5,16-dien-3-ilo.

IR (cm⁻¹); Espectro 17.1

No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,947 (M)	Ciclopentilo
1,453 (M)	δ _{as} , -CH ₂ -; Ciclopentilo
1,371 (M)	δ _s , -CH ₂ -
3,035 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
844 (M), 795 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
755 (M); 685 (D)	Disustitución aromática
532 (D); 475 (D); 459 (D)	ν, Ar-I
985 (M); 600 (D)	Benzimidazol, C-17
1,731 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,269 (F); 1,116 (F)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R
1,713 (F)	ν, -C=O, aldehído, C-16
2,839 (M)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN-¹H (ppm); Espectro 17.2

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.59	s	
Hd (1H)	7.99	sa	
He,h (2H)	7.86	m	
Ha,b (4H)	7.76	d	J _o = 8.6
Hf,g (2H)	7.35	m	
H6 (1H)	5.48	d	J = 4.0
H3 (1H)	4.86	m	
H18 (3H)	1.22	s	
H19 (3H)	1.11	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 17.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	187.91
C=O, éster	165.59
Ca	141.57
C5	140.01
C2', C6'	137.78
C3', C5'	131.15
C16	130.30
Cc	124.82
Cd	123.57
Cb	122.16
C6	120.78
C3	74.65
C18	20.56
C19	19.43

EM-FAB (m/z); Espectro 17.4	
M ⁺ +1	647

Tabla 39 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-yodobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo.

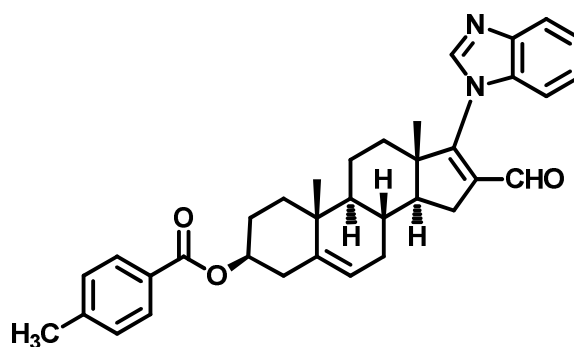


Figura 32
p-Metilbenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₃₅ H ₃₈ N ₂ O ₃
Peso molecular (uma)	534
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	217-18 °
Rendimiento	80 %

Tabla 40 | Propiedades físicas del *p*-metilbenzoato de 17-benzimidazol-1-il-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm ⁻¹); Espectro 18.1			
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)		
2,955 (M)	ν _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃		
2,853 (M)	ν _s , -CH ₂ -		
1,452 (M)	δ _{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃		
IR (cm ⁻¹)			
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)		
3,053 (D); 3,032 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático		
839 (D); 820 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica		
742 (M); 691 (D)	Monosustitución aromática		
988 (M); 588 (D)	Benzimidazol, C-17		
1,705 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β		
1,274 (F); 1,110 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R		
RMN- ¹ H (ppm); Espectro 18.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.59	s	
Hd (1H)	7.99	sa	
Ha (2H)	7.93	d	J _o = 8.4
He,h (2H)	7.85	m	
Hf,g (2H)	7.35	m	
Hb (2H)	7.23	d	J _o = 8.8
H6 (1H)	5.48	d	J = 4.4
H3 (1H)	4.86	m	
H (Ar-CH ₃ , 3H)	2.40	s	
H18 (3H)	1.26	s	
H19 (3H)	1.11	s	
RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 18.3			
Carbono	δ (ppm)		
CH=O, formilo	187.94		
C=O, éster	166.18		
C-17	143.56		
Ca	141.58		
C5	140.24		
C2', C6'	129.69		
C3', C5'	129.13		
C1'	128.10		
Cc	124.80		
Cd	123.57		
Cb	121.96		
Ce	120.76		
C3	74.10		
C18	21.78		
CH ₃ -Ar	20.56		
C19	19.45		
EM-FAB (m/z); Espectro 18.4			
M ⁺ +1	535		

Tabla 41 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-Metilbenzoato de 17-(1*H* benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo

8.1.3. Ruta sintética 2

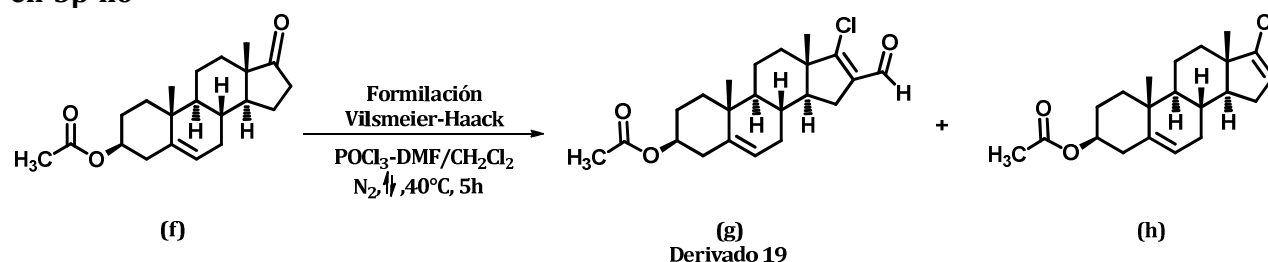
8.1.3.1. Reacción de formilación de Vilsmeier-Haack para el acetato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo

Figura 33

Reacción de formilación de Vilsmeier-Haack para el acetato de 17-oxoandrost-5-en-3 β -ilo

Metodología:

Se llevó a cabo el procedimiento experimental descrito en la página 38; únicamente que la mezcla de reacción se calentó en esta ocasión por 5h.

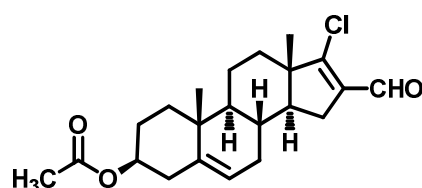
8.1.3.2 Datos físicos y espectroscópicos del acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo

Figura 34

Acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₂₉ ClO ₃
Peso molecular (uma)	376
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	135-36 °
Rendimiento	86 %

Tabla 42 | Propiedades físicas del acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo^{46,50-50i}.

IR (cm ⁻¹); Espectro 19.1	
No. de onda (v)	Asignación (Grupo Funcional)
2,923 (M)	v _{as} , -CH ₂ -; Ciclopentilo
2,841 (M)	v _s , -CH ₂ -
852 (D); 792 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
1,019 (M)	v, Ar-Cl
1,732 (F)	v, -C=O, éster, C-3 β
1,236 (F); 1,195 (D)	v _{s,as} , R-CO-O-; v _{s,as} , -C-O-R
1,674 (F)	v, -C=O, aldehído, C-16
2,825 (M); 2,738 (D)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 19.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.98	s	
H6 (1H)	5.39	d	J = 5.6
H3 (1H)	4.60	m	
H (OCO-CH ₃ , 3H)	2.03	s	
H18 (3H)	1.06	s	
H19 (3H)	0.99	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 19.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	188.05
C=O, éster	170.47
C17-Cl	162.24
C5	139.99
C16	136.42
C6	121.82
C3	73.65
C18	21.39
CH ₃ , acetoxi	19.20
C19	14.96

EM-FAB (m/z); Espectro 19.4	
M ⁺¹ + 1	377

Tabla 43 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo^{46,50-50i}.

8.1.3.3. Reacción de síntesis del 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ol

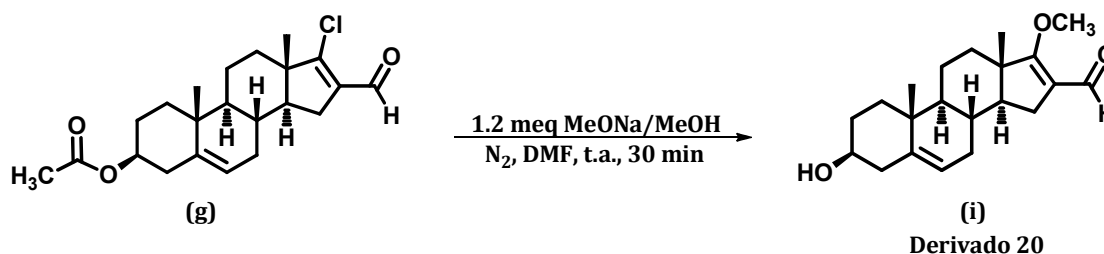


Figura 35
Síntesis del 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ol

Metodología

En un matraz bola de dos bocas de 50 mL, se pesaron 200 mg (0.53 mmol) de acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo **g** y se adicionaron 2.5 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) como disolvente. Se selló perfectamente el sistema y se colocó una atmósfera de nitrógeno; se agitó por 20 minutos y entonces se adicionaron 1.3 mL (1.2 meq) de metóxido de sodio en metanol 0.5 M y se agitó por 30 minutos más a temperatura ambiente.

Una vez terminado el tiempo de reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se virtió la mezcla de reacción sobre 20 mL de hielo. Se filtró al vacío el sólido obtenido y se lavó tres veces con agua helada⁵¹.

El producto crudo se purificó a través de una columna cromatográfica de Florisil® malla 60-100 hexano:acetato de etilo 65:25, obteniéndose un sólido blanco.

8.1.3.4. Datos físicos y espectroscópicos del 16-formil-17-metoksiandrost-5,16-dien-3 β -ol

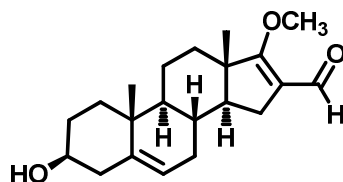


Figura 36
16-Formil-17-metoksiandrost-5,16-dien-3 β -ol

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₃₀ O ₃
Peso molecular (uma)	330
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	130-33 °
Rendimiento	41.5 %

Tabla 44| Propiedades físicas del 16-formil-17-metoksiandrost-5,16-dien-3 β -ol.

IR (cm ⁻¹); Espectro 20.1	
No. de onda (v)	Asignación (Grupo Funcional)
2,935 (F)	ν_{as} , -CH ₂ -
2,861 (M)	ν_s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; Ciclohexilo
1,451 (M)	δ_{as} , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; Ciclopentilo
1,374 (M)	δ_s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
832 (D); 819 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
3,363 (M)	ν , -OH
1,569 (F)	δ , -OH
1,044 (M)	ν , C-OH 1ario.
1,117 (M)	ν_{as} , R-O-R
1,710 (M)	ν , -C=O, aldehído, C-16; -C=C-CHO
2,861 (M)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 20.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	10.09	s	
H6 (1H)	5.37	d	J = 5.2
H (17-OCH ₃ , 3H)	4.12	s	
H (3-OH, 1H)	4.03	s	
H3 (1H)	3.53	m	
H18 (3H)	1.03	s	
H19 (3H)	1.00	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 20.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	179.30
C17-OMe	175.59

Carbono	RMN- ¹³ C (ppm) δ (ppm)
C5	141.42
C16	124.76
C6	121.40
C3	71.05
CH ₃ -O-	60.66
C18	20.92
C19	19.64
EM-FAB (m/z); Espectro 20.4	
M ⁺¹ +1	331

Tabla 45 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del 16-formil-17-metoxiandroster-5,16-dien-3β-ol.

8.1.3.5. Reacción de esterificación del 16-formil-17-metoxiandroster-5,16-dien-3β-ol con derivados del ácido benzoico

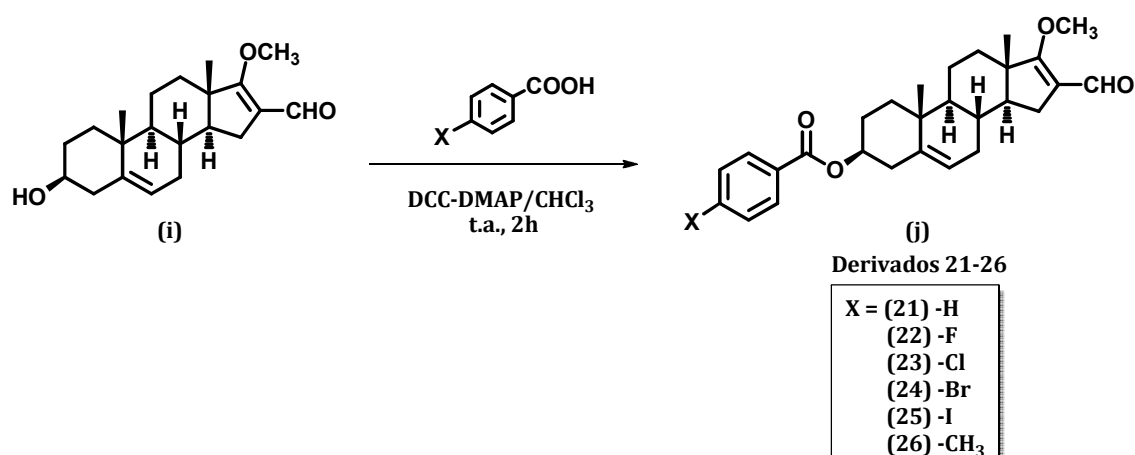


Figura 37

Reacción de esterificación del 16-formil-17-metoxiandroster-5,16-dien-3β-ol con diferentes derivados del ácido benzoico

Metodología

En un matraz bola de 50 mL provisto con un agitador magnético, se colocaron 100 mg (0.3 mmol) de 16-formil-17-metoxiandroster-5,16-dien-3β-ol **i** (3β-hidroxi-16-formil-17-metoxiandrostan-5,16-dieno) y se disolvieron en 2.5 mL de CHCl₃. Por otro lado, 147 mg (1.05 mmol) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) se disolvieron en 2.5 mL de CHCl₃ así como 279 mg (1.35 mmol) de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), y también 201 mg (1.65 mmol) del ácido benzoico correspondiente. Una vez disuelto cada reactivo por separado se adicionaron al matraz de reacción y se agregaron 5 mL más de cloroformo. Al matraz se le colocó un tapón y se agitó por 5 h a temperatura ambiente; conforme fue transcurriendo la reacción se observó la formación de un sólido color blanco.

Una vez terminada la reacción, se adicionaron 30 mL de hexano y se filtró por medio de una filtración rápida. Se lavó con hexano y a las aguas de filtrado se les adicionaron 30 mL de CHCl_3 . Se virtió la mezcla a un embudo de separación y se realizaron seis lavados con 40 mL de solución de HCl al 10 % cada una (H_2O : HCl 7:3), posteriormente se realizó un lavado con una solución saturada de NaHCO_3 y por último otro lavado con 40 mL de agua. La solución se secó con Na_2SO_4 anhidro y se eliminó el disolvente con un rotaevaporador, obteniéndose un sólido blanco.

El producto crudo se purificó a través de una columna cromatográfica de Florisil® Malla 60-100 hexano:acetato de etilo 86:14, obteniéndose nuevamente un sólido de color blanco.

8.1.3.6. Datos físicos y espectroscópicos de los benzoatos de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3 β -ilo

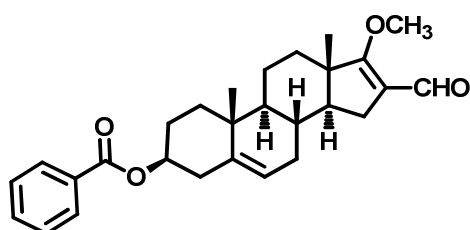


Figura 38
Benzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3 β -ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_4$
Peso molecular (uma)	434
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	159-60 $^{\circ}$
Rendimiento	58 %

Tabla 46 | Propiedades físicas del benzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3 β -ilo.

IR (cm^{-1}); Espectro 21.1

No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,928 (F)	ν_{as} , - CH_2 -
2,850 (M)	ν_{s} , - CH_2 -; Ciclohexilo
1,450 (M)	δ_{as} , 18- CH_3 , 19- CH_3 ; Ciclohexilo; Ciclopentilo
1,372 (D)	δ_{s} , 18- CH_3 , 19- CH_3
3,066 (D); 3,034 (D)	ν_{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
848 (D); 828 (D)	$\text{R}_2\text{R}_1\text{C}=\text{CR}_3\text{H}$ cíclica
712 (M); 685 (D)	Monosustitución aromática
1,110 (M)	ν_{as} , R-O-R
1,709 (F)	ν , -C=O, éster, C-3 β
1,273 (F); 1,242 (M)	$\nu_{\text{s,as}}$, R-CO-O-; $\nu_{\text{s,as}}$, -C-O-R
1,626 (M)	ν , -C=O, aldehído, C-16
2,892 (M)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ^1H (ppm); Espectro 21.2

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	10.10	s	
Ha (2H)	8.02	d	$J_o = 7.2$

RMN- ¹ H (ppm)			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
Hc (1H)	7.54	t	J _o = 7.6
Hb (2H)	7.42	t	J _o = 7.6
H6 (1H)	5.44	d	J = 4.8
H3 (1H)	4.86	m	
H (17-OCH ₃ , 3H)	4.12	s	
H18 (3H)	1.07	s	
H19 (3H)	1.01	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 21.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	186.51
C17-OMe	181.10
C=O, éster	166.10
C5	139.98
C4'	132.88
C1'	130.90
C2', C6'	129.66
C3', C5'	128.55
C16	122.44
C6	116.31
C3	74.48
CH ₃ -O-	62.46
C18	19.44
C19	15.13

EM-FAB (m/z); Espectro 21.4	
M ⁺¹ +1	435

Tabla 47 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del benzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3β-ilo.

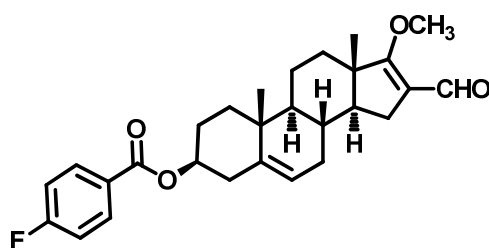


Figura 39
p-Fluorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₃₃ FO ₄
Peso molecular (uma)	452
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	159-60 °
Rendimiento	35 %

Tabla 48 | Propiedades físicas del p-fluorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm ⁻¹); Espectro 22.1	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,928 (F)	ν _{as} , -CH ₂ -
2,850 (M)	ν _s , -CH ₂ -; Ciclohexilo
1,445 (D)	Ciclohexilo
1,372 (D)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,060 (D); 3,045 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
863 (D); 831 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
768 (D); 687 (D)	Disustitución aromática
1,208 (M)	ν, Ar-F
1,112 (M)	ν _{as} , R-O-R
1,709 (M)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,273 (M); 1,241 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R
1,626 (M)	ν, -C=O, aldehído, C-16
2,892 (M)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 22.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	9.82	s	
Ha (2H)	7.86	dd	J _o = 10.6; J _{H-F} = 5.2
Hb (2H)	6.93	t	J _o = 8.6
H6 (1H)	5.26	d	J = 4.8
H3 (1H)	4.64	m	
H (17-OCH ₃ , 3H)	3.97	s	
H18 (3H)	0.93	s	
H19 (3H)	0.85	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 22.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	186.99
C17-OMe	183.69
C=O, éster	166.88
C4'-F	164.83
C5	139.59
C2', C6'	131.94, 131.85
C1'	126.61
C16	122.14
C6	115.80
C3', C5'	115.34, 115.12
C3	74.67
CH ₃ -O-	62.12
C18	18.97
C19	15.27

EM-FAB (m/z); Espectro 22.4	
M ⁺¹ +1	m/z
	453

Tabla 49 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-fluorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo.

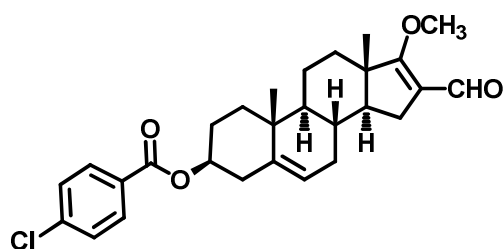


Figura 40
***p*-Clorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo**

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₃₃ ClO ₄
Peso molecular (uma)	468.5
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	83-85 °
Rendimiento	28 %

Tabla 50 | Propiedades físicas del *p*-clorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo.

IR (cm⁻¹); Espectro 23.1

No. de onda (v)	Asignación (Grupo Funcional)
2,939 (M)	ν_{as} , -CH ₂ -
2,864 (M)	ν_s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃ ; Ciclohexilo
1,445 (D)	Ciclohexilo, Ciclopentilo
1,371 (D)	δ_s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,058 (D); 3,036 (D)	ν_{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
852 (D); 831 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
761 (D); 685 (D)	Disustitución aromática
1,095 (M); 1,114 (M)	ν , Ar-Cl
1,114 (M)	ν_{as} , R-O-R
1,710 (F)	ν , -C=O, éster, C-3 β
1,274 (M); 1,210 (M)	$\nu_{s,as}$, R-CO-O-; $\nu_{s,as}$, -C-O-R
1,627 (M)	ν , -C=O, aldehído, C-16
2,891 (M)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN-¹H (ppm); Espectro 23.2

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	10.10	s	
Ha (2H)	7.96	d	J _o = 8.4
Hb (2H)	7.40	d	J _o = 8.8
H6 (1H)	5.44	d	J = 4.4
H3 (1H)	4.84	m	
H (17-OCH ₃ , 3H)	4.12	s	
H18 (3H)	1.09	s	
H19 (3H)	1.00	s	

RMN-¹³C (ppm); Espectro 23.3

Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	186.53
C17-OMe	182.13
C=O, éster	165.25
C5	139.84

RMN- ¹³ C (ppm)	
Carbono	δ (ppm)
C4'-Cl	139.31
C2', C6'	131.08
C1'	129.34
C3', C5'	128.75
C16	122.57
C6	116.31
C3	74.83
CH ₃ -O-	62.47
C18	19.42
C19	15.73

EM-FAB (*m/z*); Espectro 23.4M⁺¹ +1 469

Tabla 51 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-clorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3β-ilo.

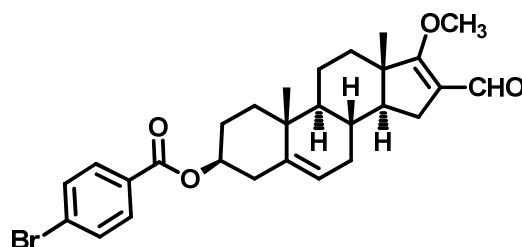


Figura 41

p-Bromobenzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₃₃ BrO ₄
Peso molecular (uma)	513
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	156-57 °
Rendimiento	36 %

Tabla 52 | Propiedades físicas del *p*-bromobenzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm⁻¹); Espectro 24.1

No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,927 (F)	ν _{as} , -CH ₂ -; Ciclohexilo
2,851 (M)	ν _s , -CH ₂ -; Ciclohexilo
1,445 (M)	Ciclohexilo, Ciclopentilo
1,371 (M)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,056 (D); 3,033 (D)	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
850 (D); 829 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
757 (M); 683 (D)	Disustitución aromática
1,011 (M)	ν, Ar-Br
1,102 (M)	ν _{as} , R-O-R
1,709 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β
1,269 (F); 1,113 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R

IR (cm ⁻¹)	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
1,626 (M)	ν, -C=O, aldehído, C-16
2,851 (M)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 24.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	10.09	s	
Ha (2H)	7.89	d	J _o = 8.8
Hb (2H)	7.56	d	J _o = 8.4
H6 (1H)	5.44	d	J = 4.8
H3 (1H)	4.84	m	
H (17-OCH ₃ , 3H)	4.12	s	
H18 (3H)	1.09	s	
H19 (3H)	1.00	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 24.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	186.54
C17-OMe	182.17
C=O, éster	165.37
C5	139.81
C2', C6'	131.74
C3', C5'	131.22
C1'	129.77
C4'-Br	127.97
C16	122.57
C6	116.28
C3	74.84
CH ₃ -O-	62.47
C18	19.41
C19	15.72

EM-FAB (m/z); Espectro 24.4	
M ⁺¹ +1	513

Tabla 53 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-bromobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrosta-5,16-dien-3β-ilo.

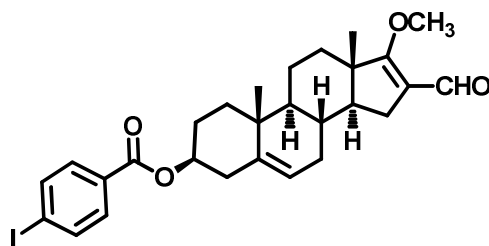


Figura 42
***p*-Yodobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo**

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₃₃ IO ₄
Peso molecular (uma)	560
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	219-20 °
Rendimiento	30 %

Tabla 54 | Propiedades físicas del *p*-yodobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo.

IR (cm⁻¹); Espectro 25.1

No. de onda (v)	Asignación (Grupo Funcional)
2,923 (F)	ν_{as} , -CH ₂ -; Ciclohexilo
2,850 (F)	ν_s , -CH ₂ -; Ciclohexilo
1,444 (M)	Ciclohexilo
1,372 (M)	δ_s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,028 (D)	ν_{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
848 (D); 828 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
754 (M); 684 (D)	Disustitución aromática
642 (D); 480 (D); 462 (D)	ν , Ar-I
1,708 (F)	ν , -C=O, éster, C-3 β
1,267 (F); 1,100 (M)	$\nu_{s,as}$, R-CO-O-; $\nu_{s,as}$, -C-O-R
1,626 (M)	ν , -C=O, aldehído, C-16
2,850 (F)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN-¹H (ppm); Espectro 25.2

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	10.09	s	
Ha (2H)	7.79	d	J _o = 8.8
Hb (2H)	7.73	d	J _o = 8.8
H6 (1H)	5.44	d	J = 4.0
H3 (1H)	4.83	m	
H (17-OCH ₃ , 3H)	4.12	s	
H18 (3H)	1.09	s	
H19 (3H)	1.00	s	

RMN-¹³C (ppm); Espectro 25.3

Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	186.52
C17-OMe	182.13
C=O, éster	165.67

Carbono	RMN- ¹³ C (ppm) δ (ppm)
C5	139.83
C2', C6'	137.76
C3', C5'	131.15
C1'	130.37
C16	122.57
C6	116.30
C4'-I	100.63
C3	74.84
CH ₃ -O-	62.47
C18	19.42
C19	15.72
EM-FAB (m/z); Espectro 25.4	
M ⁺¹ + 1	561

Tabla 55 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-yodobenzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3β-ilo.

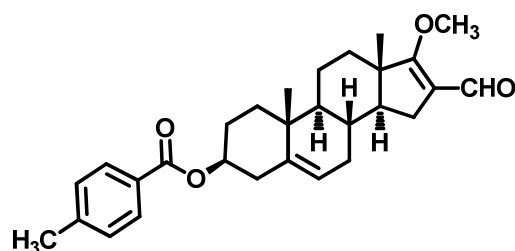


Figura 43
p-Metilbenzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3β-ilo

PROPIEDADES FÍSICAS	VALOR
Fórmula molecular	C ₂₉ H ₃₆ O ₄
Peso molecular (uma)	448
Aspecto físico	Sólido blanco
Punto de fusión (°C)	179-80 °
Rendimiento	62 %

Tabla 56 | Propiedades físicas del *p*-metilbenzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3β-ilo.

IR (cm⁻¹); Espectro 26.1	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
2,928 (F)	ν _{as} , -CH ₂ -; Ciclohexilo
2,850 (F)	ν _s , -CH ₂ -; Ciclohexilo
1,447 (M)	Ciclohexilo, Ciclopentilo
1,381 (M)	δ _s , 18-CH ₃ , 19-CH ₃
3,036 (D);	ν _{as} , Insaturaciones: Olefina, Anillo aromático
840 (D); 830 (D)	R ₂ R ₁ C=CR ₃ H cíclica
754 (M); 689 (D)	Disustitución aromática
1,088 (M)	ν _{as} , R-O-R
1,709 (F)	ν, -C=O, éster, C-3β

IR (cm ⁻¹)	
No. de onda (ν)	Asignación (Grupo Funcional)
1,275 (M); 1,110 (M)	ν _{s,as} , R-CO-O-; ν _{s,as} , -C-O-R
1,625 (F)	ν, -C=O, aldehído, C-16
2,850 (F)	C-H aldehído, Resonancia de Fermi

RMN- ¹ H (ppm); Espectro 26.2			
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H, (H-CO, 1H)	10.09	s	
Ha (2H)	7.92	d	J _o = 8.4
Hb (2H)	7.22	d	J _o = 8.0
H6 (1H)	5.44	d	J = 4.4
H3 (1H)	4.83	m	
H (17-OCH ₃ , 3H)	4.12	s	
H (Ar-CH ₃ , 3H)	2.40	s	
H18 (3H)	1.09	s	
H19 (3H)	1.00	s	

RMN- ¹³ C (ppm); Espectro 26.3	
Carbono	δ (ppm)
CH=O, formilo	186.52
C17-OMe	182.15
C=O, éster	166.19
C4'-CH ₃	143.50
C5	140.05
C2', C6'	129.69
C3', C5'	129.11
C1'	128.16
C16	124.36
C6	116.31
C3	74.26
CH ₃ -O-	62.45
CH ₃ -Ar	20.51
C18	19.43
C19	15.72

EM-FAB (m/z); Espectro 26.4	
M ⁺ +1	449

Tabla 57 | Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del *p*-metilbenzoato de 16-for mil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo.

8.2 PARTE BIOLÓGICA**8.2.1. Materiales y métodos****8.2.1.1. Material biológico**

- Hámsteres machos de la cepa dorada con peso promedio entre 200-250 g, de 2.5 meses de edad provistos por la Universidad Autónoma Metropolitana Campus Xochimilco.
- Tejido de próstata humana de cadáver conservado a -70°C , de varón de 53 años de edad, fallecido de diabetes e insuficiencia renal; proporcionado por el Departamento de Patología del Hospital General de México.

8.2.1.2. Material radioactivo y finasterida

- ❖ Se utilizó testosterona tritiada ($1,2,6,7\text{-}^3\text{H}$) con una actividad específica de 95 Ci/mmol y Mibolerona tritiada ($\text{MIB-}^3\text{H}$, $17\alpha\text{-metil-}^3\text{H}$)-MIB con una actividad específica de 70-87 Ci/mmol de Perkin Elmer®.
- ❖ La testosterona radioinerte, 5α -dihidrotestosterona y MIB de Steraloids® y el NADPH Lubrol PX fueron de Sigma®.
- ❖ Líquido de centelleo Ultima Gold, Packard®.
- ❖ La finasterida se obtuvo por extracción del fármaco Proscar® de los laboratorios Merck, Sharp & Dohme.

8.2.1.3. Equipo

- ❖ Ultracentrífuga marca Beckman modelo Optima L-70K.
- ❖ Centrífuga marca Beckman modelo Allegra 6R.
- ❖ Analizador de centelleo Packard modelo Tri-Carb 2100 TR.
- ❖ Placas cromatográficas de Sílica gel HPTLC Keisegel 60 F254 en soporte de aluminio (20 X 20 cm) de Merck®.
- ❖ Homogenizador de tejidos Ultra-Turrax IKA, T18 Básico, Wilmington, NC.
- ❖ Homogenizadores de tejidos Mill IKA A11 Básico.
- ❖ Rotor SW 60 Ti, Beckman Instruments, Palo Alto, CA.

8.2.1.4. Aislamiento y purificación de la finasterida

Las tabletas se molieron y se extrajeron con cloroformo y posteriormente el disolvente se eliminó al vacío; el producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna. El punto de fusión de la finasterida (252-254°C) fue idéntico al reportado en la literatura. El soporte que se utilizó fue Biogel de hidroxiapatita (HAP) de los laboratorios Bio-Rad®.

A menos que se indique lo contrario, los siguientes ensayos se realizaron a 4°C.

8.2.2. Actividad biológica de los nuevos esteroides

El tejido de próstata humana fue homogenizado en 2 volúmenes del buffer A (20 mM de fosfato de sodio a pH = 6.5, 0.32 M de sacarosa, 0.1 mM de ditioneitol (DTT, Sigma-Aldrich®) con ayuda de un homogenizador de tejidos. Los homogenizados se centrifugaron a 1,500 x g por 60 min^{52,53} en un rotor. Los pellets fueron separados y resuspendidos en el buffer A y se almacenaron a -70°C.

Se determinó la cantidad de proteína en las suspensiones por el método de Bradford⁵⁴, ésta fue de 5 mg de proteína/mL de próstata humana. Estas suspensiones fueron usadas como fuente de enzima 5 α -reductasa tipo 2.

8.2.3. Animales y tejidos

Los hámsteres fueron anestesiados con pentobarbital y gonadectemizados. Los animales castrados se mantuvieron a una temperatura de 22°C bajo periodos de luz-oscuridad de 12 h, la comida y el agua fueron suministradas *ad libitum*. Después de 36 días de mantener estas condiciones, los hámsteres fueron sacrificados con CO₂. Este protocolo fue aprobado por el Comité institucional de uso y cuidado de animales de la Universidad Autónoma Metropolitana. El experimento con animales gonadectomizados se llevó a cabo con 8 grupos de 4 animales por experimento.

Con el propósito de preparar microsomas como fuente de la 5AR-1, se extirparon dos hígados de rata macho adultos de 8 meses de edad. Las ratas se mantuvieron en ayunas durante toda una noche con el fin de disminuir los niveles de glucógeno antes de remover los hígados.

Los hígados de rata (15-30 g) se molieron en un volumen de buffer A. El tejido fue homogenizado y la suspensión centrifugada a 10,000 x g por 60 minutos. Se lavó el pellet microsomal y se resuspendió en cinco volúmenes de buffer A con un homogenizador y la cantidad de proteína presente se determinó con el método de Bradford⁵⁴. La suspensión fue centrifugada a 100,000 x g y el pellet, con una concentración de 10-20 mg de proteína/mL, fue

resuspendido en el buffer A. La solución microsomal fue almacenada a -80°C antes de la preparación de los esteroides solubilizados con la 5AR-1.

8.2.4. Solubilización de la enzima 5α -reductasa tipo 1 a partir de microsomas de hígado de rata

La solubilización de la enzima 5AR-1 a partir de microsomas de hígado de rata se llevó a cabo de acuerdo a Levy *et al.*⁵⁵. Los microsomas fueron suspendidos brevemente en cinco volúmenes de buffer B (100 mM de citrato de sodio, 100 mM de cloruro de potasio, 1.0 mM de DTT, 0.1% de monodeciliglicol-nonaetilenéter (Lubrol PX), 20% de glicerol y 0.1 mM de NADPH ajustado a $\text{pH} = 7.5$). La preparación se mezcló y se incubó la solución sobre hielo por 30 minutos, posteriormente fue centrifugado a $100,000 \times g$ por 60 min. Se tomaron alícuotas del líquido sobrenadante que contenían más del 80% de la actividad microsomal y se almacenaron a -80°C . Las proteínas se determinaron por el método de Bradford⁵⁴.

Con el fin de determinar la unión de los nuevos esteroides al receptor androgénico, se extirpó la próstata de ratas adultas de 8 meses de edad de 500 g de peso^{56,57}. En este estudio también se utilizaron ratas, debido a que la glándula prostática es más grande y no existe ninguna diferencia en la actividad citosólica de unión entre ratas y hámsteres.

La próstata de las ratas se tiñó, pesó y fue humedecida con buffer TEMD frío (40 mM tris-HCl, 3 mM EDTA, 20 mM de molibdato de sodio, 0.5 mM de DTT, 10% de glicerol ajustado a $\text{pH} = 8$). A menos que se especifique, todos los procedimientos se llevaron a cabo en baño de hielo. Los tejidos fueron homogenizados con un homogenizador de tejidos.

Los tejidos se homogenizaron en un volumen de buffer TEMD conteniendo inhibidores de proteasas (2mM PMSF, 10 μM de antipaina, 5 mM de leupeptina⁵⁸) en un baño de hielo. Los homogenados se centrifugaron a $140,000 \times g$ por 60 min⁵⁹ con ayuda de un rotor.

La fracción citosólica que se obtuvo del líquido sobrenadante del homogenado descrito anteriormente, se almacenó a -70°C . La cantidad de proteína presente en los sobrenadantes se determinó por el método de Bradford⁵⁴ y fue de 6 mg de proteína en 200 μL .

8.2.5. Ensayos *in vitro*

8.2.5.1. Caracterización de la enzima 5α -reductasa tipo 1

8.2.5.1.1. Determinación de la concentración de proteína dependiente de la actividad de la 5AR-1

Con el propósito de determinar la concentración de proteína óptima para obtener la máxima actividad de la 5AR-1, se utilizaron como fuente de esta enzima, diferentes cantidades

de microsomas solubilizados (30, 60 y 90 µg de proteína). Se preparó una mezcla conteniendo un volumen final de 1 mL con 1 mM de DTT en buffer de fosfato de sodio 20 mM a pH = 6.5, 2 nM de [1,2,6,7³H]T (testosterona tritizada) y 2 mM de NADPH⁴³. La reacción empezó cuando se adicionó la fracción enzimática a la mezcla y ésta fue incubada a 37°C por 60 min. La reacción se concluyó adicionando 1 mL de diclorometano. La incubación en ausencia de tejido se llevó a cabo como control. Este ensayo se hizo por duplicado.

8.2.5.1.2. Determinación de la actividad de la 5α-reductasa tipo 1 en función del pH

Para medir la actividad de 5AR-1 dependiente del pH, se llevaron a cabo ensayos similares a los descritos en el ensayo anterior, pero utilizando 20 mM de buffer de fosfato de sodio en un rango de pH de 6 a 8 con diferentes concentraciones de T fría.

8.2.5.1.3. Determinación de la actividad de la enzima tipo 1

La actividad de la 5AR-1 se determinó al monitorear la conversión de T a DHT. Se prepararon mezclas conteniendo un volumen final de 1 mL con 1 mM de DTT en buffer de fosfato de sodio 20 mM a pH = 7.5, 2 nM de [1,2,6,7³H]T y diferentes concentraciones de T fría (5 X 10⁻⁷-6.3 X 10⁻⁶ M) o DHT (5 X 10⁻⁷-2.7 X 10⁻⁵ M) y 2 mM de NADPH⁴³. La reacción empezó cuando se adicionó la fracción enzimática a la mezcla (60 µg de proteína en un volumen de 7.5 µL) y ésta fue incubada a 37°C por 60 min. La reacción se concluyó adicionando 1 mL de diclorometano. La incubación en ausencia de tejido se llevó a cabo como control. Este ensayo se hizo por duplicado.

8.2.5.1.4. Determinación de la actividad de la enzima tipo 2

La actividad de la isoenzima 5AR-2 se determinó como se describió con anterioridad^{52,53}. Se preparó una mezcla conteniendo un volumen final de 1 mL con 1 mM de DTT en buffer de fosfato de sodio 40 mM a pH = 6.5 para las próstatas humanas, 2 mM de NADPH y 2 nM de [1,2,6,7³H]T. La reacción empezó cuando se adicionó la fracción enzimática a la mezcla (500 µg de proteína en un volumen de 80 µL) y ésta fue incubada a 37°C por 60 min. La reacción se concluyó adicionando 1 mL de diclorometano. La incubación en ausencia de tejido se llevó a cabo como control. Este ensayo se hizo por duplicado.

8.2.5.1.5. Extracción y purificación de DHT formada a partir de T (actividades de las 5α-reductasas tipo 1 y 2)

Las mezclas de reacción (medio de incubación/diclorometano), se agitaron en un vortex por un minuto y se aisló la fase con diclorometano en un tubo diferente. Este procedimiento se repitió cuatro veces más. El extracto con diclorometano se evaporó a sequedad con una corriente de nitrógeno y se resuspendió en 50 µL de metanol y se aplicó en placas para cromatografía. Se utilizaron T, T + DHT y DHT frías como referencias. Las placas se eluyeron en

un medio cloroformo:acetona 9:1 y se dejaron secar a temperatura ambiente; la cromatoplaaca se eluyó en tres ocasiones. Las señales de DHT se revelaron con ácido fosfomolibdénico y la T con una lámpara de UV (254 nm). Posteriormente, se hicieron cortes de la placa en segmentos de 1 cm cada una y se introdujeron en tubos de centelleo conteniendo 5 mL de líquido de centelleo. Se determinó la radioactividad en un contador de centelleo y se identificó la radioactividad correspondiente a la T y la DHT.

La radioactividad que mostró el mismo comportamiento que el estándar de DHT se consideró como la DHT producto de la conversión a partir de T.

Las muestras control de las incubaciones, así como la separación cromatográfica e identificación, se llevaron a cabo de la forma descrita anteriormente pero en ausencia de tejido. Los rendimientos de DHT producida se calcularon a partir de los segmentos cortados, considerando la cantidad total de radioactividad contenida en cada placa.

La zona de radioactividad que presentó un comportamiento similar al estándar de T ($R_f = 0.56$) correspondió a un 70% de la radioactividad presente en la placa. La radioactividad contenida en la zona correspondiente al estándar de DHT ($R_f = 0.67$) se identificó como la DHT producida y correspondió a un 20-27% de la radioactividad total presente en la placa. Este resultado fue bajo la consideración de que se estaba identificando en un 100% la actividad de ambas isoformas de la 5α -reductasa, para el desarrollo de las gráficas correspondientes.

La $[^3\text{H}]T$ ($R_f = 0.56$) se identificó de las incubaciones control que no contenían tejido y que presentaron un comportamiento cromatográfico similar al del estándar no marcado, mediante el uso de una lámpara de luz UV (254 nm). La radioactividad contenida en la zona correspondiente al estándar de DHT ($R_f = 0.67$) del cromatograma control, fue el 1% de la radioactividad total detectada en la placa y se consideró como el error, y este valor se sustrajo de los cromatogramas experimentales.

La actividad de la 5AR-1 se calculó a partir del porcentaje de DHT marcada producida, tomando en cuenta los valores de recuperación de radioactividad, los valores de los blancos, la actividad específica de $[^3\text{H}]T$ y la proporción de $[^3\text{H}]T$ con respecto a la T y la DHT no marcadas. La actividad de la 5AR-2 se calculó tomando en cuenta los valores de recuperación de radioactividad, los valores de los blancos y la actividad específica de la $[^3\text{H}]T$.

Los valores de K_m (constante de velocidad) y V_{max} (velocidad máxima) se obtuvieron de gráficas de Lineweaver-Burk⁶⁰, en las cuales las regresiones lineales se determinaron por el método de mínimos cuadrados.

La eficiencia de la conversión de T por la 5AR-1 se estimó de acuerdo al Reporte de Weisser y Krieg⁶¹.

8.2.5.1.6. Determinación de la concentración inhibitoria 50 de los nuevos esteroides sobre las actividades de las 5 α -reductasas tipo 1 y 2

Con el fin de calcular los valores de CI₅₀, (concentración de los nuevos esteroides o finasterida necesarios para inhibir el 50% de la actividad de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 y 2, se prepararon seis series de tubos conteniendo cantidades crecientes de los esteroides (10⁻¹¹ – 10⁻³ M disueltos en dimetilsulfóxido, DMSO) y se incubaron por duplicado.

El ensayo de actividad de la 5AR-2 se hizo en presencia de 1 mM de DTT, 40 mM de buffer de fosfato de sodio a pH = 6.5, 2 mM de NADPH, 2nM de [1,2,6,7³H]T y 500 μ g de proteína de la fracción enzimática que se obtuvo de próstata humana descrita con anterioridad. Para el ensayo de actividad de la 5AR-1 se utilizó 1 mM de DTT, 20 mM de buffer de fosfato de sodio a pH = 7.5, 2 mM de NADPH, 2nM de [1,2,6,7³H]T y 6.31 μ g de T fría. La reacción se inició al añadir 60 μ g de 5AR-1 solubilizada teniendo un volumen final de 1 mL.

Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C por 60 min, y se añadió 1 mL de diclorometano para detenerlas. La extracción, los procedimientos cromatográficos, así como la determinación de radioactividad contenida en la fracción correspondiente DHT se determinó como ya ha sido descrito anteriormente.

La concentración necesaria de finasterida y de los nuevos esteroides requerida para inhibir en un 50% a cualquiera de las dos isoformas (IC₅₀) se determinó a partir de gráficas de inhibición utilizando el software SigmaPlot®.

8.2.5.1.7. Ensayo de competencia de unión al receptor androgénico

Para los ensayos de competencia de unión al RA, se prepararon tubos conteniendo 1 nM de [³H]Mibolerona con concentraciones crecientes (1 X 10⁻¹⁰ – 4 X 10⁻⁷ M) de MIB fría o de los nuevos esteroides en etanol o acetona, o en ausencia del competidor⁵⁶. A los incubados se les adicionaron 200 nM de tramcinolona en etanol, con el fin de prevenir la interacción de la MIB con los receptores de glucocorticoides y de progesterona; el disolvente finalmente se evaporó.

A los tubos se les adicionaron alícuotas de 200 μ L de fracción citosólica de próstata y se incubaron en presencia de 300 μ L de TEMD conteniendo inhibidor de proteasas por 24 h a 4°C. Este ensayo se hizo por duplicado. Al final de la incubación el complejo de unión [³H]Mibolerona-RA se separó por el método de hidroxapatita (HAP)⁶².

Se adicionaron 600 μ L del supernadante a tubos conteniendo líquido de centelleo y se contó la radioactividad presente en el complejo [³H]Mibolerona-RA. El valor de CI₅₀ de cada compuesto se calculó de acuerdo a las gráficas de concentración versus el porcentaje de unión usando el software SigmaPlot®.

8.2.6. Ensayos *in vivo*

Se disolvieron 2 mg/kg de los esteroides en 200 μ L de aceite de ajonjolí y se administraron a través de inyecciones subcutáneas diarias durante 6 días a hámsteres gonadectemizados, junto con 1 mg/kg de testosterona. Tres grupos de los hámsteres gonadectemizados se guardaron como control; otro grupo se inyectó con 200 μ L de aceite de sésamo, uno más con 1 mg/kg de testosterona y el tercero con T mas 1 mg/kg de finasterida.

Después del tratamiento, los animales se sacrificaron con CO₂. El tamaño del diámetro de la mancha pigmentada del órgano del flanco se midió con un vernier y se disectaron la próstata y las vesículas seminales de cada animal. Los resultados se analizaron usando un análisis de varianza y el Método de Dunnett con el software JMP IN 5.1®.

IX RESULTADOS

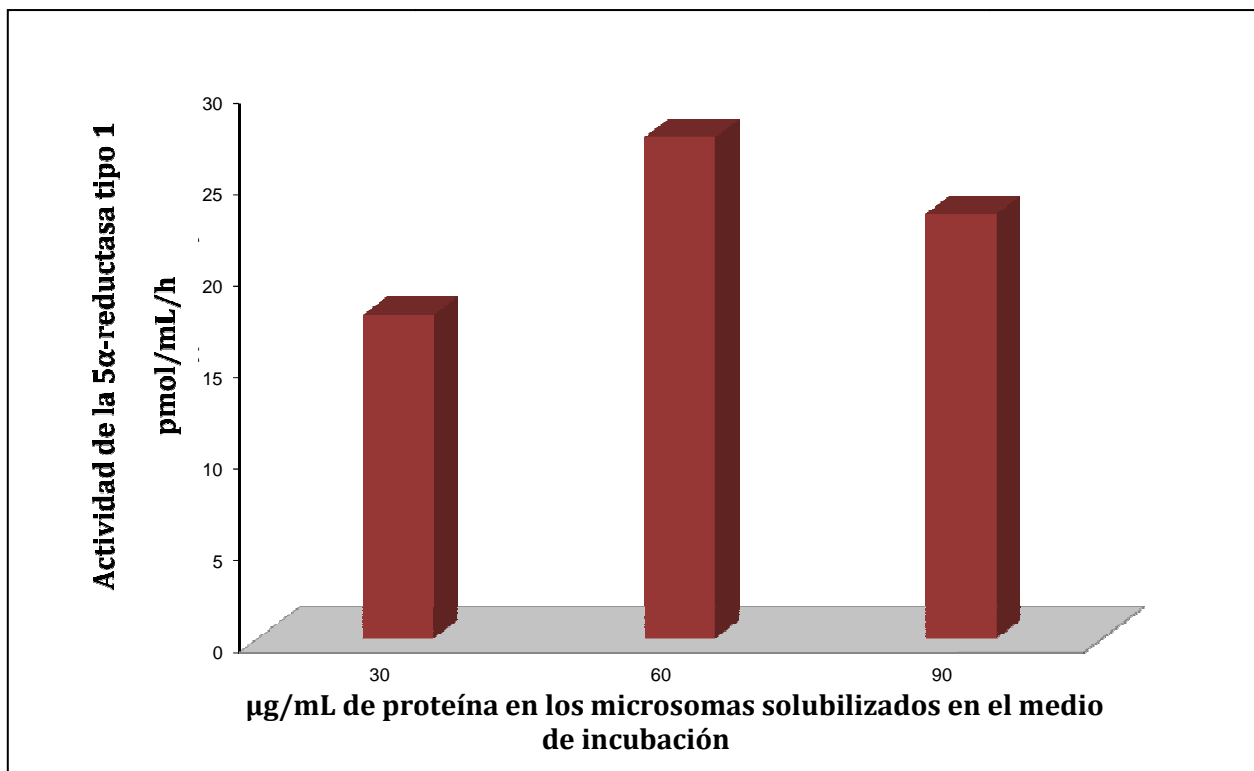
9.1. Ensayos *in vitro*

9.1.1. Concentración de proteína dependiente de la actividad de la 5 α -reductasa tipo 1

Cuando se utilizaron diferentes concentraciones de proteína obtenida de la fracción microsomal de hígado de rata, la 5AR-1 mostró diferentes actividades. La concentración óptima de proteína fue de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gráfica 1).

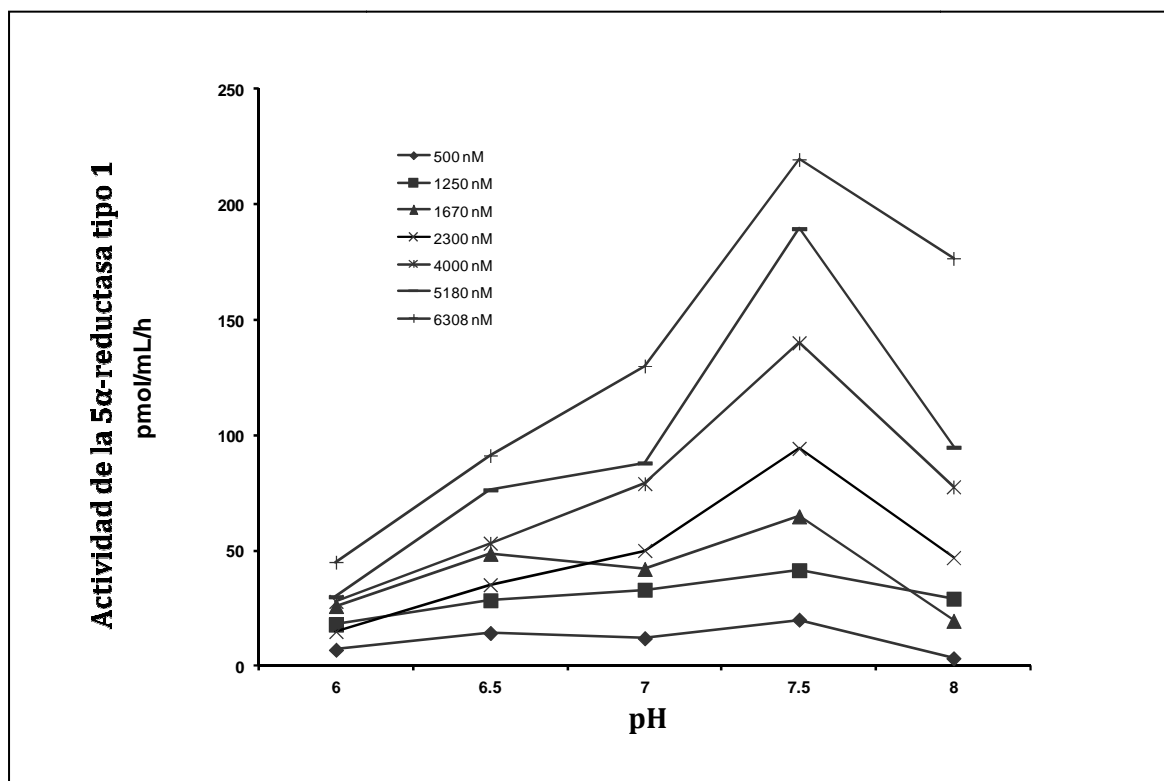
9.1.2. Actividad de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 dependiente del pH

La 5AR-1 presente en los microsomas solubilizados de hígado de rata, mostró la conversión de T a DHT en presencia de NADPH. Se determinó el perfil de pH de esta enzima utilizando diferentes concentraciones de T. La actividad de la enzima 5AR resultó mayor a un pH de 7.5 y fue de 6.31 μM de DHT formada. (Gráfica 2).



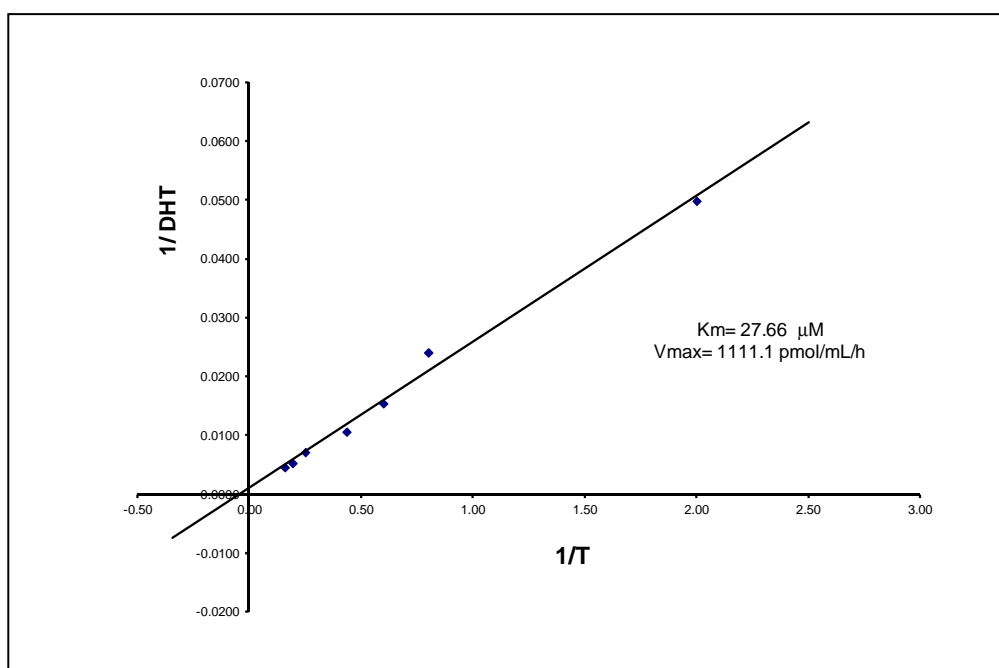
Gráfica 1

Actividad de la enzima 5α-reductasa tipo 1 en presencia de diferentes concentraciones de proteína



Gráfica 2

Actividad de la enzima 5α-reductasa tipo 1 a diferentes pHs



Gráfica 3
Cinética enzimática de la 5α-reductasa tipo 1 a pH = 7.5

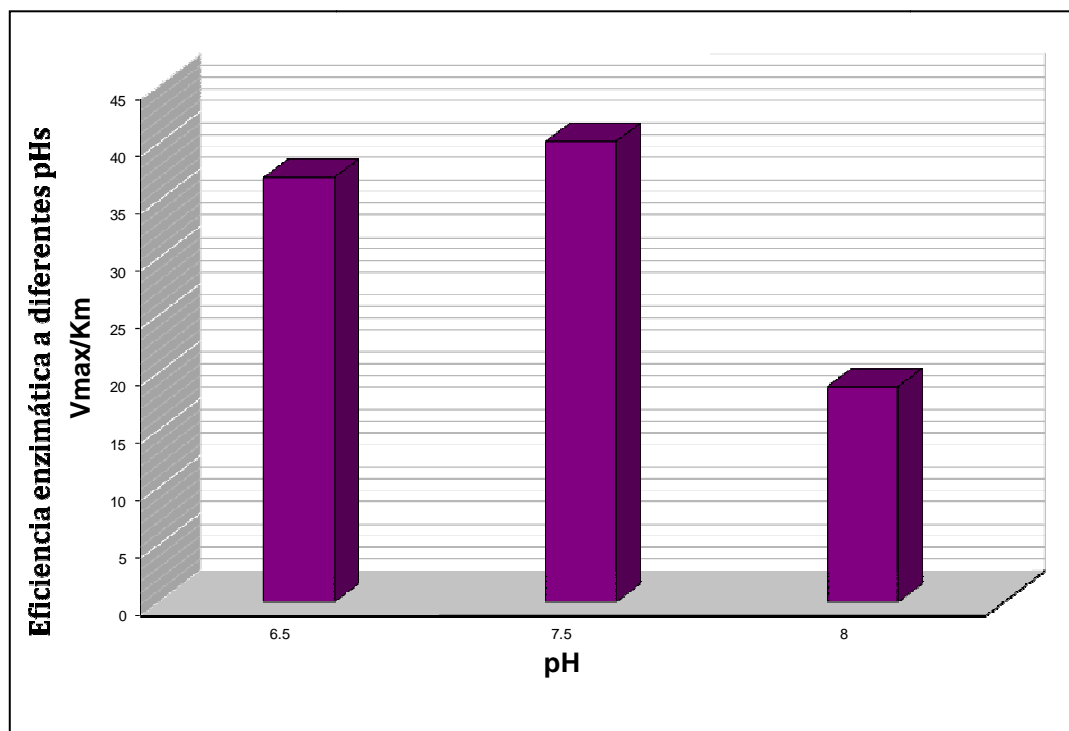
Los resultados de la cinética enzimática mostraron que el valor de la K_m , determinado en presencia de diferentes concentraciones de T y NADPH y a pH de 7.5, fue de $27.66 \mu\text{M}$. Por otro lado, se encontró que la V_{max} medida en estas condiciones fue de $1,111.1 \text{ pmol/mL/h}$ de DHT formada (Gráfica 3). Estos valores se utilizaron en los ensayos para medir la actividad de los nuevos esteroides.

Además, se calculó la eficiencia de la 5AR-1 $(V_{\text{max}}/K_m)^{50, 51}$ para la conversión de T a DHT. Ésta se obtuvo a partir de la proporción entre la velocidad máxima (V_{max}) de producción de DHT y las constantes de Michaelis, utilizando diferentes pHs (Gráfica 4).

Estos datos indicaron que la 5AR-1 es más eficiente a pH de 7.5 (Tabla 58, Gráfica 4).

pH	Eficiencia = $V_{\text{máx}}/K_m$
6.5	37.03
7.5	40.16
8.0	18.78

Tabla 58. Eficiencia de la 5AR-1 para la conversión de T a DHT a diferentes pHs.



Gráfica 4
Eficiencia enzimática de la 5 α -reductasa tipo 1 a diferentes pHs

9.2. Actividad biológica de los nuevos esteroides

9.2.1. Ensayos *in vitro*

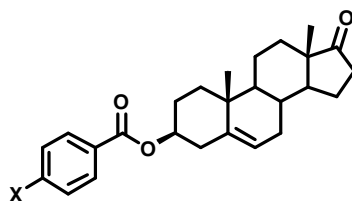
9.2.1.1. Determinación de la concentración inhibitoria 50 de los nuevos esteroides en próstata humana

La concentración de finasterida y de los esteroides sintetizados necesaria para inhibir las actividades de 5 α -reductasa tipo 1 y 2 al 50% (CI₅₀) se determinó de las gráficas de inhibición, utilizando diferentes concentraciones de los esteroides evaluados; los resultados obtenidos, así como la desviación estándar correspondiente se muestran en la Tabla 62. No se muestran los resultados de los derivados 13-18 (anillo de benzimidazol en C-17 de la DHEA) debido a que no fue posible disolverlos, lo cual impidió llevar a cabo las pruebas biológicas.

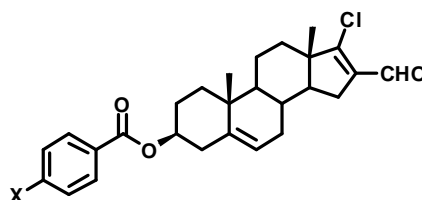
La finasterida inhibió a la isoforma tipo 2 de la enzima con un valor bajo de CI₅₀, mientras que este valor fue mayor para el caso de la isoforma tipo 1. Los esteroides **1** y **2** fueron los únicos que inhibieron a la isoforma tipo 2 de la 5AR, con valores de IC₅₀ mayores a 100 μ M y 0.00358 μ M respectivamente (Tabla 59).

Los esteroides **1-12** inhibieron la actividad de la 5AR-1; sin embargo, los compuestos **3** y **6** mostraron un valor elevado de CI₅₀ (menor actividad) comparado con el resto de los esteroides. Por otro lado, el compuesto **11** mostró ser más activo, aún mejor que la finasterida

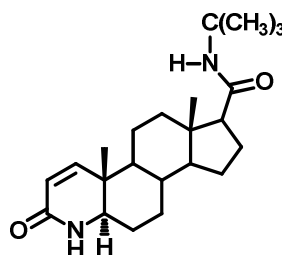
0.55 ± 0.02 y 0.63 ± 0.005 μM, respectivamente, siendo éstos últimos los compuestos más activos.



No.	Derivado, X =	CI ₅₀ [μM] 5AR-1	CI ₅₀ [μM] 5AR-2	RBA
1	-H	1.0 ± 0.003	> 100	No unió
2	-F	0.9 ± 0.005	0.00358 ± 0.00025	No unió
3	-Cl	5.0 ± 0.04	NA	No unió
4	-Br	0.8 ± 0.002	NA	No unió
5	-I	0.8 ± 0.0011	NA	No unió
6	-CH ₃	5.0 ± 0.009	NA	No unió



No.	Derivado, X =	CI ₅₀ [μM] 5AR-1	CI ₅₀ [μM] 5AR-2	RBA
7	-H	0.65 ± 0.004	NA	No unió
8	-F	0.70 ± 0.001	NA	No unió
9	-Cl	0.90 ± 0.002	NA	No unió
10	-Br	0.80 ± 0.01	NA	No unió
11	-I	0.55 ± 0.02	NA	No unió
12	-CH ₃	0.90 ± 0.03	NA	No unió



Finasterida

CI ₅₀ [μM] 5AR-1	CI ₅₀ [μM] 5AR-2	RBA
0.63 ± 0.005	0.0085 ± 0.0025	No unió

Tabla 59. Concentración necesaria de finasterida y de los nuevos esteroides para inhibir las actividades de 5α-reductasa tipo 1 y 2 al 50% (CI₅₀). **NA** = No presentó actividad. **RBA** = Capacidad de unión relativa al receptor androgénico.

9.2.1.2. Unión de los nuevos esteroides al receptor androgénico

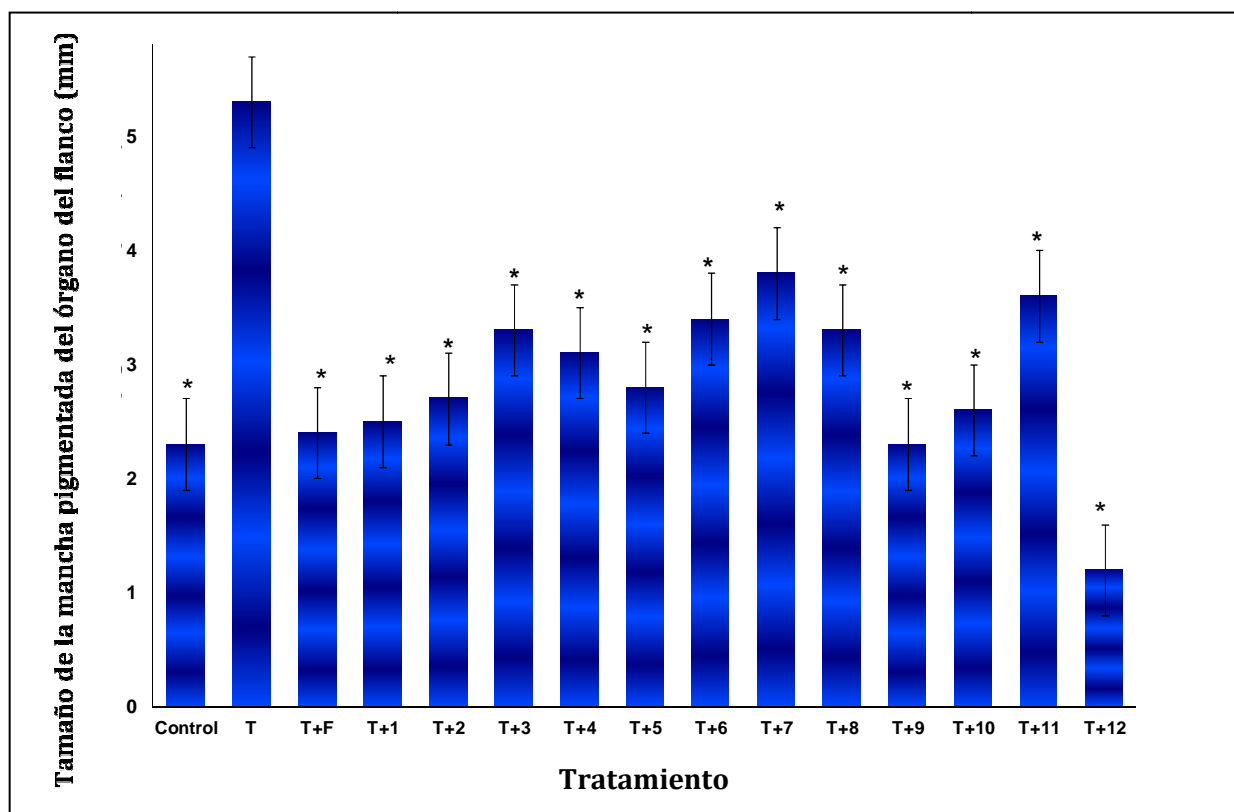
La capacidad de unión de los nuevos compuestos al RA se determinó a partir de los valores de CI_{50} y de la capacidad de unión relativa (RBA) mostrada por cada compuesto. El valor de CI_{50} se calculó de acuerdo a las gráficas de concentración de MIB fría o de la concentración de los compuestos sintetizados versus el porcentaje de unión de la MIB. Como puede observarse, ningún compuesto unió al receptor androgénico (Tabla 60).

9.2.2. Ensayos *in vivo*

9.2.2.1. Ensayo del órgano del flanco

En cuanto a estos resultados, en primer lugar hay que puntualizar que el órgano del flanco del hámster es una estructura par, pigmentada, situada a ambos lados de la columna de dicho animal. Es una formación compleja, compuesta por glándulas sebáceas especiales, pelos diferentes al resto de la piel y células pigmentarias. Se comporta como un órgano sexual secundario. Al igual que las glándulas sebáceas en el ser humano y otras especies, este órgano es andrógeno-dependiente, siendo en el macho una mancha pigmentada y con unos pelos más gruesos. Las hormonas sexuales masculinas estimulan su crecimiento tanto en las hembras como en los machos inmaduros y castrados. Se ha demostrado que la testosterona se convierte en DHT en el órgano del flanco y se postula que ésta última es el principal esteroide de estimulación androgénica. Por todo ello el órgano del flanco se ha usado a menudo en estudios dermatológicos, dado que hay afecciones tan comunes como el acné vulgaris, la seborrea y la calvicie de patrón masculino, que se relacionan con una hiper-respuesta de la piel a los andrógenos, por lo que este es un buen modelo para el estudio de los antiandrógenos. Es por ello que estos resultados se esperaba presentarían alguna relación con la actividad observada hacia la inhibición de la isoforma tipo 1 de la enzima 5α -reductasa, ya que recordemos que esta isoforma predomina en las glándulas sebáceas de la piel y el hígado^{59,1}.

Después de la castración, el diámetro de la mancha pigmentada del órgano del flanco de los hámsteres machos disminuyó ($p < 0.005$) comparado con el tamaño normal de estas glándulas. El tratamiento con vehículo solo, no cambió esta condición, mientras que inyecciones subcutáneas de 1 mg/kg de T por 6 días, aumentó significativamente ($p < 0.005$) el diámetro de la mancha pigmentada del órgano del flanco de los hámsteres (Gráfica 5). Cuando la T y finasterida (1 mg/kg) o los esteroides **1-12** (2 mg/kg) se inyectaron juntos, el diámetro de la mancha pigmentada del órgano del flanco disminuyó significativamente ($p < 0.005$), comparado con los animales tratados con T (Gráfica 5). El compuesto **12** mostró la mayor actividad farmacológica (menor diámetro de la mancha pigmentada = 1.0 mm).

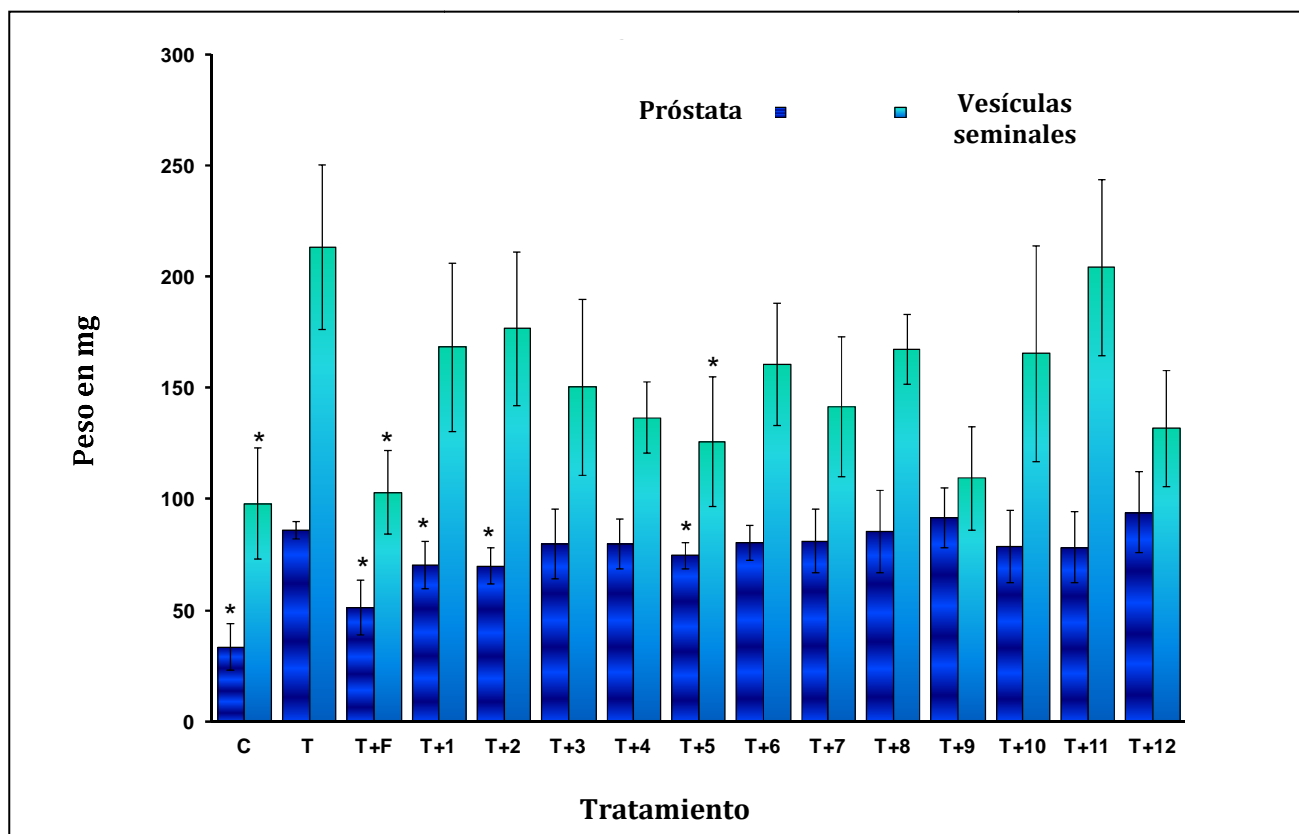


Gráfica 5

Tamaño de la mancha pigmentada del órgano del flanco en presencia o ausencia del tratamiento con finasterida y con los nuevos esteroides (mm)

9.2.2.2. Efecto de los nuevos esteroides sobre el peso de la próstata y de las vesículas seminales

Después de la castración de los hámsteres, el peso de las próstatas y de las vesículas seminales disminuyó ($p < 0.05$) comparado con el de las glándulas normales. El tratamiento con el vehículo solo no cambió esta condición, mientras que las inyecciones subcutáneas de 1 mg/kg de T por 6 días aumentó significativamente ($p < 0.05$) el peso de estas glándulas en los hámsteres machos castrados (Gráfica 6). Cuando la T (1 mg/kg) mas finasterida (1 mg/kg) o los compuestos **1**, **2**, **5** (2 mg/kg) se inyectaron juntos, el peso de la próstata y de las vesículas seminales disminuyó significativamente ($p < 0.05$), comparado con el observado en los animales tratados con T (Gráfica 6). El compuesto **3** disminuyó significativamente el peso de la próstata; mientras que el peso de las vesículas seminales no mostró una diferencia significativa con aquéllos tratados con T. De cualquier forma, los esteroides **1-7** y **10** mostraron una tendencia a disminuir el peso de estas glándulas, pero la diferencia con los animales tratados con T no fue significativa ($p > 5$).



Gráfica 6
Efecto de los nuevos esteroides sobre el peso de la próstata y de las vesículas seminales

X

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1 Resultados de la Parte Química

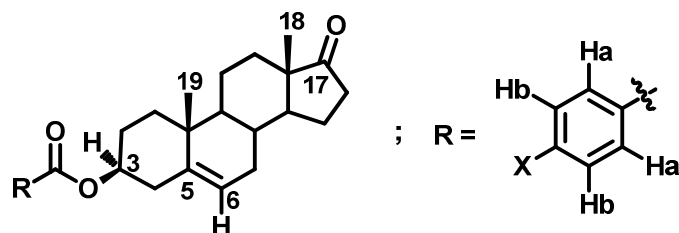
De acuerdo a lo descrito con anterioridad, la primer ruta de síntesis consistió en obtener, en primer lugar, los 3 β -ésteres derivados del ácido benzoico, que corresponden a la primer serie de derivados (**1-6**), lo cual se comprobó con la presencia de las siguientes señales: en el IR se observa en un rango aproximado de 1,731-1,741 cm⁻¹ el singulete correspondiente al grupo carbonilo de cetona, de 1,701-1,719 cm⁻¹ la señal debida al grupo carbonilo de éster, así como las bandas de confirmación de la presencia de este grupo, en un rango de 1,269-1,245 cm⁻¹ y de 1,270-1,116 cm⁻¹. De 798-847 cm⁻¹ la doble ligadura trisustituida cíclica, en 688 y 714 cm⁻¹, se observan las señales debidas a la monosustitución aromática, en el caso del derivado **1**, y de 683-771 cm⁻¹ la señal debida a la disustitución aromática en *para*- para los derivados **2-6**, así como las señales de 2,960-2,860 cm⁻¹ y 1,453-1,467 cm⁻¹ y 1,371-1,372 cm⁻¹ debidas a los metilos angulares (Espectros 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1 y 6.1).

Por otro lado, en la RMN de protón, se presenta una tabla comparativa de los desplazamientos observados de los hidrógenos más representativos dentro de los nuevos derivados (Tabla 63; Espectros 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2 y 6.2). De la misma manera con la RMN de carbono (Tabla 64 y 64.1; Espectros 1.3, 2.3, 3.3, 4.3, 5.3 y 6.3).

En la RMN de protón, se observan claramente los protones aromáticos: en un rango de 7.79-8.05 ppm, la señal debida a los protones **a** (2H), con una J_o entre 7.2-8.8 Hz, en el derivado **2**, que contiene el átomo de flúor, se observa el acoplamiento H-F con un valor de 5.6 Hz; los

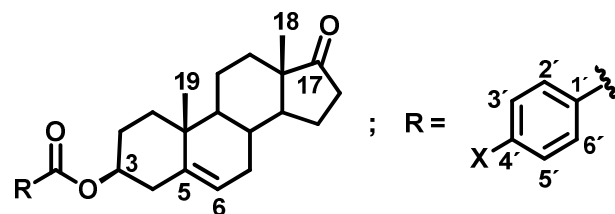
hidrógenos **b** (2H) se observan en un rango de 7.10-7.79 ppm con una señal doblete, derivados con cloro, bromo, yodo y metilo, o triplete, en los derivados del ácido benzoico y con flúor; y con una $J_o = 8.0-8.8$ Hz, observándose nuevamente el acoplamiento H-F con un valor de 8.8 Hz; en 7.55 ppm se observa el hidrógeno **c** del derivado **1** con $J_o = 8.0$ Hz (Tabla 63; Espectros 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2 y 6.2).

En cuanto a la RMN de carbono, las señales más significativas son: la presencia del carbono carbonílico de cetona en un rango de 221.03-221.25 ppm; de 165.09-166.19 ppm la señal debida al carbono carbonílico del éster. Se observan las señales de los carbonos aromáticos en los siguientes rangos: C1' entre 127.14-132.75 ppm; C2' y C6' entre 129.12-132.25 ppm; en el caso del derivado fluorado, se observa el desdoblamiento de la señal debido al acoplamiento con el átomo de flúor ($J_{Ha-F} = 5.6$ y $J_{Hb-F} = 8.8$); la señal de C3' y C5' se observa entre 115.43-131.23 ppm, observándose nuevamente el desdoblamiento de la señal de carbono debido al acoplamiento con el flúor; y finalmente, en un rango de 100.68-165.16 ppm se observa la señal de C4', la cual varía de acuerdo al heteroátomo unido a este carbono (Tabla 64 y 64.1; Espectros 1.3, 2.3, 3.3, 4.3, 5.3 y 6.3).



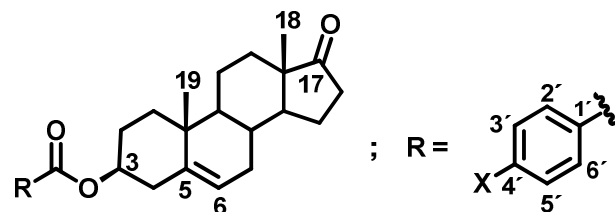
-R	H18	H19	H3	H6	Ha	Hb
$\delta(\text{ppm})$						
	1.10	0.90	4.85	5.46	8.04	7.43
	1.09	0.90	4.85	5.46	8.05	7.10
	1.10	0.90	4.85	5.46	7.98	7.41
	1.09	0.89	4.85	5.45	7.90	7.57
	1.09	0.89	4.84	5.45	7.79	7.73
	1.09	0.89	4.84	5.45	7.92	7.22

Tabla 60. Desplazamiento de los protones correspondientes a la ^1H -RMN de los benzoatos de 17-oxoandrosta-5-en-3 β -ilo. Espectros 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2 y 6.2. Espectro 1.2: Hc, $\delta = 7.55$ ppm. Espectro 6.2: H(Ar-CH₃), $\delta = 2.40$ ppm.



-R	C18	C19	C3	C5	C6	C17
$\delta(\text{ppm})$						
H	13.55	19.40	74.31	139.93	121.99	221.03
F	13.71	19.55	74.66	139.99	122.28	221.13
Cl	13.54	19.39	74.61	139.74	122.12	221.08
Br	13.64	19.55	74.80	139.80	122.36	221.25
I	13.70	19.55	74.79	139.98	122.28	221.25
H ₃ C	13.68	19.55	74.21	140.09	122.07	221.34

Tabla 61. Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ^{13}C -RMN de los benzoatos de 17-oxoandroster-5-en-3 β -ilo. Espectros 1.3, 2.3, 3.3, 4.3, 5.3 y 6.3. Espectro 6.3: Ar-CH₃, $\delta = 20.46$ ppm.



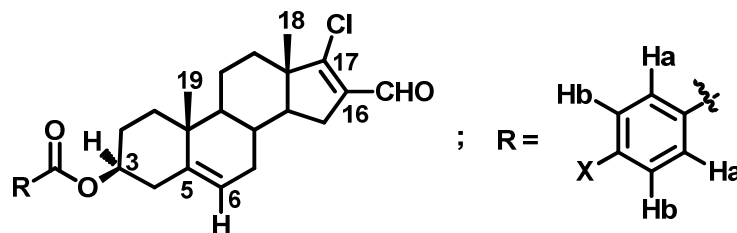
-R	C1'	C4'	C3',C5'	C2',C6'	C=O ÉSTER
$\delta(\text{ppm})$					
	132.75	130.74	128.26	129.52	165.97
	127.14	165.16	115.65, 115.43	132.25 132.15	167.08
	129.13	139.17	128.60	130.92	165.09
	129.40	127.58	131.23	131.99	165.39
	130.31	100.68	131.15	137.75	165.61
	128.08	143.52	129.68	129.12	166.19

Tabla 61.1. Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ^{13}C -RMN de los benzoatos de 17-oxoandrosta-5-en-3 β -ilo. Espectros 1.3, 2.3, 3.3, 4.3, 5.3 y 6.3.

Ahora bien, dentro de las señales que se observan para la segunda serie de compuestos sintetizados (**7-12**) dentro de la primer ruta de síntesis, y en los cuales se presenta un átomo de cloro así como un grupo formilo vinílico, las más importantes a destacar son: en IR se observa una señal en un rango de 1,706-1,718 cm^{-1} debida al grupo carbonilo del éster; así como las bandas de confirmación de la presencia de este grupo en un rango de 1,287-1,269 cm^{-1} y de 1,278-1,103 cm^{-1} . Una señal alrededor de 1,672-1,663 cm^{-1} debida a la presencia de la función carbonílica del grupo aldehído, así como en 2,909-2,833 cm^{-1} y 2,885-2,727 cm^{-1} unas señales debidas a la vibración C-H del grupo formilo conocidas como resonancia de Fermi. Finalmente, se observa una señal entre 823-789 cm^{-1} debidas a la vibración del enlace C-Cl vinílico (Espectros 7.1, 8.1, 9.1, 10.1, 11.1 y 12.1).

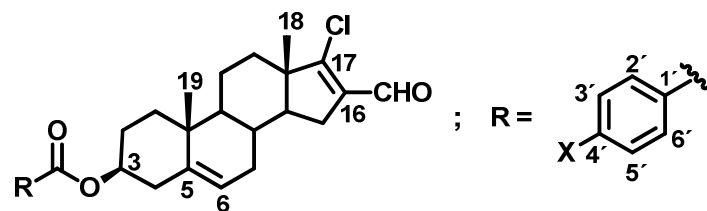
En la RMN de protón, se observan claramente los protones aromáticos en desplazamientos químicos bastante similares a los descritos para la primer serie de compuestos, al igual que sus constantes de acoplamiento. Destaca la señal singulete del protón del grupo formilo en un desplazamiento de 9.99 ppm en todos los casos (Tabla 65; Espectros 7.2, 8.2, 9.2, 10.2, 11.2 y 12.2).

En cuanto a la RMN de carbono, las señales más significativas son: la del carbono del grupo formilo entre 188.20-188.28 ppm; la señal correspondiente a C17-Cl que aparece en un rango de 162.37-162.94 ppm y finalmente una señal entre 139.34-136.55 ppm que corresponde al C16 que está soportando al grupo formilo. Nuevamente se puede observar cómo se modifica el desplazamiento del C4' debido al heteroátomo unido a éste (Tabla 66 y 66.1; Espectros 7.3, 8.3, 9.3, 10.3, 11.3 y 12.3).



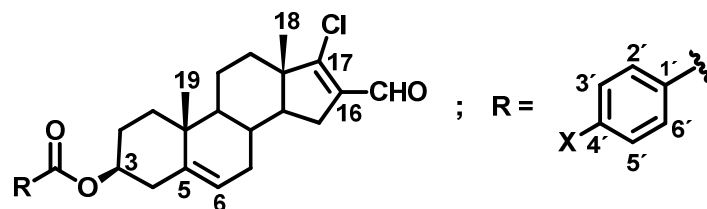
-R	H18	H19	H3	H6	Ha	Hb	H-FORMILO
$\delta(\text{ppm})$							
H-	1.11	1.00	4.86	5.45	8.04	7.43	9.99
F-	1.10	1.00	4.85	5.44	8.05	7.09	9.99
Cl-	1.11	1.00	4.84	5.44	7.96	7.40	9.99
Br-	1.11	1.00	4.84	5.44	7.89	7.56	9.99
I-	1.10	1.00	4.84	5.44	7.79	7.73	9.99
H ₃ C-	1.11	1.00	4.84	5.44	7.92	7.23	9.99

Tabla 62. Desplazamiento de los protones correspondientes a la ^1H -RMN de los benzoatos de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 7.2, 8.2, 9.2, 10.2, 11.2 y 12.2. Espectro 7.2: Hc, $\delta = 7.55$ ppm. Espectro 12.2: H(Ar-CH₃), $\delta = 2.40$ ppm.



-R	C18	C19	C3	C5	C6	C16	C17
$\delta(\text{ppm})$							
H-	19.44	15.13	74.38	140.12	122.12	136.56	162.94
F-	19.44	14.86	74.60	140.26	122.26	136.80	162.37
Cl-	19.42	15.12	74.71	139.98	122.24	139.34	162.42
Br-	19.41	15.12	74.74	139.96	122.24	136.55	162.43
I-	19.42	15.13	74.74	140.00	122.24	136.58	162.37
H ₃ C-	19.43	15.13	74.17	140.22	122.03	136.58	162.40

Tabla 63. Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ^{13}C -RMN de los benzoatos de 17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 7.3, 8.3, 9.3, 10.3, 11.3 y 12.3. . Espectro 12.3: Ar-CH₃, $\delta = 20.48$ ppm.



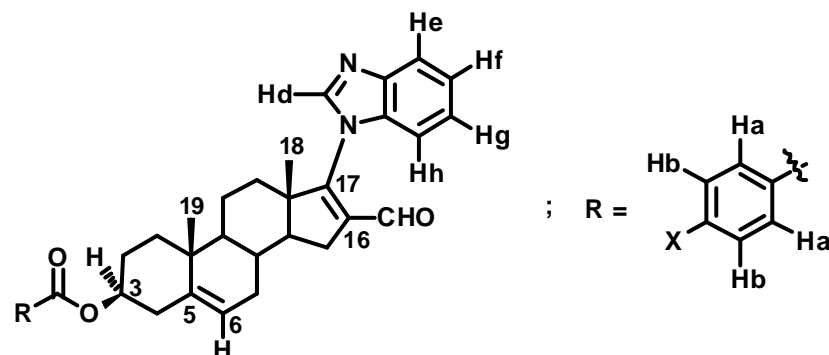
-R	C1'	C4'	C3',C5'	C2',C6'	C=O ÉSTER	C=O FORMILO
$\delta(\text{ppm})$						
H	130.83	132.93	128.40	129.67	166.11	188.28
F	127.01	165.14	115.67, 115.45	132.26 132.17	167.10	188.20
Cl	129.27	136.56	128.76	131.08	165.23	188.24
Br	129.72	128.01	131.22	131.75	165.36	188.24
I	130.34	100.66	131.15	137.77	165.59	188.20
H ₃ C	128.14	143.53	129.07	129.70	165.17	188.20

Tabla 63.1. Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ^{13}C -RMN de los benzoatos de 17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 7.3, 8.3, 9.3, 10.3, 11.3 y 12.3.

Ahora bien, en cuanto a la tercer serie de compuestos dentro de la primer ruta de síntesis, los cuales contienen un anillo de benzimidazol dentro de su estructura (**13-18**), podemos observar dentro de la espectroscopía de IR, nuevamente las señales que corresponden a los carbonos carbonílicos tanto del grupo éster como del grupo formilo, en rangos similares a los citados anteriormente, y apareciendo señales alrededor de 990-985 y 600-472 cm^{-1} , debidas a la presencia del anillo de benzimidazol (Espectros 13.1, 14.1, 15.1, 16.1, 17.1 y 18.1).

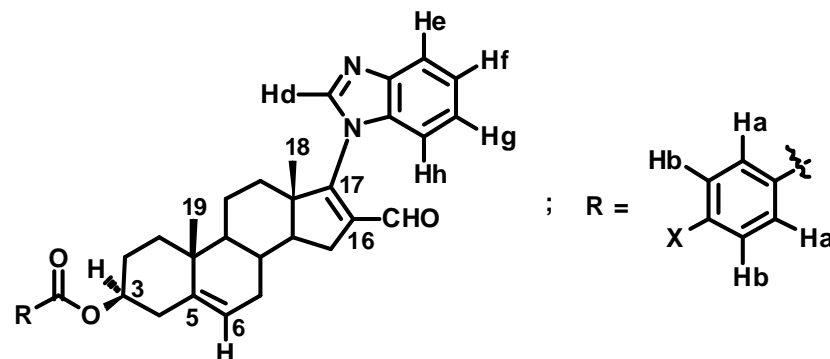
Las señales más importantes, observadas en la RMN de protón son: el protón correspondiente al grupo formilo en 9.59 ppm, así como los protones del anillo de benzimidazol: un singulete ancho que corresponde a Hd en 7.99 ppm, un multiplete que corresponde a los protones He,h (2H) entre 7.85-7.86 ppm y finalmente otro multiplete que corresponde a los hidrógenos Hf,g (2H) en 7.35 ppm (Tabla 67 y 67.1; Espectros 13.2, 14.2, 15.2, 16.2, 17.2 y 18.2).

Por otro lado, en cuanto a la RMN de carbono, las señales más significativas son: la del carbono del grupo formilo entre 187.91-187.94 ppm, así como las señales del anillo de benzimidazol: Ca entre 141.17-141.59 ppm, Cc entre 124.77-124.82 ppm; Cd entre 123.56-123.57 ppm; Cb entre 121.96-122.17 y Ce entre 120.76-120.79 ppm (Tabla 68 y 68.1; Espectros 13.3, 14.3, 15.3, 16.3, 17.3 y 18.3).



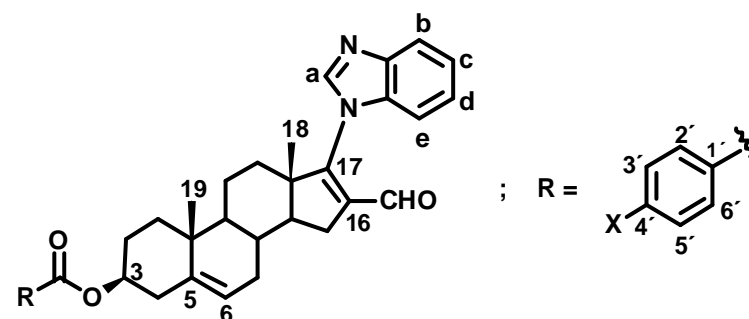
-R	H18	H19	H3	H6	Ha	Hb	H-FORMILO
$\delta(\text{ppm})$							
H	1.22	1.12	4.88	5.48	8.05	7.43	9.59
F	1.24	1.11	4.86	5.47	8.05	7.10	9.59
Cl	1.22	1.11	4.86	5.47	7.97	7.40	9.59
Br	1.22	1.11	4.86	5.48	7.89	7.57	9.59
I	1.22	1.11	4.86	5.48		7.76	9.59
H ₃ C	1.26	1.11	4.86	5.48	7.93	7.23	9.59

Tabla 64. Desplazamiento de los protones correspondientes a la ¹H-RMN de los benzoatos de 17-(1H-benzimidazol-1-il)-16-formil-androsta-5,16-dien-3β-ilo. Espectros 13.2, 14.2, 15.2, 16.2, 17.2 y 18.2. Espectro 13.2: Hc, $\delta = 7.55$ ppm. Espectro 18.2: H(Ar-CH₃), $\delta = 2.40$ ppm.



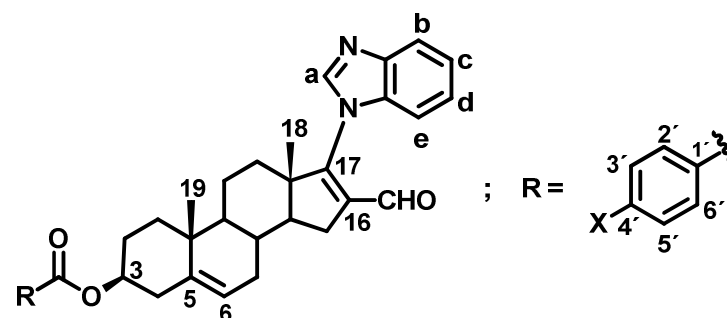
-R	Hd	He,h	Hf,g
$\delta(\text{ppm})$			
	7.99	7.86	7.35
	7.99	7.86	7.35
	7.99	7.85	7.35
	7.99	7.86	7.35
	7.99	7.86	7.35
	7.93	7.85	7.35

Tabla 64.1. Desplazamiento de los protones correspondientes a la ^1H -RMN de los benzoatos de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 13.2, 14.2, 15.2, 16.2, 17.2 y 18.2.



-R	C18	C19	C3	C5	C6	C16	C17	C1'	C4'	C3',C5'
$\delta(\text{ppm})$										
H-	20.57	19.45	74.33	140.22	---	---	141.58	130.84	132.93	128.43
F-	20.57	19.44	74.52	140.22	---	---	140.08	127.05	165.15	115.66, 115.44
Cl-	20.56	19.43	74.56	140.02	120.78	139.37	---	128.76	---	129.27
Br-	20.56	19.43	74.68	140.01	---	129.73	---	128.02	---	131.22
I-	20.56	19.43	74.65	140.01	120.78	130.30	---	---	---	131.15
H ₃ C-	21.78	19.45	74.10	140.24	---	---	143.56	128.10	---	129.13

Tabla 65. Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ^{13}C -RMN de los benzoatos de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 13.3, 14.3, 15.3, 16.3, 17.3 y 18.3. Espectro 18.3: Ar-CH₃, δ = 20.56 ppm.



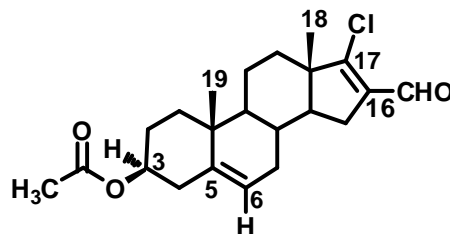
-R	C2',C6'	C=O ÉSTER	C=O FORMILO	Ca	Cb	Cc	Cd	Ce
$\delta(\text{ppm})$								
H	129.67	166.11	187.93	140.17	122.04	124.81	123.57	120.78
F	132.24 132.15	167.09	187.94	141.59	122.12	124.81	123.57	120.79
Cl	131.07	165.23	187.92	141.57	122.16	124.80	123.57	---
Br	131.76	165.59	187.91	141.57	122.17	124.77	123.56	120.79
I	137.78	165.59	187.91	141.57	122.16	124.82	123.57	---
H ₃ C	129.69	166.18	187.94	141.58	121.96	124.80	123.57	120.76

Tabla 65.1. Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ^{13}C -RMN de los benzoatos de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo.. Espectros 13.3, 14.3, 15.3, 16.3, 17.3 y 18.3.

Ahora bien, en cuanto a la segunda ruta de síntesis lo que se hizo, en primer lugar, fue introducir el átomo de cloro así como el grupo formilo vinílico en C17 y C16 respectivamente, por medio de la reacción de Vilsmeier-Haack, al 3 β -acetato de la DEHA para generar el intermediario **19**. De este derivado, las señales más sobresalientes en el IR son: la presencia de una señal en 1,732 cm⁻¹ debida al grupo carbonilo de éster, con sus correspondientes bandas de confirmación en 1,236 y 1,195 cm⁻¹; y una señal en 1,674 cm⁻¹ debida al carbonilo del grupo formilo con sus señales correspondientes a la resonancia de Fermi en 2,825 y 2,738 cm⁻¹ (Espectro 19.1).

En la RMN de protón se observa un singulete en 9.98 ppm debido al hidrógeno del grupo formilo y otro singulete en 2.03 ppm debido a los protones presentes en el grupo metilo del sustituyente metoxilado (Tabla 69; Espectro 19.2). Finalmente, en la RMN de carbono, se observa en 188.05 ppm el carbono carbonílico del grupo formilo; en 170.47 ppm el carbono carbonílico del grupo éster; en 162.24 ppm la señal que corresponde al C17 que sostiene el átomo de cloro; en 136.42 ppm C16 que soporta al grupo formilo y en 19.20 ppm el carbono del grupo metilo que corresponde al grupo metoxilo (Tabla 70; Espectro 19.3).

En cuanto al segundo intermediario **20**, correspondiente a esta ruta sintética, las señales más importantes a destacar son la presencia del grupo metoxilo en C17 así como la presencia del grupo alcohol, debida a la hidrólisis de los ésteres de partida. La señal del grupo formilo se mantiene constante dentro de los rangos descritos con anterioridad, por lo cual se omitirá mencionarlos. Estas señales son: en IR una banda ancha en 3,363 cm⁻¹ y otra en 1,569 cm⁻¹ que corresponden al grupo alcohol de C3 y por otro lado, una banda en 1,117 cm⁻¹ que corresponde a la presencia del grupo éter del metoxilo (Espectro 20.1). En la RMN de protón observamos la presencia del hidrógeno del grupo alcohol en un desplazamiento de 4.03 ppm que corresponde a un singulete, los protones del grupo metoxilo en 4.12 ppm también en señal singulete; y finalmente se observa el hidrógeno del grupo formilo en señal singulete con un desplazamiento de 10.09 ppm (Tabla 69.1; Espectro 20.2). Finalmente, en la RMN de carbono observamos en 179.30 ppm el desplazamiento correspondiente al carbono del grupo formilo; en 175.59 ppm la señal del C17 que soporta al grupo metoxilo; en 124.76 ppm la señal correspondiente al C16 que soporta al grupo formilo y en 60.66 ppm la señal que corresponde al carbono metílico del grupo metoxilado (Tabla 70.1; Espectro 20.3).

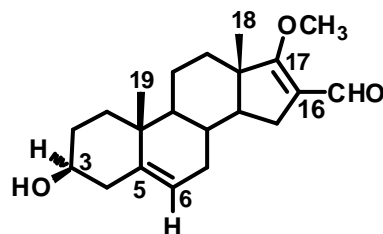


	H18	H19	OCO-CH ₃	H3	H6	H-FORMILO
δ(ppm)	1.06	0.99	2.03	4.60	5.39	9.98

Tabla 66. Desplazamiento de los protones correspondientes a la ¹H-RMN del acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo. Espectro 19.2.

	-OCOCH ₃	C18	C19	C3	C6	C5	C16	C17	C=O ÉSTER	C=O FORMILO
δ(ppm)	19.20	21.39	14.96	73.65	121.82	139.99	136.42	162.24	170.47	188.05

Tabla 67. Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ¹³C-RMN del acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo. Espectro 19.3.



	H18	H19	H3	-OH	-OCH ₃	H6	H-FORMILO
δ(ppm)	1.03	1.00	3.53	4.03	4.12	5.37	10.09

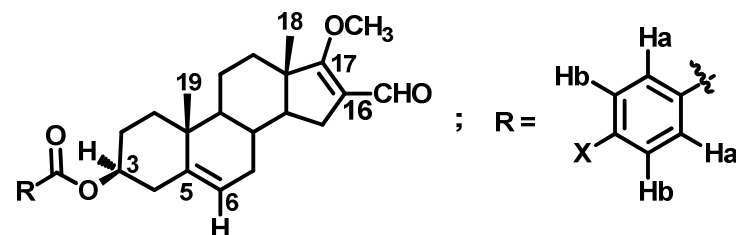
Tabla 68. Desplazamiento de los protones correspondientes a la ¹H-RMN del 16-formil-17-metoxiandrosta-5,16-dien-3β-ol. Espectro 20.2.

	C18	C19	C3	C6	C5	C16	C17	C=O FORMILO	-OCH ₃
δ(ppm)	20.92	19.64	71.05	121.40	141.42	124.76	175.59	179.30	60.66

Tabla 69. Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ¹³C-RMN del 16-formil-17-metoxiandrosta-5,16-dien-3β-ol. Espectro 20.3.

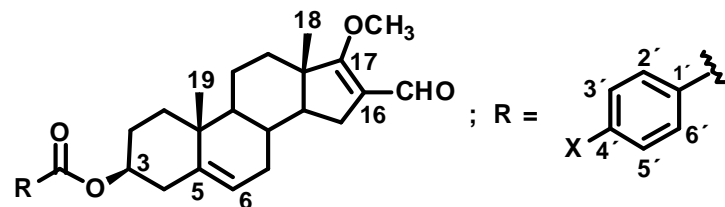
Finalmente, en cuanto a la última serie de compuestos que constó de los 3 β -ésteres derivados del ácido benzoico con el sustituyente metoxilado en el C17 (**21-26**), lo que podemos observar en cuanto a la espectroscopía de IR son las señales tanto del carbono carbonílico correspondientes al grupo éster en un rango de 1,710-1,708 cm⁻¹ con sus bandas confirmatorias en 1,275-1,267 cm⁻¹ y 1,242-1,100 cm⁻¹; la señal que corresponde al grupo carbonilo del formilo entre 1,627-1,625 cm⁻¹ y la señal correspondiente a la resonancia de Fermi entre 2,892-2,850 cm⁻¹ debida a la presencia del grupo formilo; finalmente, se observa la señal de éter debida al grupo metoxilo entre 1,114-1,088 cm⁻¹ (Espectros 21.1, 22.1, 23.1, 24.1, 25.1 y 26.1).

De las señales debidas a la RMN de protón, lo que es importante destacar es la aparición de una señal singulete entre 4.12-3.97 ppm que corresponde al nuevo sustituyente que se introdujo, el grupo metoxilo. (Tabla 71 y 71.1; Espectros 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2 y 26.2). El resto de las señales ya han sido descritas a lo largo del presente análisis, por lo cual se considera innecesaria su repetición. Finalmente, con respecto a la RMN de carbono 13, únicamente mencionaremos al nuevo sustituyente que se introdujo en el esteroide, el carbono del sustituyente metoxilado que aparece en un rango de 62.12-62.47 ppm (Tabla 72 y 72.1; Espectros 21.3, 22.3, 23.3, 24.3, 25.3 y 26.3).



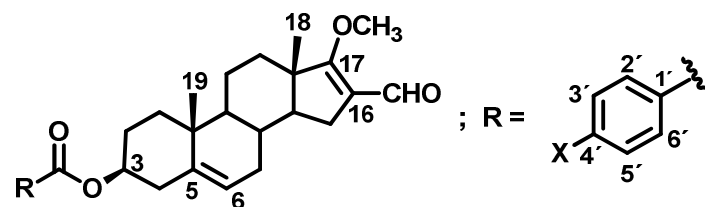
-R	H18	H19	H3	-OCH ₃	H6	Ha	Hb	H-FORMILO
δ(ppm)								
H	1.07	1.01	4.86	4.12	5.44	8.02	7.42	10.10
F	0.93	0.85	4.64	3.97	5.26	7.86	6.93	9.82
Cl	1.09	1.00	4.84	4.12	5.44	7.96	7.40	10.10
Br	1.09	1.00	4.84	4.12	5.44	7.89	7.56	10.09
I	1.09	1.00	4.83	4.12	5.44	7.79	7.73	10.09
H ₃ C	1.09	1.00	4.83	4.12	5.44	7.92	7.22	10.09

Tabla 70. Desplazamiento de los protones correspondientes a la ¹H-RMN de los benzoatos de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3β-ilo. Espectros 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2 y 26.2. Espectro 21.2: Hc, δ = 7.54 ppm. Espectro 26.2: H(Ar-CH₃), δ = 2.40 ppm.



-R	C18	C19	C3	C5	C6	C16	C17
$\delta(\text{ppm})$							
H-	19.44	15.13	74.48	139.9	116.31	122.44	181.10
F-	18.97	15.27	74.67	139.59	115.80	122.14	183.69
Cl-	19.42	15.73	74.83	139.84	116.31	122.57	182.13
Br-	19.41	15.72	74.84	139.81	116.28	122.57	183.17
I-	19.42	15.72	74.84	139.83	116.30	122.57	182.13
H ₃ C-	19.43	15.72	74.26	140.05	116.31	124.36	182.15

Tabla 71. Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ¹³C-RMN de los benzoatos de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 21.3, 22.3, 23.3, 24.3, 25.3 y 26.3. Espectro 18.3: Ar-CH₃, δ = 20.51 ppm.



-R	C1'	C4'	C2',C6'	C3',C5'	-OCH ₃	C=O FORMILO	C=O ÉSTER
$\delta(\text{ppm})$							
H	130.90	132.88	129.66	128.55	62.46	186.51	166.10
F	126.61	164.83	131.94 131.85	115.34 115.12	62.12	186.99	166.88
Cl	129.34	139.31	131.08	128.75	62.47	186.53	162.25
Br	129.77	127.97	131.74	131.22	62.47	186.54	165.37
I	130.37	100.63	137.76	131.15	62.47	186.52	165.67
H ₃ C	128.16	143.50	129.69	129.11	62.45	186.52	166.19

Tabla 71.1. Desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ¹³C-RMN de los benzoatos de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo. Espectros 21.3, 22.3, 23.3, 24.3, 25.3 y 26.3.

Finalmente, en cuanto a la espectrometría de masas de todos los nuevos compuestos sintetizados, se observa la señal de $M^{+1} + 1$ correspondiente y esperada para cada esteroide, de acuerdo a la metodología que se utilizó, que en este caso fue por bombardeo de átomos rápidos (FAB), cuyos valores pueden consultarse en las tablas correspondientes (Tablas 5-58). Otra señal importante, que se observa a lo largo de prácticamente todas las series de compuestos sintetizados, y que presentan un anillo aromático en su estructura, es la señal de m/z 91, debida a la presencia del ión tropilio (Espectros 1.4, 2.4, 3.4, 4.4, 5.4, 6.4, 7.4 y 7.4.1, 8.4 y 8.4.1, 9.4 y 9.4.1, 10.4 y 10.4.1m 11.4 y 11.4.1, 12.4, 13.4, 14.4, 15.4, 16.4, 17.4, 18.4, 19.4, 20.4, 21.4, 22.4 y 22.4.1, 23.4 y 23.4.1, 24.4 y 24.4.1, 25.4 y 25.4.1, 26.4 y 26.4.1. Finalmente, para el derivado **20** se observa la pérdida de agua ($M^{+1} + 1 - 18$) característica de la presencia de un grupo alcohol (Espectro 20.4).

10.2. Resultados de la Parte Biológica

La concentración óptima de proteína 5AR-1 a la que se observó la máxima actividad enzimática fue de 60 $\mu\text{g/mL}$, es por eso que se utilizó esta concentración de proteína a lo largo de todos los ensayos biológicos.

Los datos cinéticos que se obtuvieron a partir del comportamiento de la enzima 5AR-1 indicaron que la V_{max} fue de 1.11 nmol/mL/h a $\text{pH} = 7.5$ con una K_m de 27.6, valores que se utilizaron para realizar los experimentos con los nuevos esteroides. Este resultado correlaciona bien con los datos reportados previamente para esta enzima⁶⁰ y se corroboró por el valor de la eficiencia de la reacción a este pH . Por otro lado, previamente se había reportado⁶¹ que se han observado diferentes actividades de la enzima cuando se varía el rango de pH de trabajo; este hecho se atribuye a los diferentes cambios electrostáticos que sufren las moléculas involucradas en la reacción⁶². Esto puede estar en concordancia con la variación en la actividad de la 5AR-1 observada en este estudio.

Basados en los resultados descritos con anterioridad, el efecto de los nuevos esteroides **1-12** descritos en este estudio como inhibidores de la enzima 5α -reductasa tipo 1, podrían presentar un potencial terapéutico para la prevención y/o tratamiento del cáncer de próstata, o para padecimientos asociados a la actividad de esta enzima, como son la calvicie y el acné androgénicos así como el hirsutismo femenino; ya que inhiben específicamente la actividad de esta enzima, a excepción de los derivados **1** y **2** que también inhibieron a la 5AR-2. Estos compuestos también tienen la ventaja de que no unen al RA, con lo que se disminuyen en gran medida los posibles efectos adversos que pudieran generar además de que mejoran su potencial terapéutico, por su alto grado de especificidad.

Por otro lado, los derivados **1** y **2**, al mostrar actividad inhibitoria hacia ambas isoformas, además de no unir al RA, son candidatos para la prevención y tratamiento de la HPB, ya que este tipo de entidades son las que se buscan para el tratamiento de este padecimiento^{36.1}.

En cuanto a la relación estructura-actividad existente entre la serie de compuestos sintetizados y que mostraron actividad inhibitoria contra la 5AR, observamos que lo que tienen en común es el grupo funcional éster con o sustituyentes en el anillo aromático, y que al parecer es el que está promoviendo los resultados obtenidos, y que, en términos generales, los sustituyentes en la posición *para*- al ser grupos isómeros, poseen la misma capacidad de promover la actividad observada.

Los resultados de estos experimentos también mostraron que el esteroide **2**, que presenta un átomo de flúor en el anillo aromático del grupo éster, mostró una mayor actividad inhibitoria hacia la 5AR-2 comparado con el derivado **1**, el cual carece del átomo de halógeno en la posición *para*-; aparentemente la electronegatividad mayor del compuesto **2** debida al átomo de flúor, aumenta la afinidad de unión por esta enzima. Por otro lado, los ensayos *in vivo* mostraron que los compuestos **1**, **2** y **5** disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) el peso de la próstata y las vesículas seminales de los hámsteres castrados y tratados con T, sin embargo, no inhibieron a la 5AR-2 (ensayo *in vitro*). Esto puede ser debido a la posible presencia de una estearasa en el tejido prostático así como en las vesículas seminales que pudiera estar hidrolizando al grupo éster y produciendo el alcohol libre responsable del efecto que se observó en estos ensayos *in vivo* observados en estas glándulas.

Los ensayos *in vivo* también mostraron que tanto la finasterida así como los nuevos esteroides disminuyeron el tamaño del diámetro de la mancha del órgano del flanco de los hámsteres, lo cual confirma la presencia de 5 α -reductasa tipo 1 en este tejido.

Se planean futuros estudios de esta serie de compuestos en líneas cancerosas LNCaP, DU-145 y PC-3, las cuales exhiben actividad de 5 α -reductasa tipo 1, por lo que se utilizan como modelo en el estudio del cáncer de próstata.

En cuanto a los derivados con el anillo de benzimidazol (**13-18**), que como se recordará, no fue posible determinarles su actividad inhibitoria, tanto *in vitro* como *in vivo*, así como su capacidad de unión al RA; se piensa que lo voluminoso de la molécula es lo que imposibilitó la solubilidad de estos compuestos, por lo que en un futuro diseño de nuevos derivados sería recomendable evitar sustituyentes tan voluminosos.

Finalmente, quedan pendientes las pruebas biológicas de los compuestos sintetizados en la segunda ruta sintética, que por razones de tiempo, no fue posible concretar.

XI CONCLUSIONES

- **S**e sintetizaron veintiséis nuevos compuestos derivados de la deshidroepiandrosterona como posibles entidades para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y/o el cáncer de próstata.
 - Todos los nuevos compuestos se caracterizaron por diferentes métodos espectroscópicos (IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y espectrometría de masas) además de que se les determinó su punto de fusión.
 - De los veintiséis compuestos mencionados, catorce corresponden a intermediarios dentro de las rutas de síntesis propuestas y doce a compuestos finales.
 - De los resultados de las pruebas biológicas realizadas a la primer serie de compuestos propuesta, así como de los intermediarios correspondientes, podemos decir que:
-

- Los derivados **3-12**, descritos en este estudio como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa tipo 1, podrían presentar un potencial terapéutico para la prevención y/o tratamiento del cáncer de próstata, o para padecimientos asociados a la actividad de esta enzima, como son la calvicie y el acné androgénicos así como el hirsutismo femenino; ya que inhiben específicamente la actividad de esta enzima.
- Los derivados **1 y 2**, al mostrar actividad inhibitoria hacia ambas isoformas, además de no unir al receptor androgénico, son candidatos para la prevención y tratamiento de la hiperplasia prostática benigna, ya que este tipo de entidades son las que se buscan para el tratamiento de este padecimiento.
- En cuanto a la relación estructura-actividad existente entre la serie de compuestos sintetizados y que mostraron actividad inhibitoria contra la enzima 5 α -reductasa, al parecer, el tener en común el grupo funcional éster, así como un sustituyente poco voluminoso en C17, es lo que está promoviendo la actividad observada.

XII PERSPECTIVAS

- **C**oncluir con las pruebas biológicas de los nuevos benzoatos de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo derivados de la deshidroepiandrosterona.
 - Realizar estudios de esta serie de compuestos en líneas celulares cancerosas LNCaP, DU-145 y PC-3, las cuales se utilizan como modelo en el estudio del cáncer de próstata, ya que exhiben actividad de 5 α -reductasa tipo 1.
-

XIII REFERENCIAS

1. Schmidt, L.J. and Tindall, DJ. (2011) *Journal of Steroid & Molecular Biology* **125**, 32-38.
 - 1.1 López, A.K. (2011) Tesis de Maestría: Síntesis, actividad citotóxica y relación estructura-actividad de derivados de 2-[(1-azacicloalquil)alquilamino]-9-anilino-tiazolo[5,4-b]quinolina. UNAM. Facultad de Química. Asesor: Dr. Alfonso Lira Rocha.
 2. Iehlé, C., Radvanyi, F., Giel Diez de Medina, S., Ouafik, L., Féraud, H., Chopin, D., Raynaud, J-P. and Martin, P-M. (1999) *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **68**, 189-195.
 3. <http://www.msd.com.mx/msdmexico/patients/prostata/tedifu01.html>
 4. Rosario, J.D. and Bryant, R. (2002) *Urology. Surgery*. The Medicine Publishing Company, Ltd.
 5. Vasaitis, T.S., Bruno, R.D. and Njar, V.C.O. (2011) *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **125**, 23-31.
 6. Hernández-Luis, F. (2011) *Apuntes de la materia de Química Farmacéutica*. Carrera de Q.F.B. Facultad de Química, UNAM.
 7. Tammela, T. (2004) *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **92**, 287-295.
 8. Cáncer de próstata sólo reporta síntomas en estado avanzado. El Universal, por Giuliana Chiappe, entrevista al Dr. Elías Mora Kumboz. Jueves 30 de junio de 2011.
 9. Mo, Q., Lu, S. and Simon, N.G. (2006) *Journal of Steroid Biochemistry & Biology* **99**, 50-58.
-

10. Handratta, V.D., Vasaitis, T.S., Njar, V.C.O., Gediya, L.K. Kataria, R., Chopra, P., Newman, D. Jr., Farquhar, R., Guo, Z., Qiu, Y., and Brodie, A.M.H. (2005) *Journal of Medicinal Chemistry* **48**, 2972-2984.
11. Long, B.J., Grigoryev, Nnane, I.P., Liu, Y.Z. and Brodie, A.M. (2000) *Cancer Research* **60**, 6630-6640.
12. Nicolaou, K.C., Pfefferkrn, J.A., Roecker, Cao, G.Q., Barluenga, S. and Mitchel, H.J. (2000) *Journal of the American Chemical Society* **122**, 9939-9953.
13. Marwah, P., Marwah, A., Lardy, H.A., Miyamoto, H., y Chang, Ch. (2006) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14**, 5933-5947.
14. Arellano, Y., Bratoeff, E., Garrido, M., Soriano, J., Heuze and Cabeza, M. (2011) *Steroids* **76**, 1241-1246.
15. Agur, M.R., Dalley, F. (2007) *Atlas de Anatomía*. Editorial Médica Panamericana. 11ª edición. Madrid.
16. Randall, V.A. (1994) *Baillieres Clinical Endocrinology Metabolism* **8**, 405-431.
17. Zalles, M. y Carvajal, E. (2006) *Revista Paceyña de Medicina Familiar* **3(4)**, 74-77.
18. Sitteri, P.K., Wilson, J.D. and Mayfield, J.A. (1970) *The Journal of Clinical Investigation* **49**, 1737-1745.
19. MacNaughton, M. and Barry, M.J. (1997) *Journal of General Internal Medicine* **12**, 224-229.
20. Wilson, J.D. (1980) *American Journal of Medicine* **68**, 745-756.
21. Smith, R.A., Wake, T., y Soloway, M.S. (1988) *Postgraduate Medical Journal* **83**, 79-81.
22. Moss, M.L., Kuzmic, P., Stuart, J.D., Tian, G., Peranteau, A.G., Frye, S.V., Kadwell, S.H., Kost, T.A., Overton, L.K., y Patel, I.R. (1996) *Biochemistry* **35**, 3457-3464.
23. Bruchowsky, N. y Wilson, J.D. (1968) *The Journal of Biological Chemistry* **243**, 2012-2021.
24. Anderson, K.M., and Liao, S., (1986) *Nature* **219**, 277-279.
25. Kumar, N., Didolkar, A.K., Monder, C., Bardin, W.C., y Sundaram, K. (1992). *Endocrinology* **130** (5), 3677-3683.
26. Fang, S., Anderson, K.M., y Liao, S. (1969) *The Journal of Biological Chemistry* **244**, 6584-6595.
27. Anderson, S.; Bishop, R.W. and Russell, D.W. (1989) *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 16249-16255.
28. Anderson S. and Russell, D.W. (1990) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* **87**, 3640-3644.
29. Jenkins, E.P., Anderson, S., Imperato-McGinley, J., Wilson, J.D., and Russell S.W. (1992) *The Journal of Clinical Investigation* **89**, 293-300.

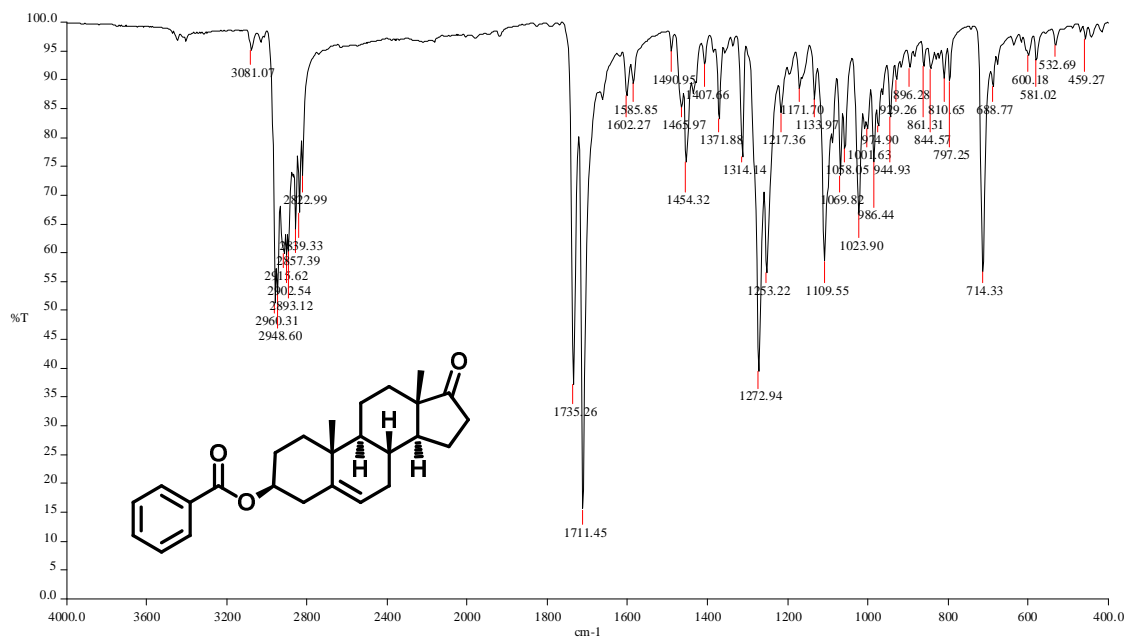
30. Kniwald, J., Osredecki, V., Gojmerac, T., Zechner, V. and Kniwald, Z. (1995) *Journal of Applied Toxicology* **15**, 215-218.
31. Azzouni, F, Godoy, A., Li, Y. and Mohler, J. (2011) *Advances in Urology* **2012**, 1-18.
32. Thigpen, A.E., Silver, T.I., Guileyardo, J.M., Casey, M.L., McConnell, J.D., y Russell, D.W. (1993) *The Journal of Clinical Investigation* **92**, 903-910.
33. Kenny, B., Ballard, S., Blagg, J. and Fox, D. (1997) *Journal of Medicinal Chemistry* **40(9)**, 1293-1315.
34. Cabeza, S.M., Bratoeff, E., Ramírez, L.E. y Flores, O.E. (2004). *Mecanismo de acción de antiandrógenos esteroideos*. Serie Académicos CBS. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México.
- 34.1 Li, X., Chen, C., Singh, S.M. and Fernand Labire.(1995). *Steroids* **60**, 430-441.
35. Brooks, J.R., Harries, G.S., Sandler, M., and Smither, H.J. (1994). *Design of enzyme inhibition as drugs*. Oxford University Press.
36. Weisser, H., Tunn, S., Debus, M. and Krieg, M. (1994) *Steroids* **59**, 616-620.
- 36.1 Gaochao, T, y Curt D. H.¶*The Journal of Biological Chemistry* (2001) **276(24)**, 21359–21364.
- 37.[http://www.news-medical.net/health/Finasteride-Side-Effects-Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Finasteride-Side-Effects-Spanish).aspx)
38. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a603001-es.html#side-effects>
39. <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>
40. Swallow, T. and Kirby, R.S. (2008) *Surgery (Medicine Publishing)***26(5)**, 213-217.
41. Programa de Acción: Cáncer de próstata. Secretaría de Salud (2001) bibliotecas.salud.gob.mx
42. Aumentan 30% en dos años casos de cáncer de próstata en la ciudad, por Héctor Cruz López. Martes 31 de mayo de 2011. Crónica.com.mx. http://www.cronica.com.mx/nota.php?id_notas=582044
43. Chávez, R.A. (2012) Tesis de Maestría: *Síntesis y evaluación biológica de nuevos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa basados en el esqueleto del pregnano con un grupo éster en C-3*. UNAM. Facultad de Química. Asesor: Dr. Eugene Bratoeff.
44. Njar, V.C.O. and Brodie, A.M.H. (1999) *Current Pharmaceutical Design* **5(3)**, 163-80.
45. Hahner, S. and Allolio, B. (2010) *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **39**, 127-139.
46. Venkatesh, D.H., Tadas, V.S., Njar, R.C.O., Gediya, L.K., Kataria, R., Chopra, P., Newmna, Jr., D., Farquhar, R., Guo, Z., Qiu, Y. and Brodie, A.M.H. (2005) *Journal of Medicinal Chemistry* **48**, 2972-2984.

47. Aggarwal, S., Thareja, S., Raj Bhardwaj, T y Kumar, M. (2010) *Steroids* **75**, 411-418.
48. Cabeza, M, Bratoeff, E., Ramírez, E., Heuze, I., Recillas, S., Berrios, H., Cruz, A., Cabrera, O. y Pérez, V. (2008) *Steroids* **73**, 838-843.
49. Dhingra, N., Bhardwaj, T.R., Mehta, N., Mukhopadhyay, T., Kumar, A. and Kumar, M. (2011) *Arch Pharm Res* **34**(7), 1055-1063.
- 49a. Liu, X-K, Ye, B-J, Wu, Y, Nan J-X, Lin, Z-H and Piao, H-R. (2012), *Chemical Biology & Drug Design* **79** (4), 523-529.
- 49b. Patente: Seong, S-Ch, Lee, M-Ch, Jo, H-Ch, Park, J-S and Jeong, M-Y. United States Patent Application Publication. Pub. No.: US 2004/0038950 A1. Pub. Date: Feb. 26, 2004.
50. Gogoi, Junali, Bezbaruah,Pranjal, Saikia,Pallabi, Goswami, Jonalee, Gogoi, Pranjal and Boruah, Romesh Chandra. (2012) *Tetrahedron Letters* **53**, 1497-1500.
- 50a. Moreira, Vania M.A., Salvador, Jorge A.R, Matos, Beja A. and Paixao, Jose A. (2011) *Steroids* **76**, 582-587.
- 50b. Ramos Silva,M., Moreira, V.M., Cardoso, C., Matos, Beja A. and Salvador, J.A.R. (2008) *Acta Crystallographica, Section C: Crystal Structure Communications* **C64**(9), o529-o531.
- 50c. Moreira, Vania M.A., Vasaitis, Tadas S., Njar, Vincent C.O. and Salvador, Jorge A.R. (2007) *Steroids* **72**, 939-948.
- 50d. Venkatesh, D. Handratta, Danijela, Jelovac, Brian, J. Long, Ritesh, Kataria, Ivo P. Nnanel,Vincent C.O. Njar and Angela M.H. Brodie. (2004) *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **92**, 155-165.
- 50e. Dalmaris, John; Hanson, James R.; Hitchcock, Peter B.; Kiran, Ismail. (2003) *Journal of Chemical Research, Synopses* **3**, 150-152.
- 50f. Boruah, Romesh C.; Ahmed, Shahadat; Sharma, Utpal; Sandhu, Jagir S. (1999) *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* **38**, 274-282.
- 50g. Njar, Vincent C. O.; Kato, Katsuya; Nnane, Ivo P.; Grigoryev, Dmitry N.; Long, Brian J.; Brodie, Angela M. H. (1998) *Journal of Medicinal Chemistry* **41**(6), 902-912.
- 50h. Sciaky, Roberto and Pallini, Ugo. (1966) *Gazzetta Chimica Italiana* **96**(10), 1241-53.
- 50i. Patente: BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.; CHU, Daniel; WANG, Bing; YE, Tao; WO2012/83112; (2012).
- Patente: NJAR, Vincent, BRODIE, Angela M.H. and GEDIYA, Lalji K. UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE; WO2009/120565 A2 (2009).
- Patente: NJAR, Vincent and BRODIE, Angela M.H. UNIVERSITY OF MARYLAND; WO2006/93993 (2006).
- Patente: Brodie, A., Njar, Vincent C.O. The University of Maryland, Baltimore, Baltimore, Md. United States Patent. Patent Number 5,994,335. Date of Patent: Nov. 30, 1999. US05994335A.

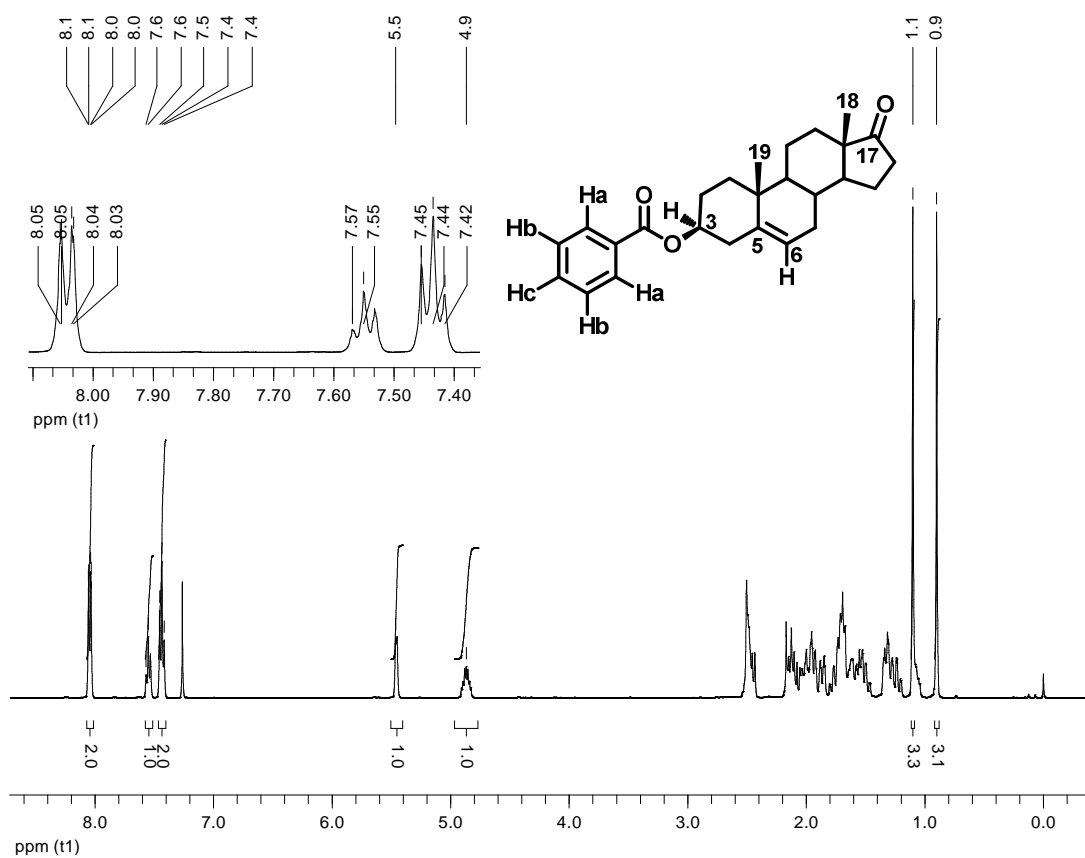
51. Njar, Vincent C.O., Klus, Gregory, T. and Brodie, Angela M.H. (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **6** (22), 2777-2782.
52. Hirosumi, J., Nakayama, O., Fagan, T., Sawada, K., Chida, N., Inami, M., Takahashi, S., Kojo, H., Notsu, Y. and Okuhura, M.J.A. (1995) *J. Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **52**, 357-363.
53. Bratoeff, E., Sainz, T., Cabeza, M., Heuza, I., Recillas, S., Pérez, V., Rodríguez, C., Segura, T., Gonzáles, J. and Ramírez, E. (2007) *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **107**, 48-56.
54. Bradford, M.M. (1976) *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
55. Levy, M.A., Brant, M. and Greway, A.T. (1990) *Biochemistry* **29**, 2808-2815.
56. Gaubert, C.M., Trembla, R.R. and Bubé, Y.Y. (1980) *Journal of Steroid Biochemistry* **13**, 931-937.
57. Davies, P., Thomas, P. and Griffiths, K. (1977) *Journal of Endocrinology* **74**, 393-404.
58. Hendry, P.W.J. and Danzo, B.J. (1985) *J. Steroid Biochemistry* **21**, 883-893.
59. Cabeza, M., Vilchis, F., Lemus, A.E., Díaz de León, L. and Pérez-Palacios, G. (1995) *Steroids* **60**, 630-635.
60. Lineweaver, H. and Burk, d. (1934) *Journal of the American Chemical Society* **54**, 658-666.
61. Weisser, H. and Krieg, M. (1977) *Steroids* **62**, 589-594.
62. Hechter, O., Mechaber, D., Zwick, a., Campfield, A.C., Eychenne, B., Baulieu, E.E. and Robel, P. (1983) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **224**, 49-68.
- 62.1 Thigpen, A.E., Silver, T.I., Guileyardo, J.M., Casey, M.L., McConnell, J.D., y Russell, D.W. (1993) *Journal of Clinical Investigation* **92**, 903-910.
63. Gormley, G.J. (1991) *Urology Clinical North American* **18**, 93-98.
64. Dadras, S.S., Cai, X., Abasolo, I. and Wang, A. (2001) *Gene Expression*. **9**, 183-194.
65. Goldenberg, L, So, a., Fleshner, N., Rendon, R. , Drachenberg, D. and Elhilali, M. (2009) *Cancer Urology Association Journal* **3**, S109-S114.
66. Navarrete, J.G. (2000) Tesis de Maestría: Síntesis y actividad biológica de 2-(trifluorometil)bencimidazoles. UNAM. Facultad de Química. Asesor: Dr. Rafael Castillo.
67. Pretsch, E., Bühlmann, P. and Affolter, C. (2000) *Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data*. Springer. Third Completely Revised and Enlarged English Edition. Corrected First Printing. Germany

ANEXO 1

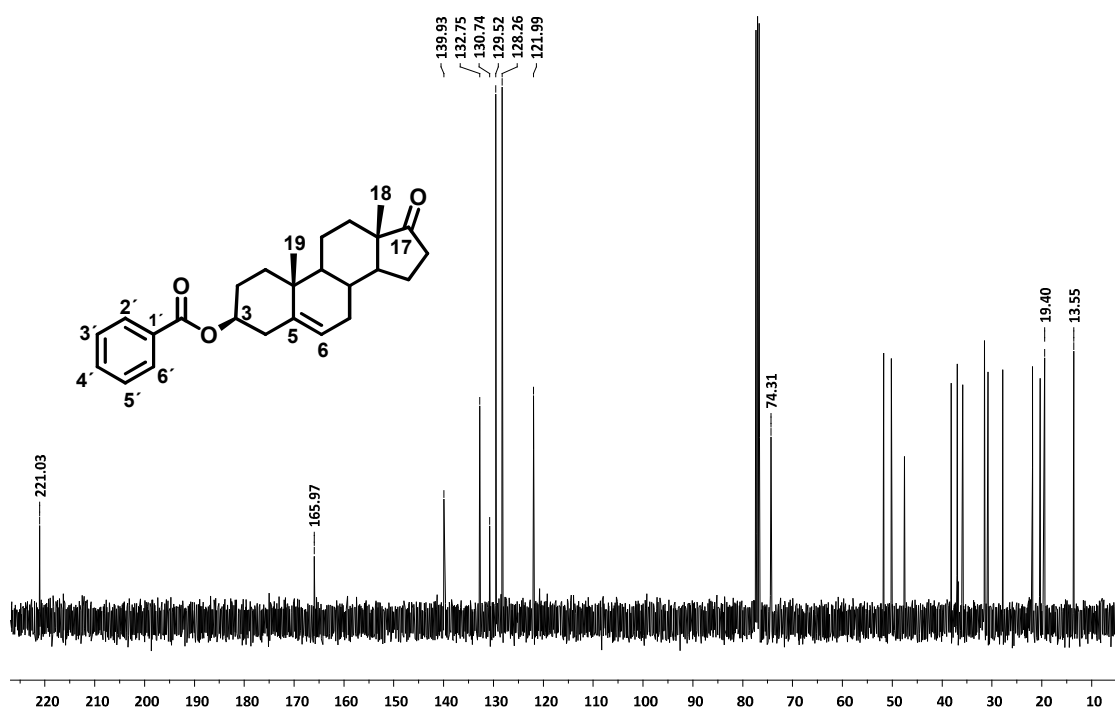
Espectros



Espectro 1.1
Espectros 1.1-1.4: Benzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo

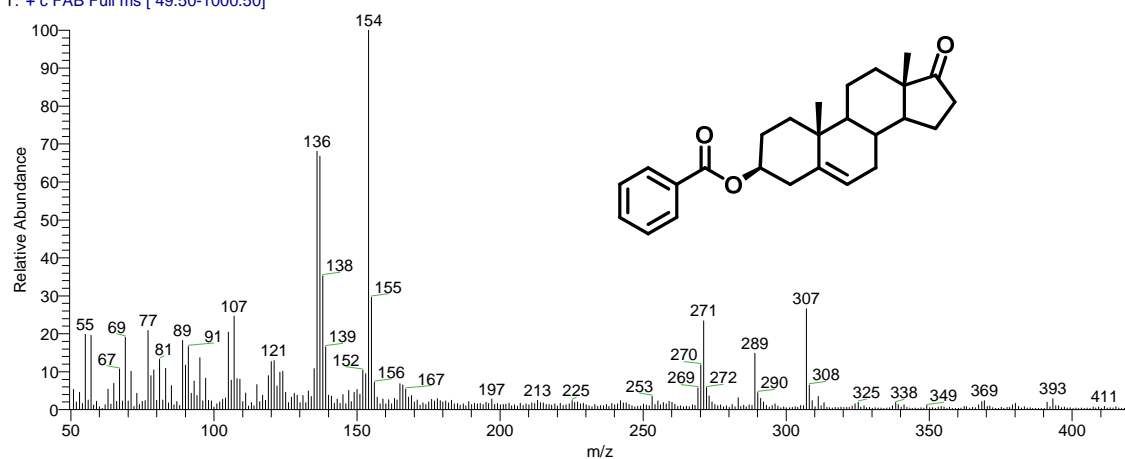


Espectro 1.2

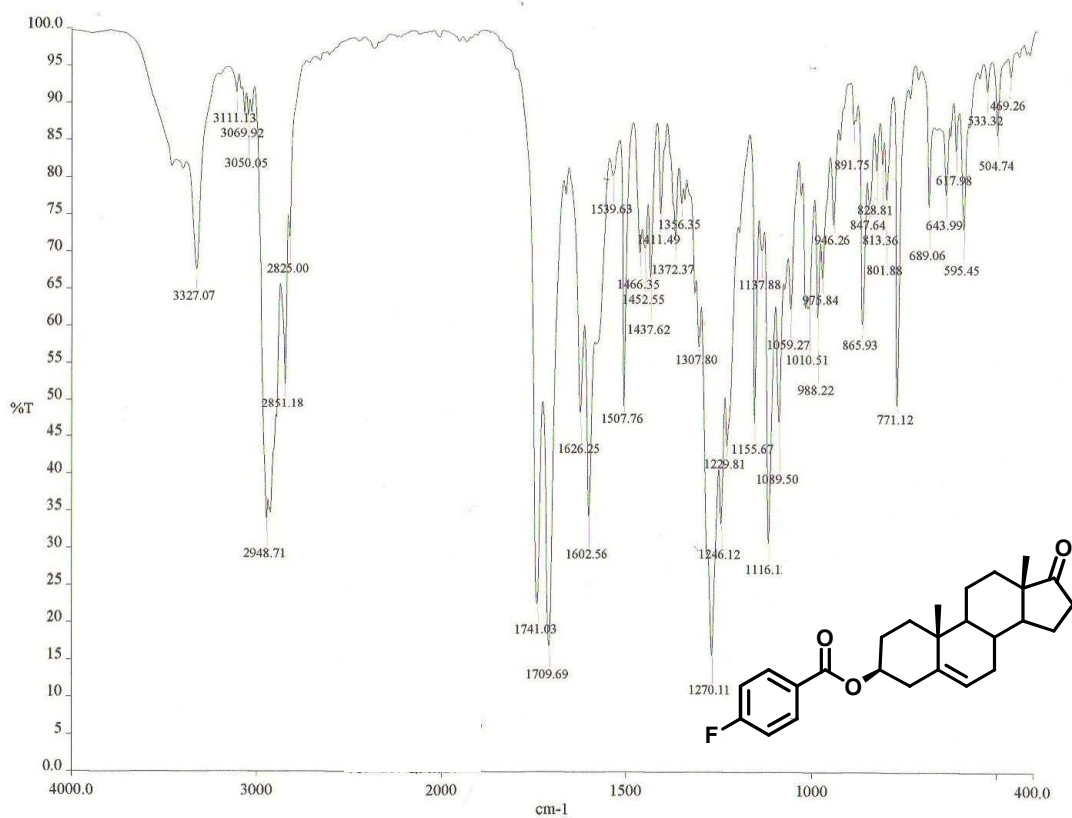


Espectro 1.3

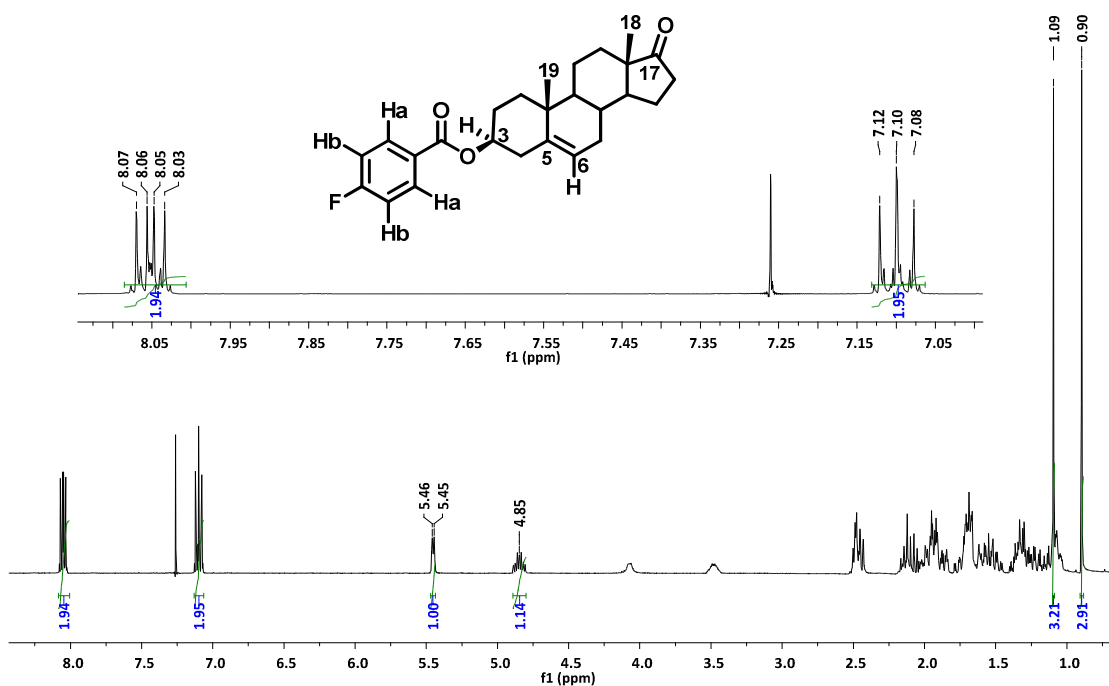
OT4045_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 9.41E5
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



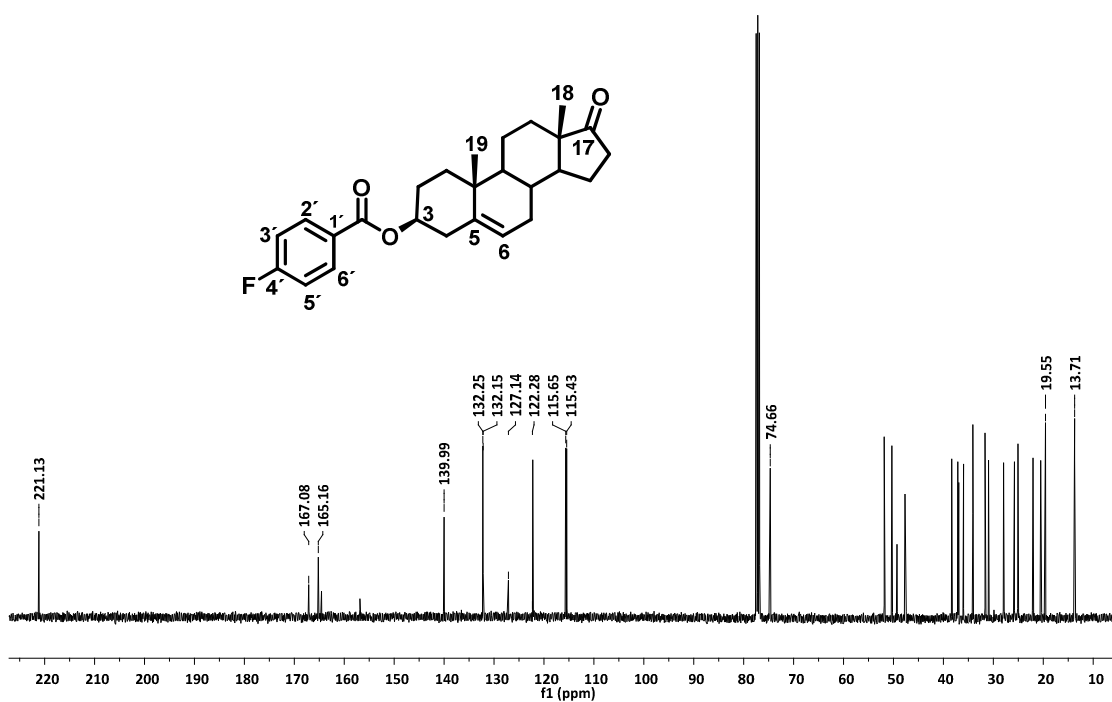
Espectro 1.4



Espectro 2.1
Espectros 2.1-2.4: *p*-Fluorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo

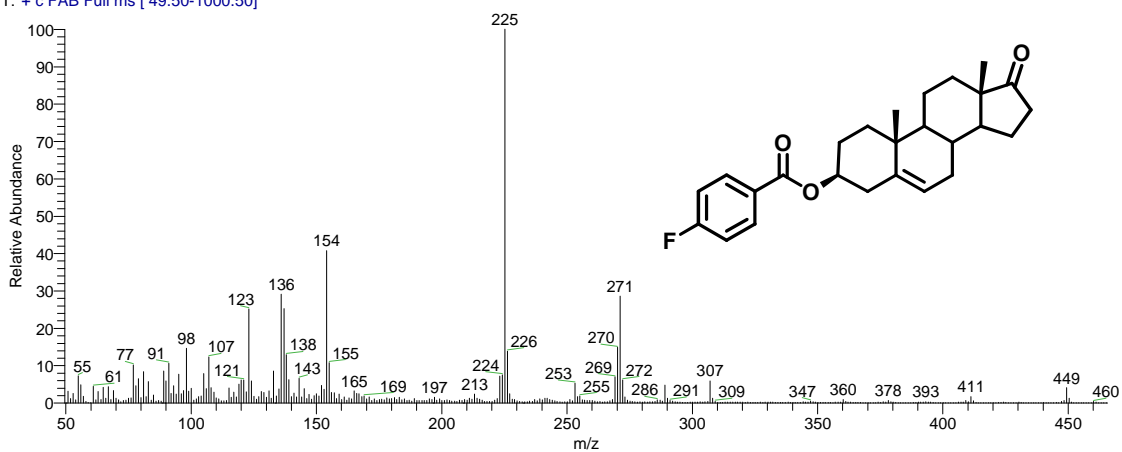


Espectro 2.2

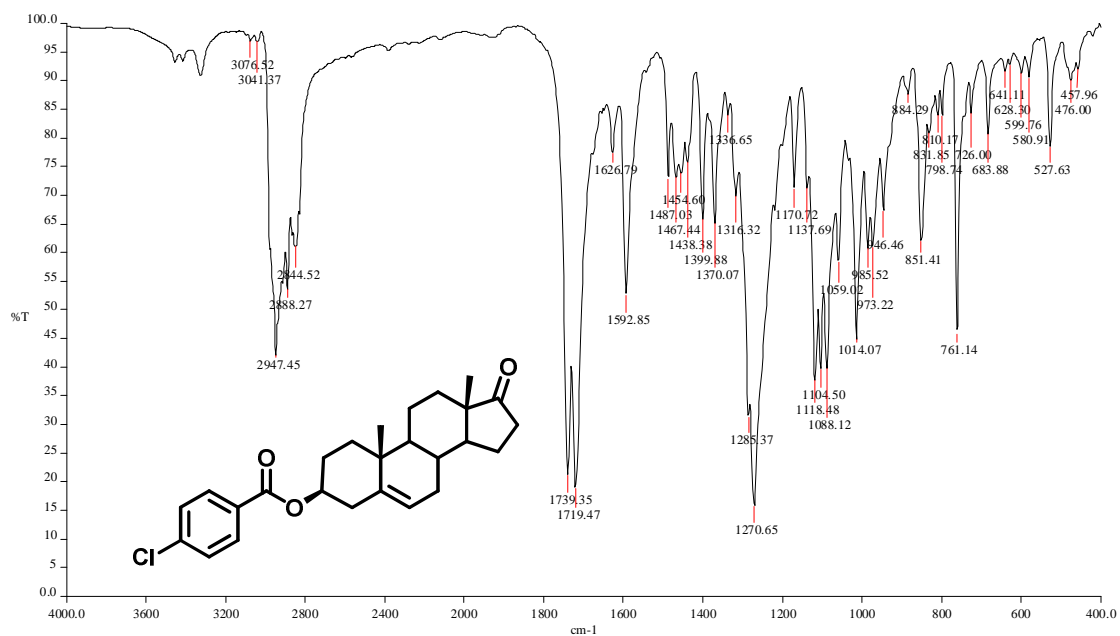


Espectro 2.3

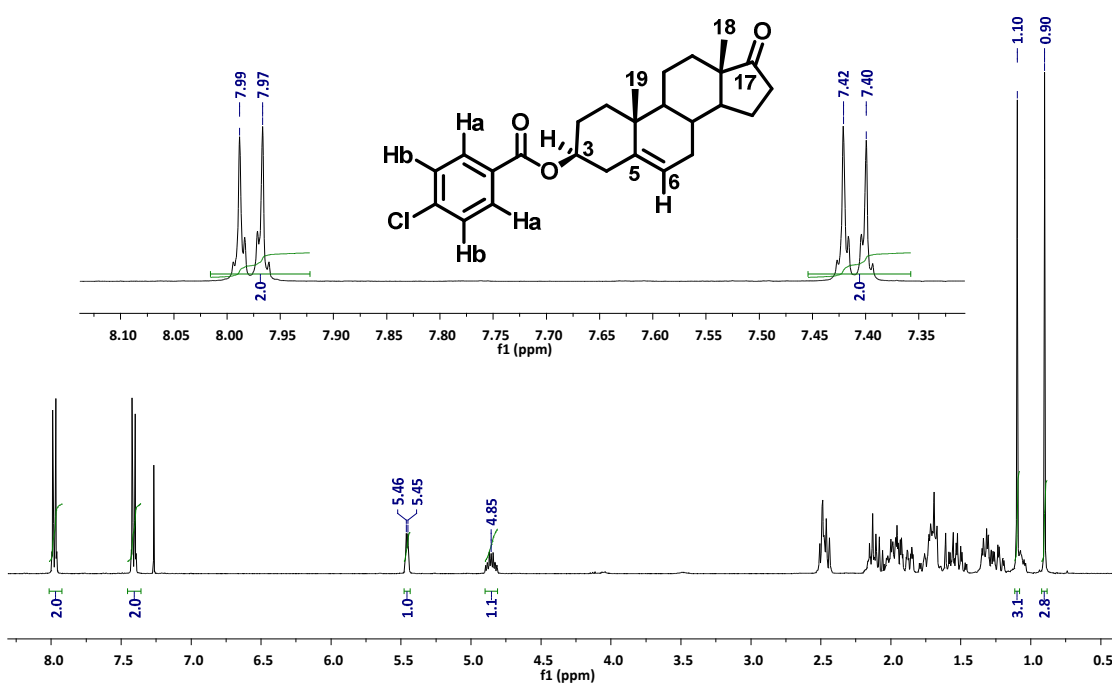
OT4122_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 3.18E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



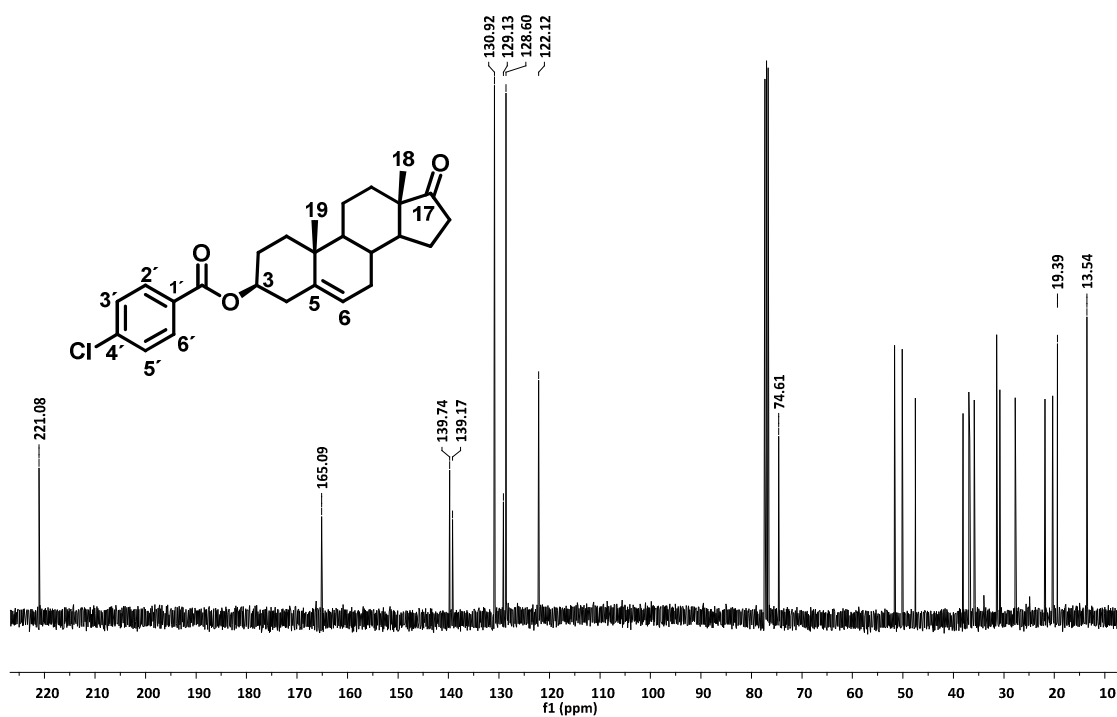
Espectro 2.4



Espectro 3.1
Espectros 3.1-3.4: *p*-Clorobenzoato de 17-oxoandrost-5-en-3β-ilo



Espectro 3.2



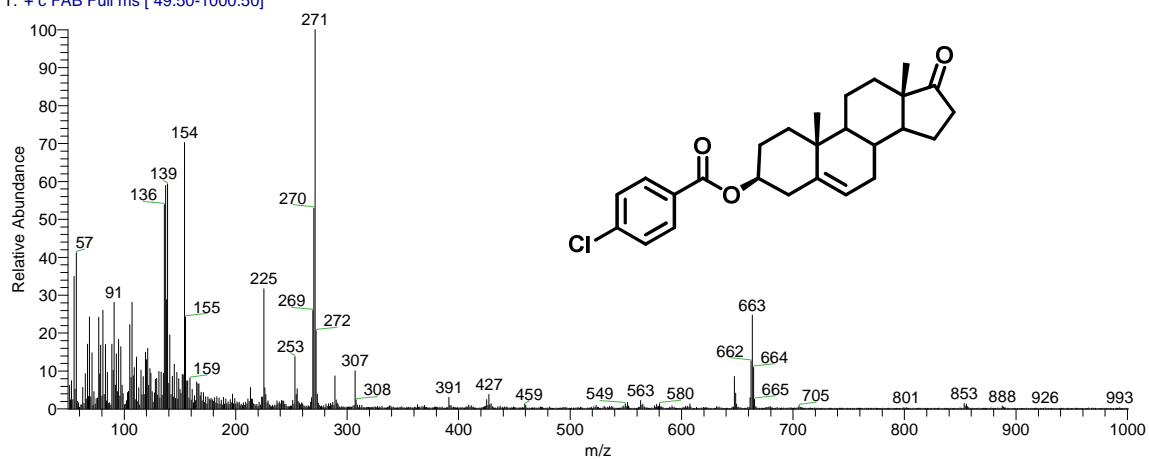
Espectro 3.3

D:\Xcalibur\data\USAINFABIOT4046_1

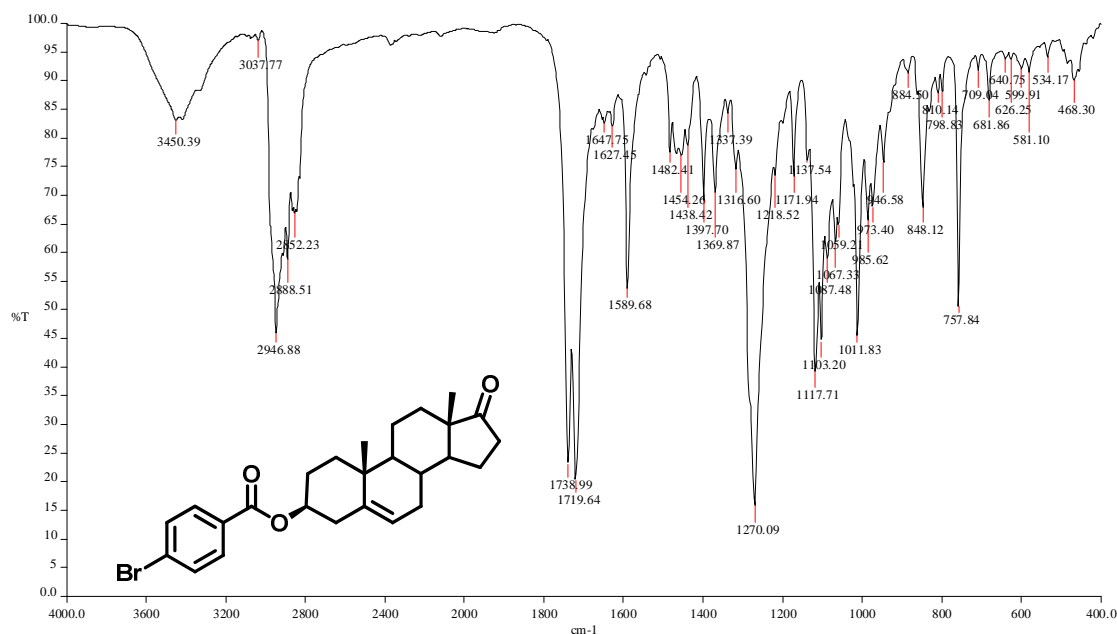
4/30/2010 8:33:13 PM

ESTER CL-BENZOICO

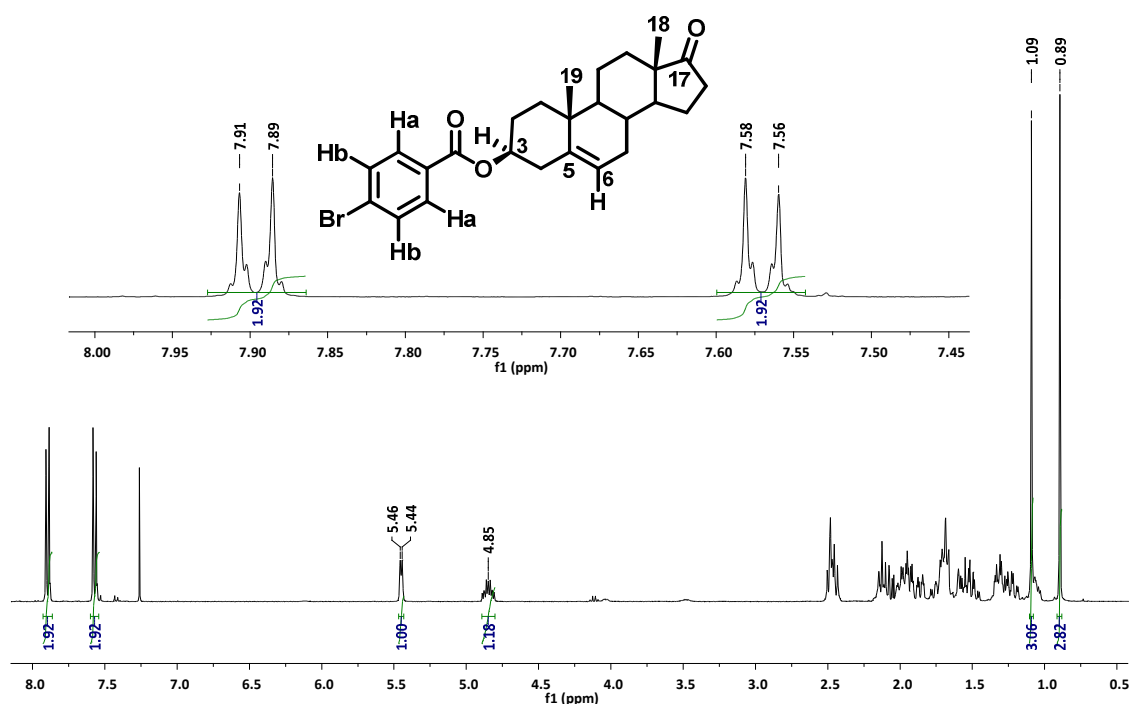
OT4046_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 6.28E5
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



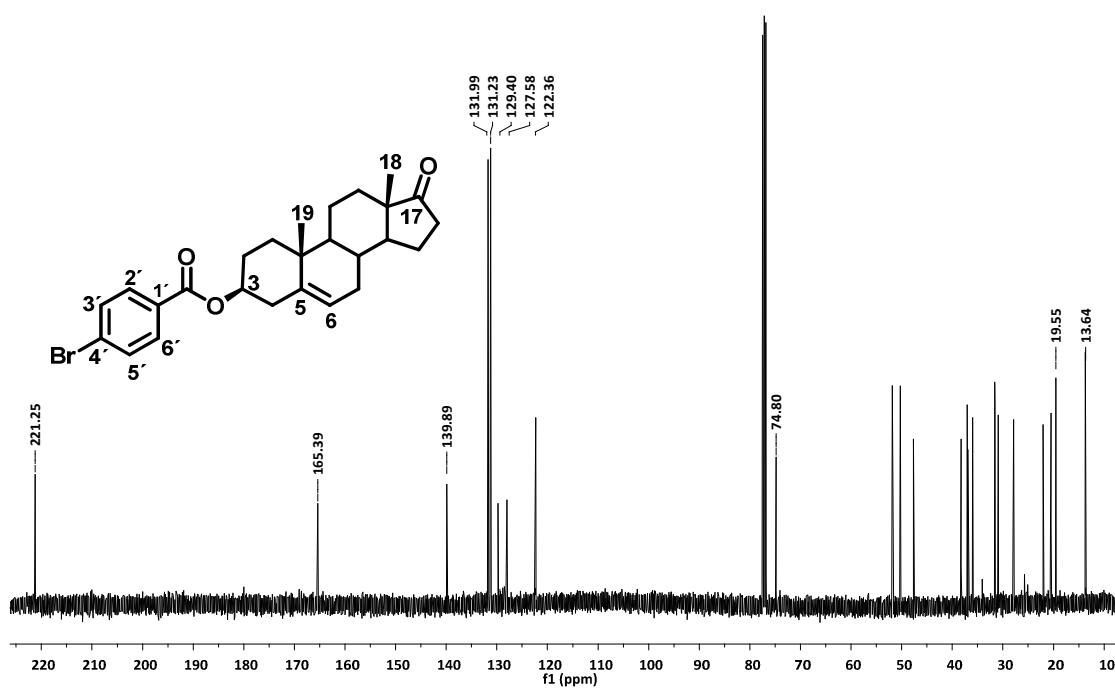
Espectro 3.4



Espectro 4.1
Espectros 4.1-4.4 *p*-Bromobenzoato de 17- oxoandroster-5-en-3β-ilo

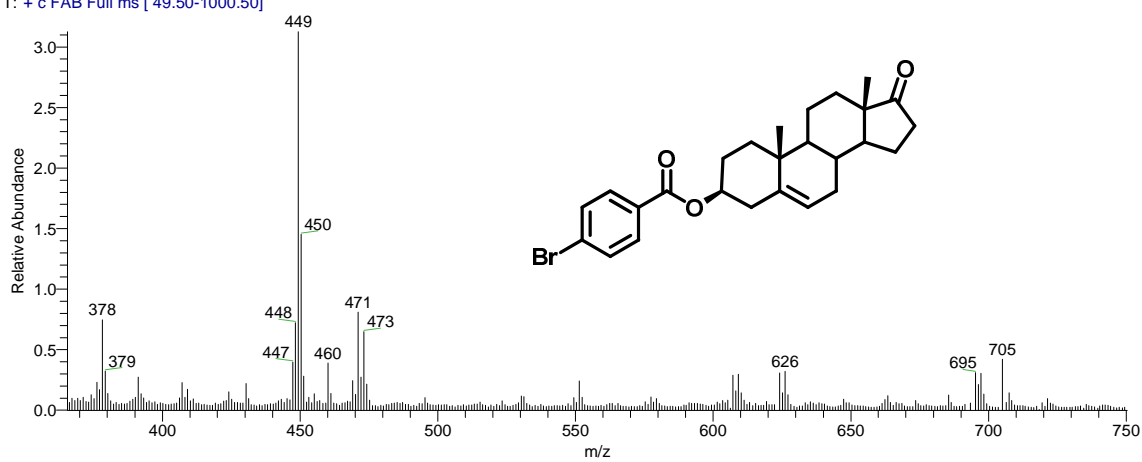


Espectro 4.2

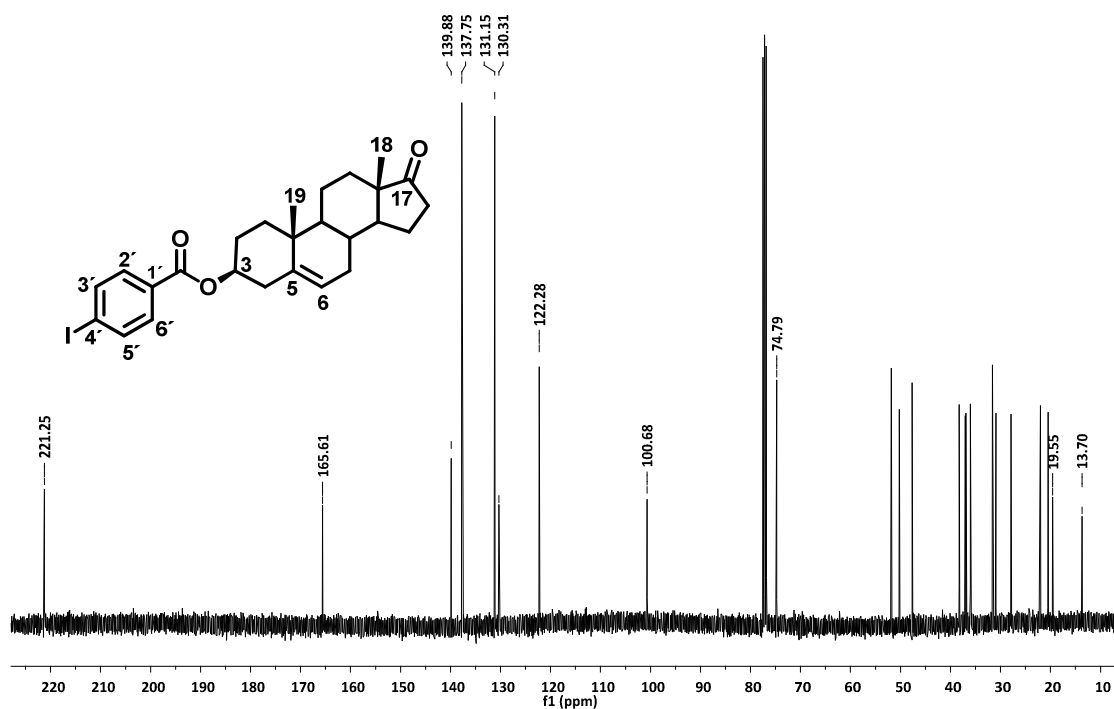


Espectro 4.3

OT4123_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 3.07E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



Espectro 4.4



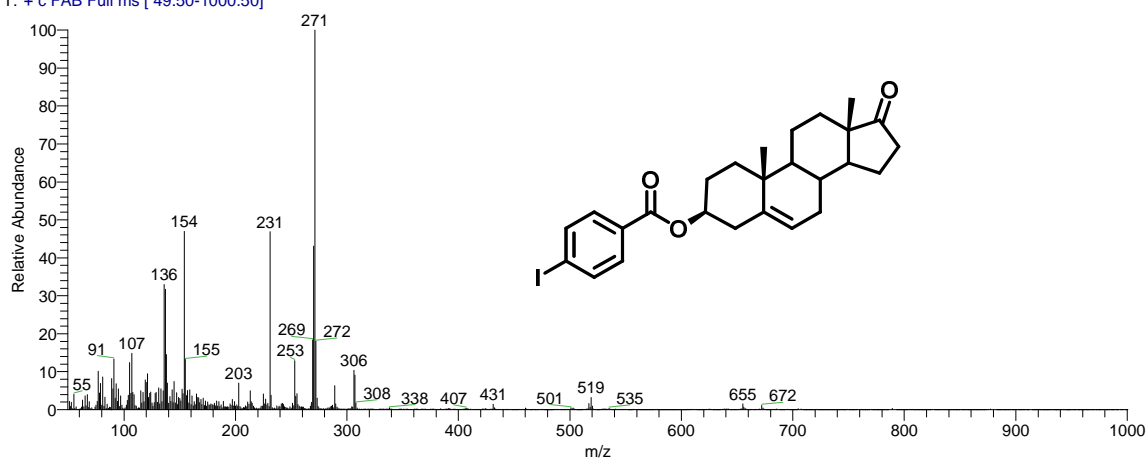
Espectro 5.3

D:\Xcalibur\data\USANFAB\OT4124_1

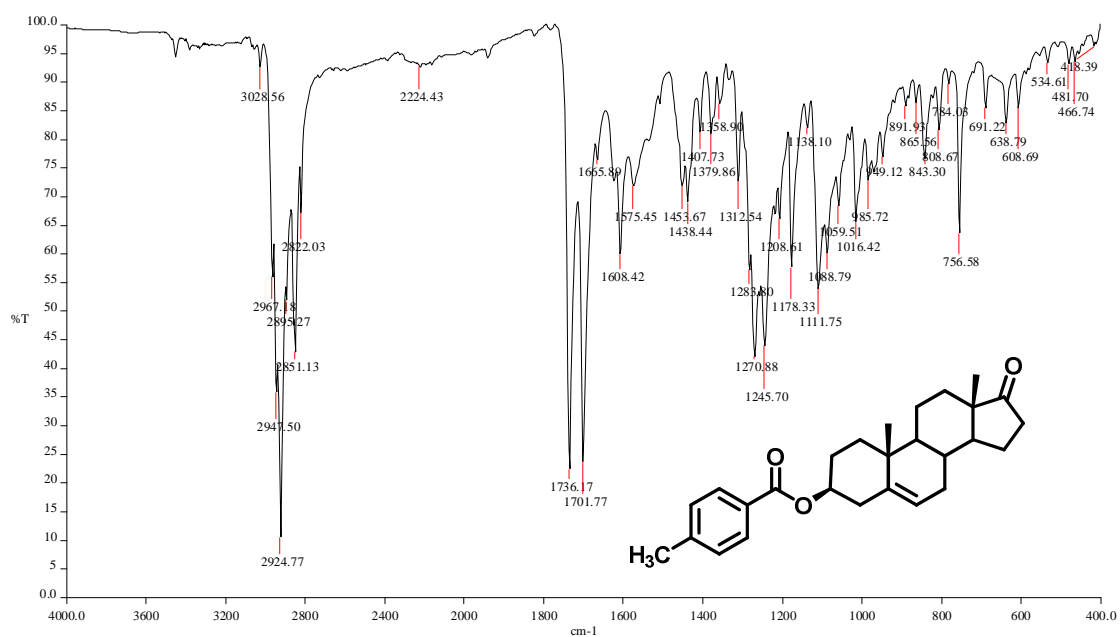
5/12/2010 2:50:15 PM

I-BNZOICO

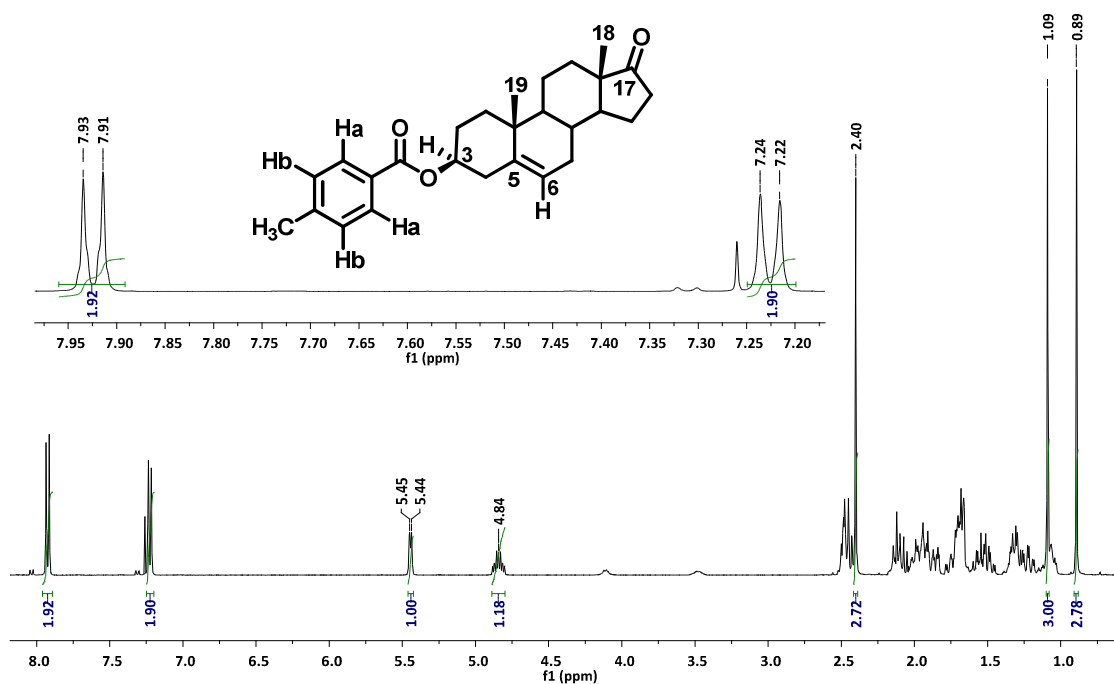
OT4124_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 3.49E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



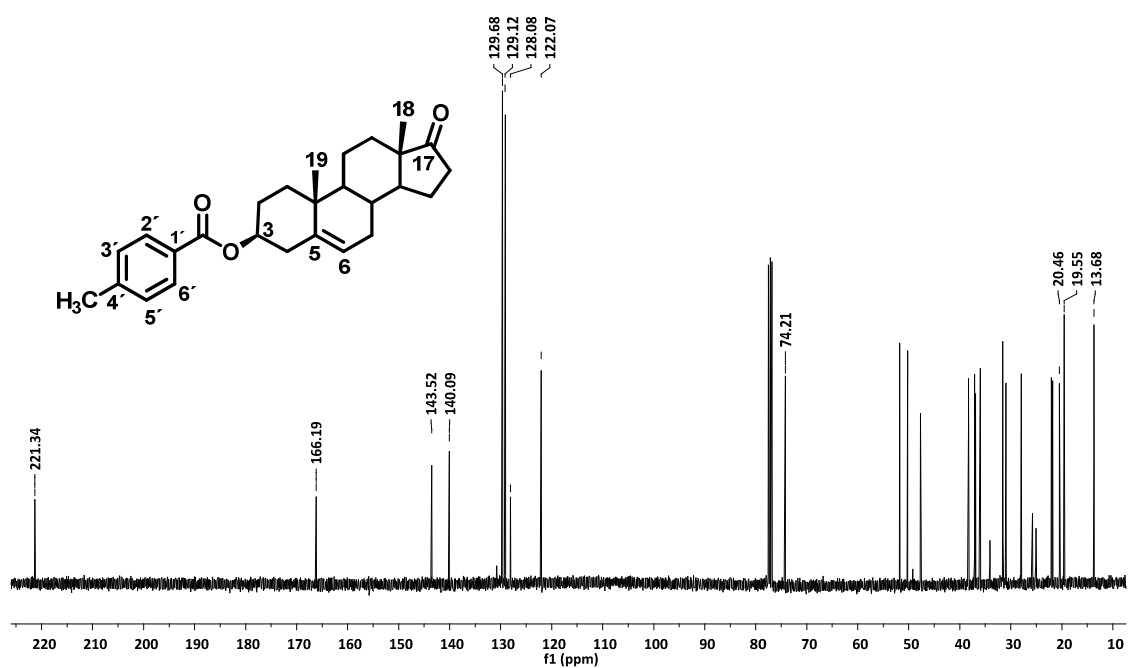
Espectro 5.4



Espectro 6.1
Espectros 6.1-6.4: *p*-Metilbenzoato de 17- oxoandrost-5-en-3β-ilo

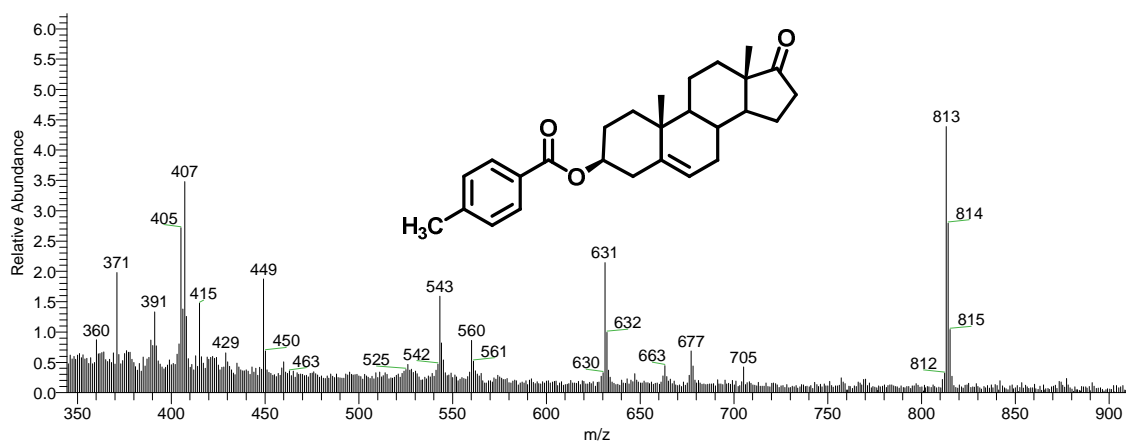


Espectro 6.2

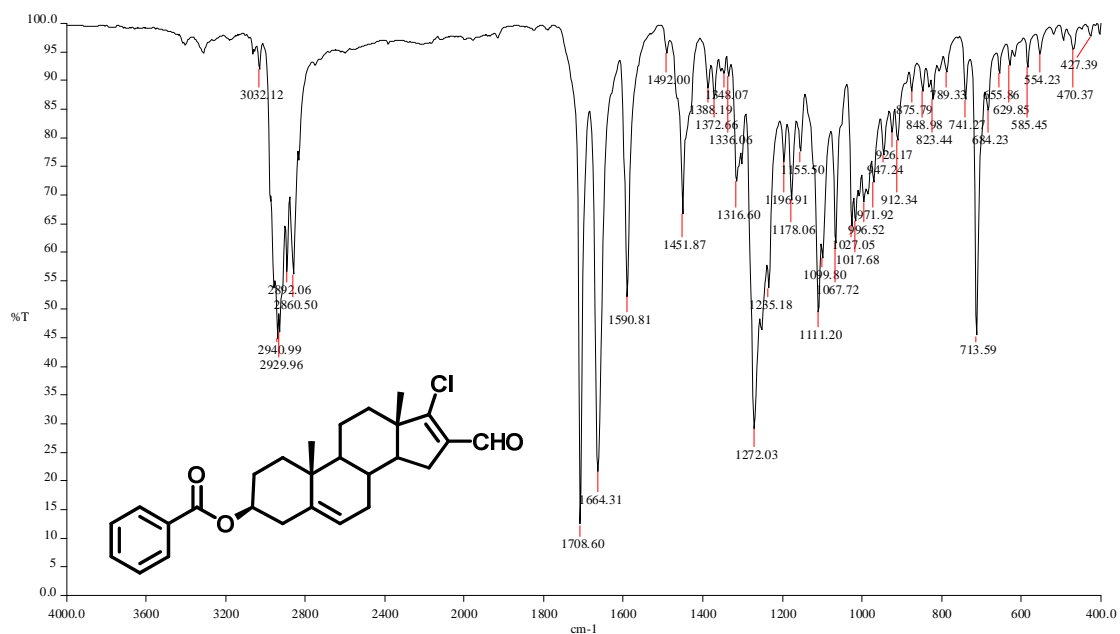


Espectro 6.3

OT4213_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.29E6
 T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

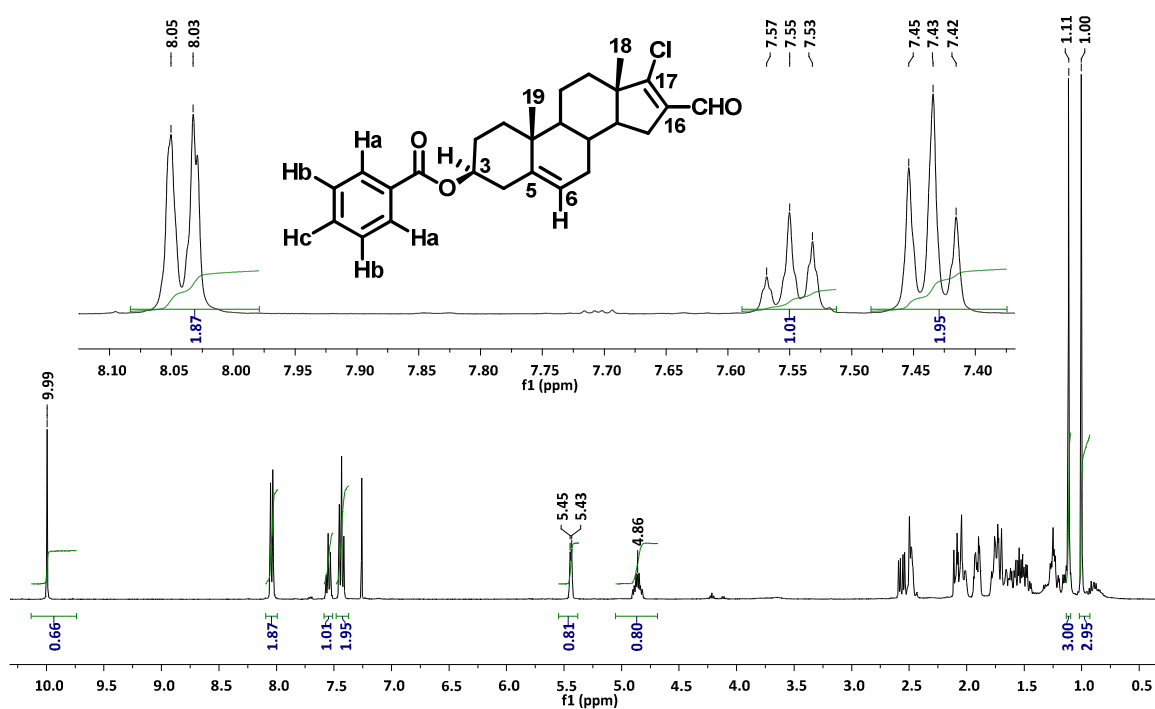


Espectro 6.4

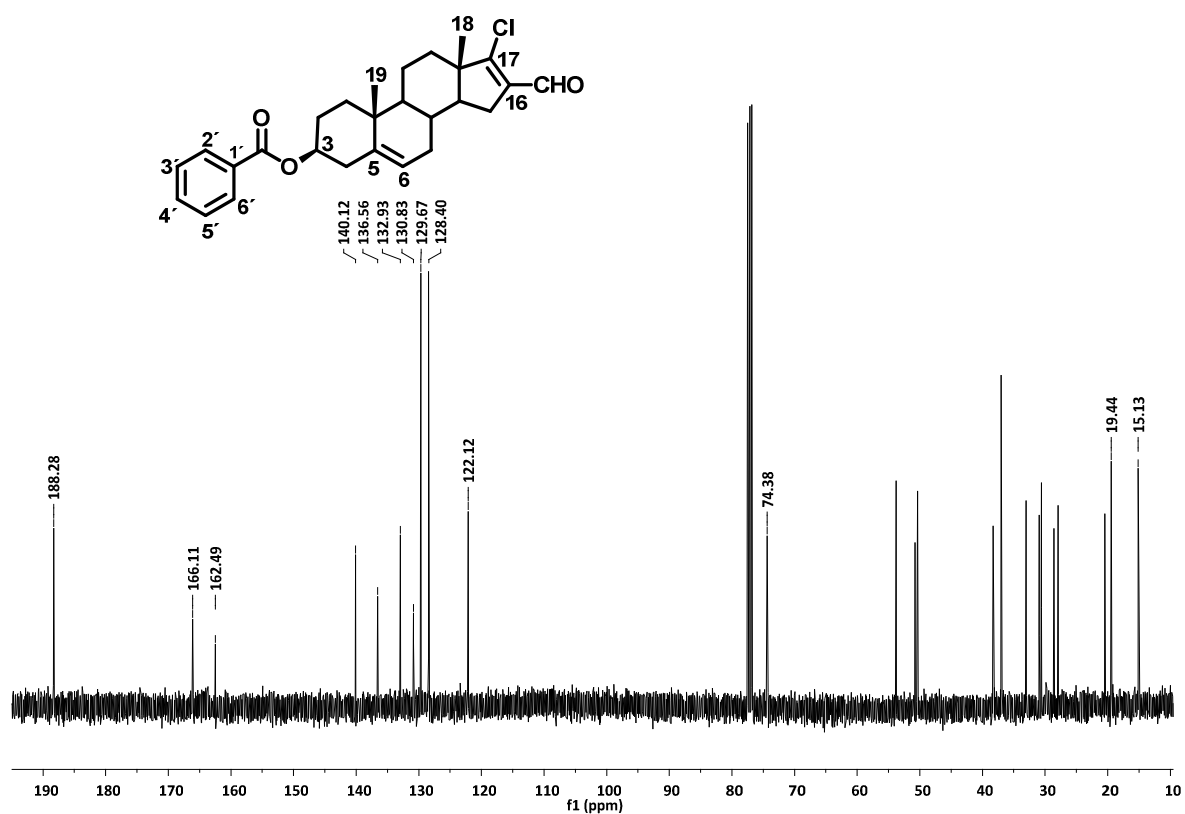


Espectro 7.1

Espectros 7.1-7.4.1: Benzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3 β -ilo

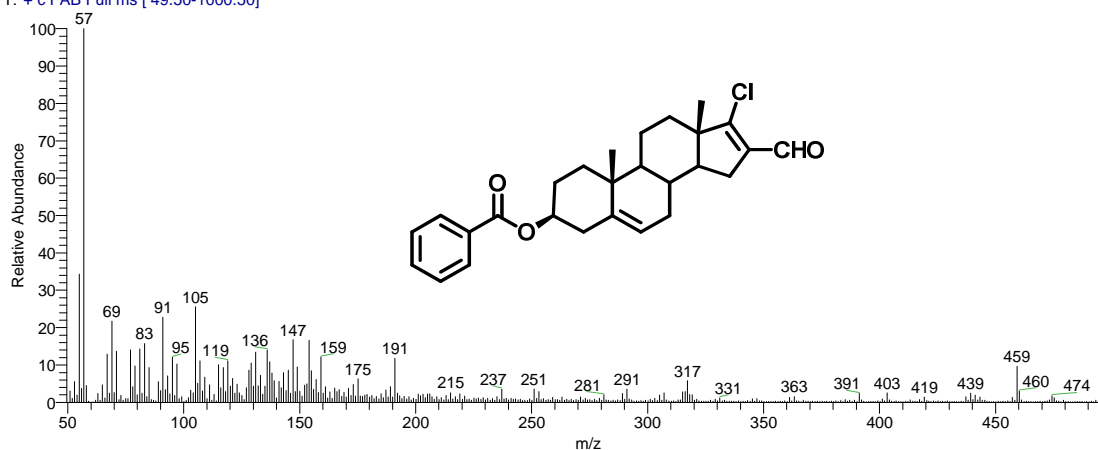


Espectro 7.2



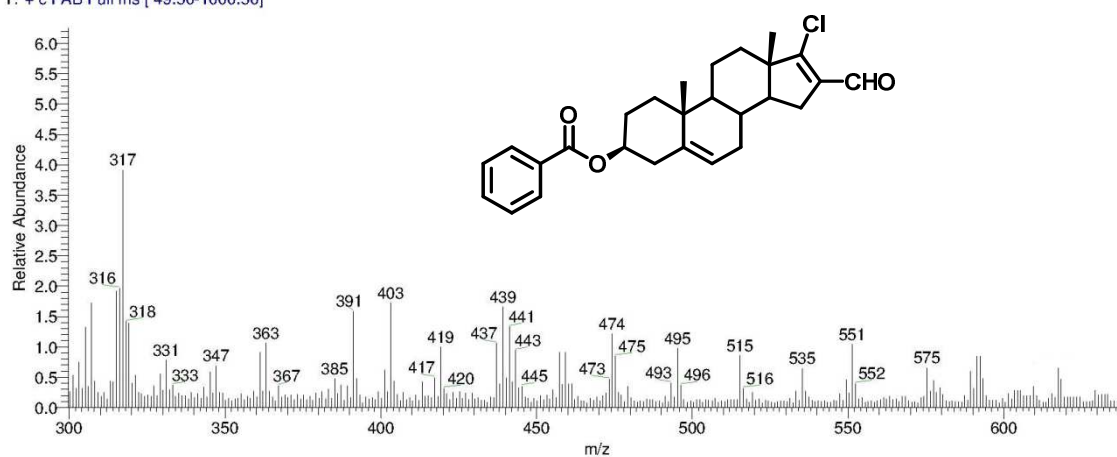
Espectro 7.3

OT4047_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.28E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

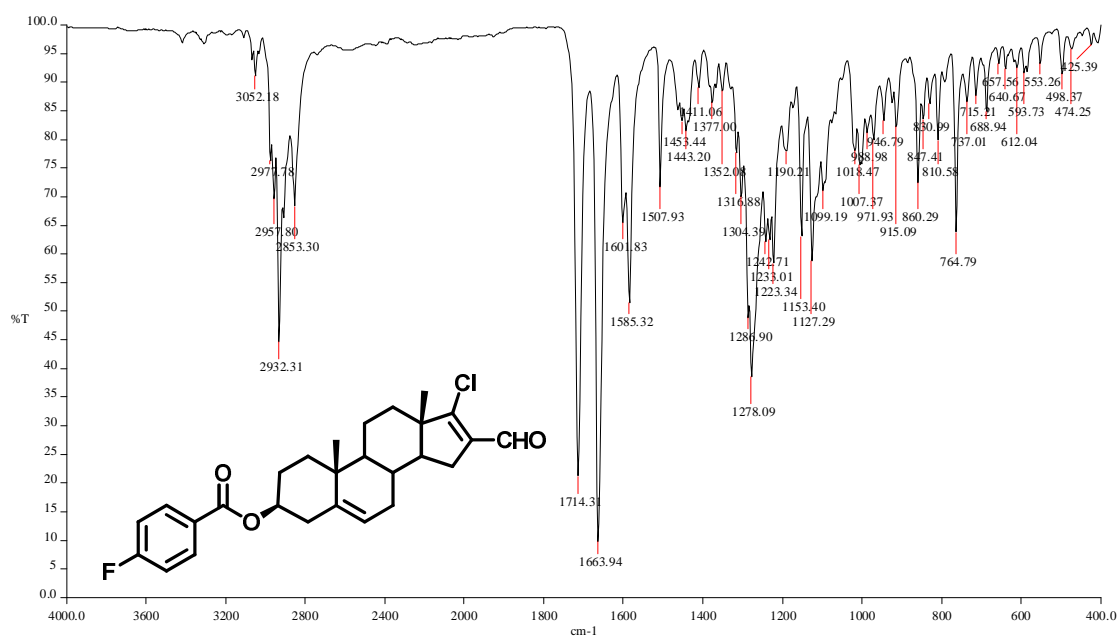


Espectro 7.4

OT4047_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.87E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

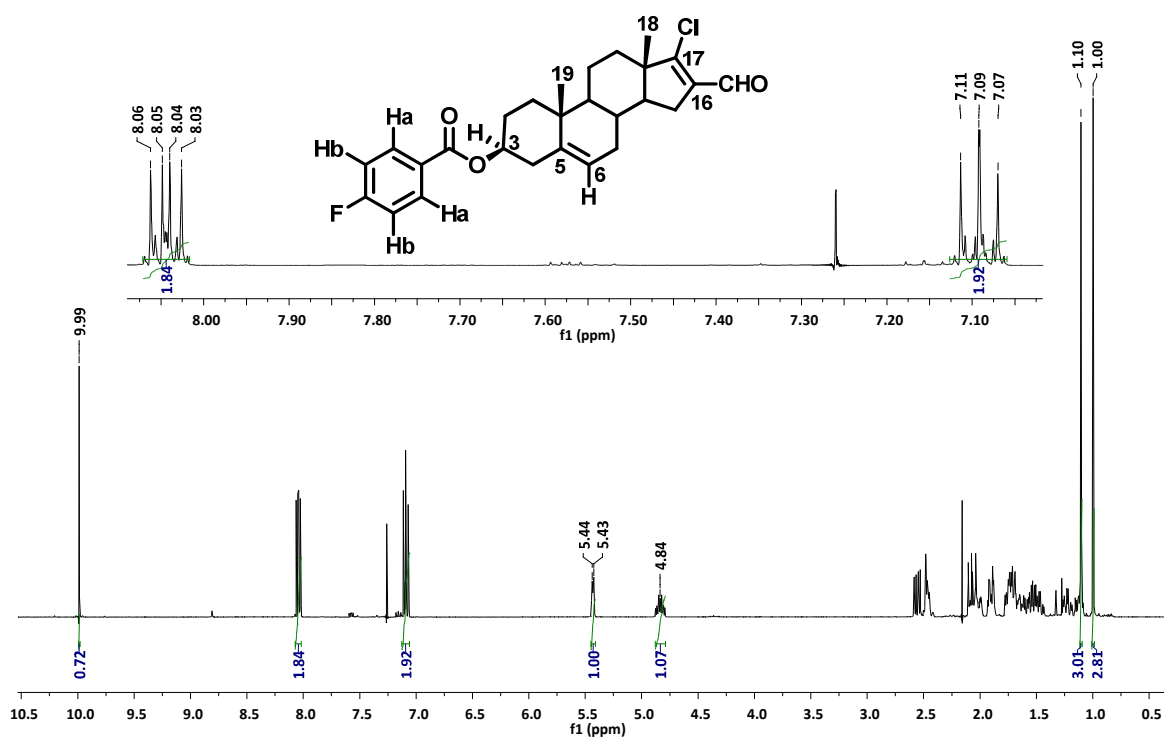


Espectro 7.4.1

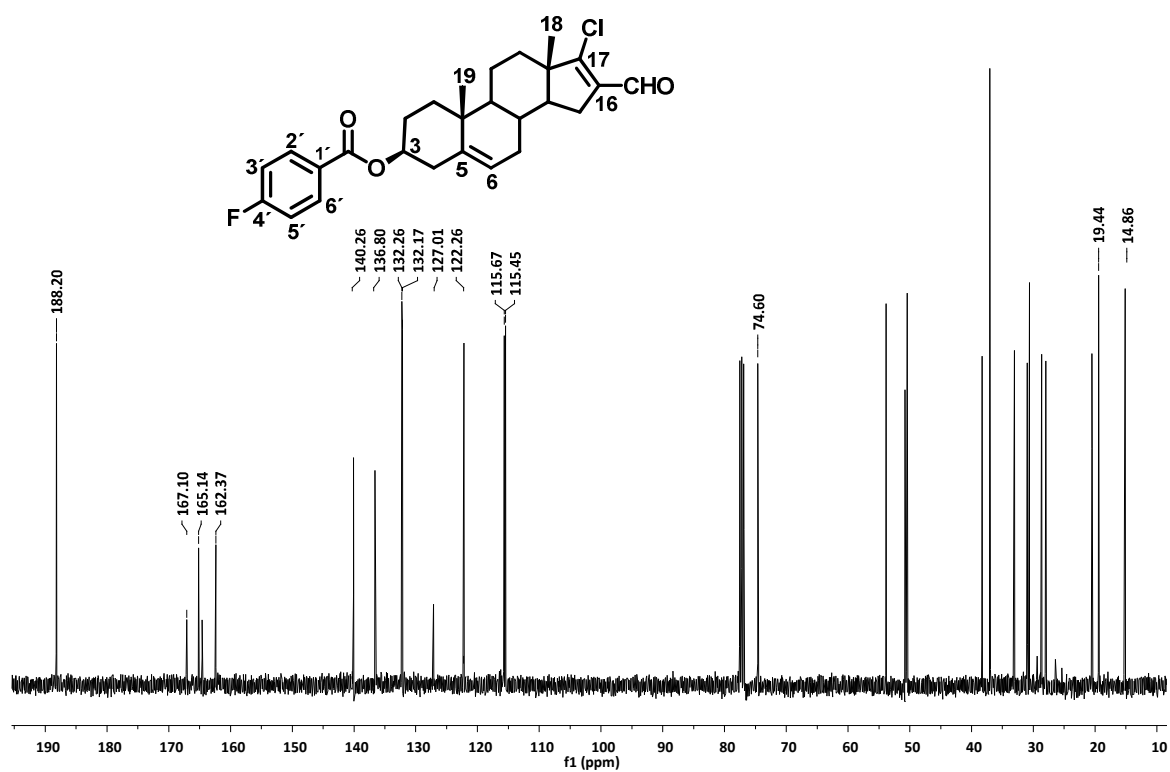


Espectro 8.1

Espectros 8.1-8.4.1: *p*-Fluorobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo



Espectro 8.2



Espectro 8.3

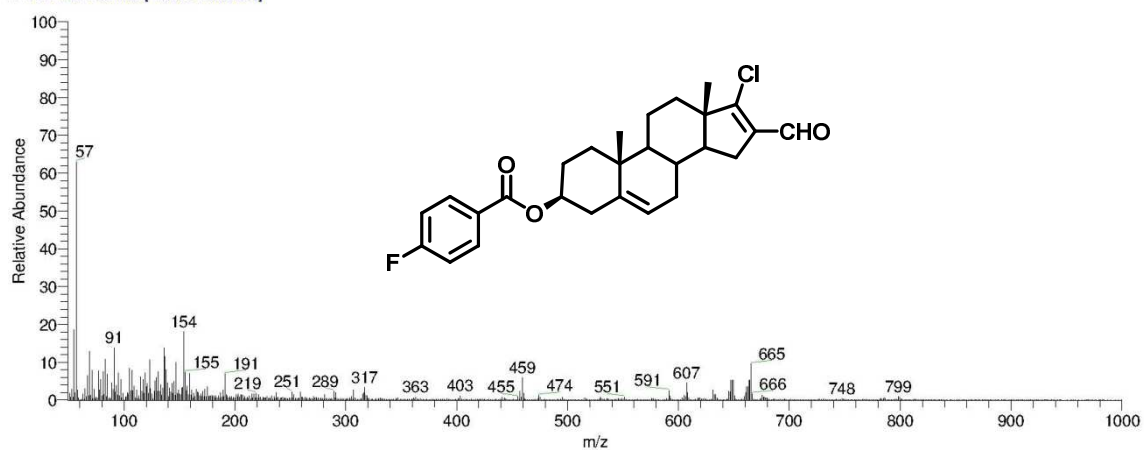
D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT4048_1

4/30/2010 8:40:49 PM

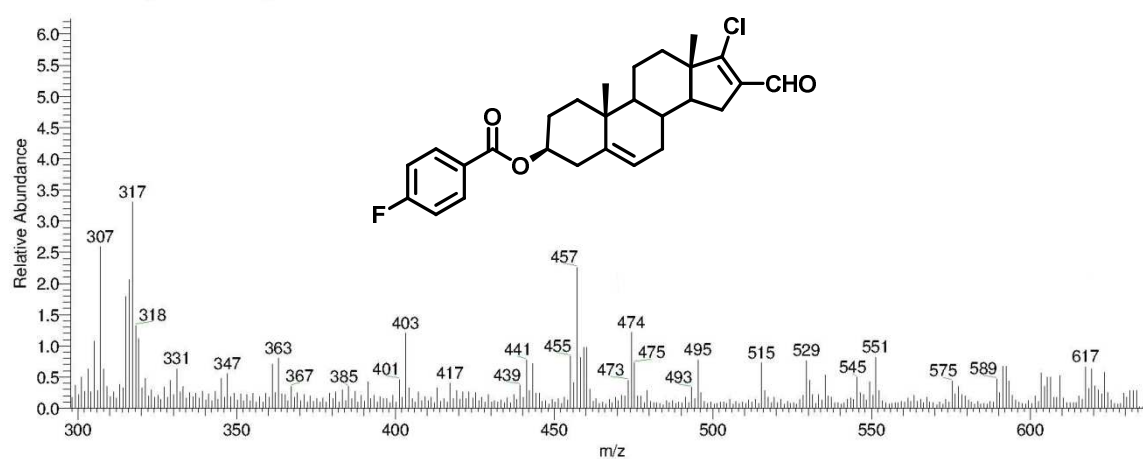
VMF

OT4048_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 2.63E6

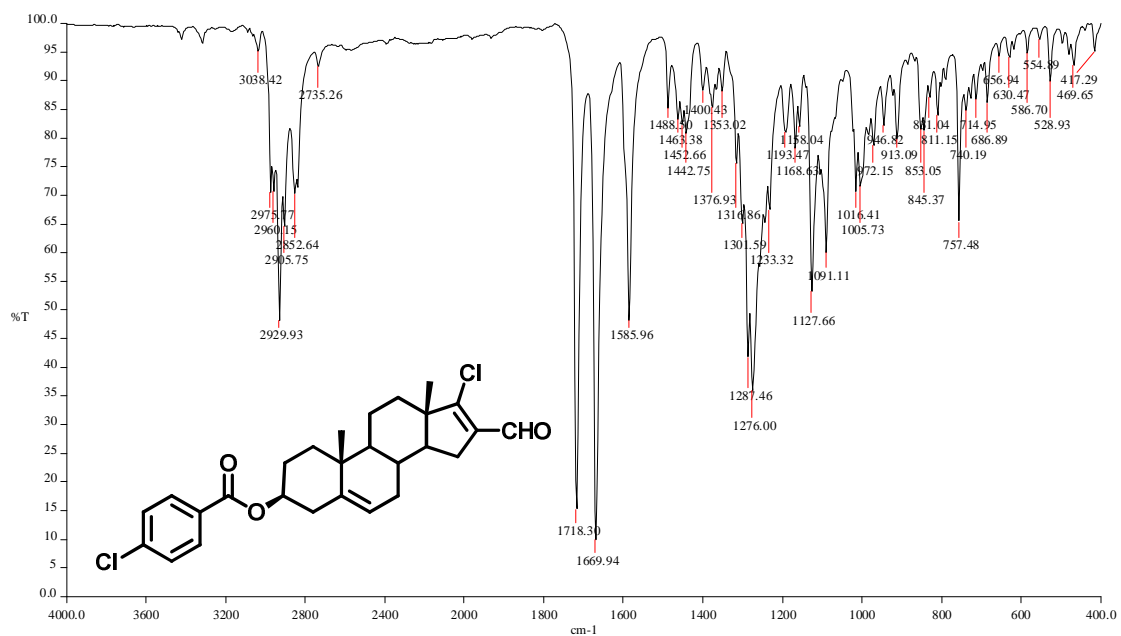
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



Espectro 8.4

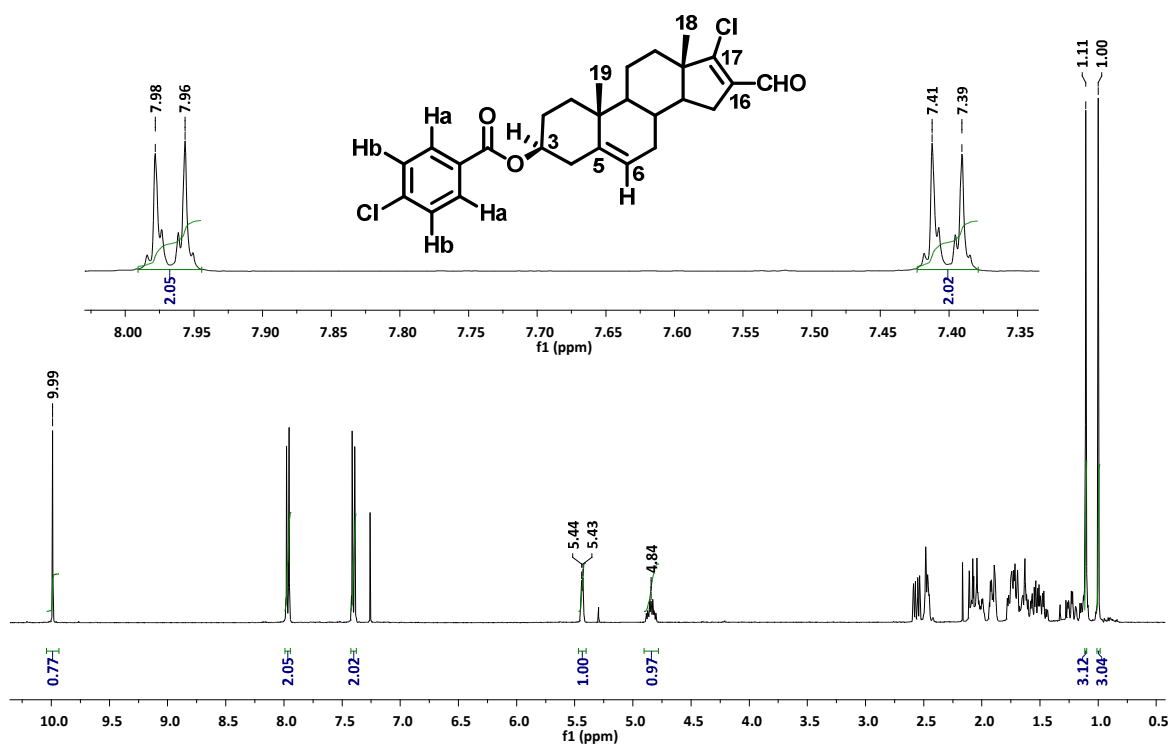


Espectro 8.4.1

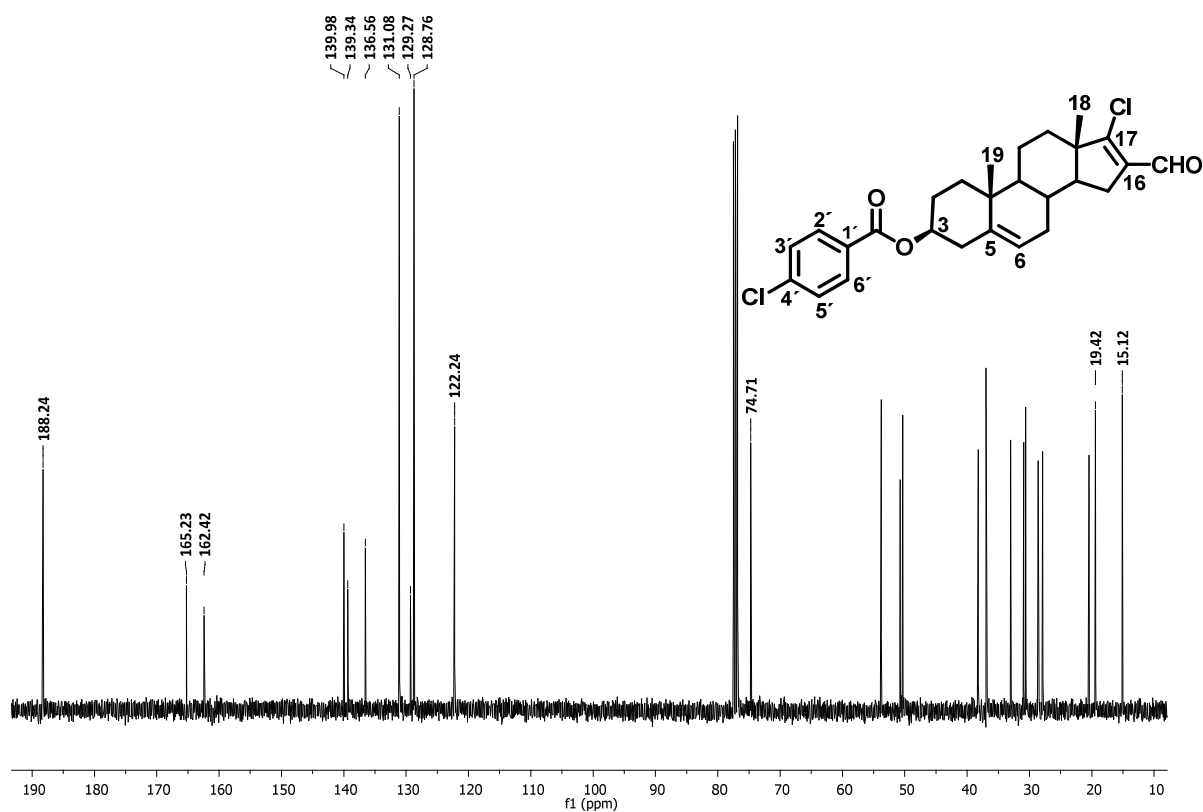


Espectro 9.1

Espectros 9.1-9.4.1: *p*-Clorobenzoato de 17-cloro-16-formilandroster-5,16-dien-3β-ilo

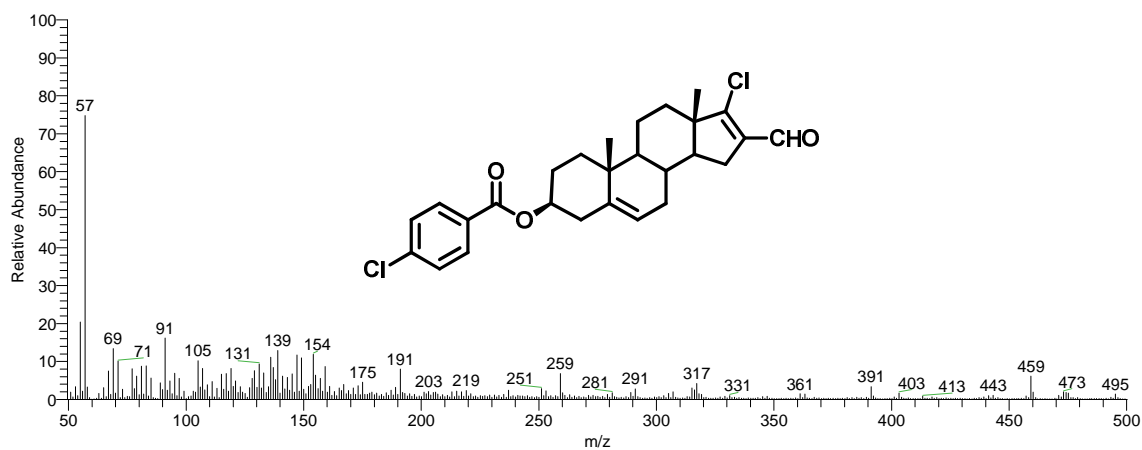


Espectro 9.2



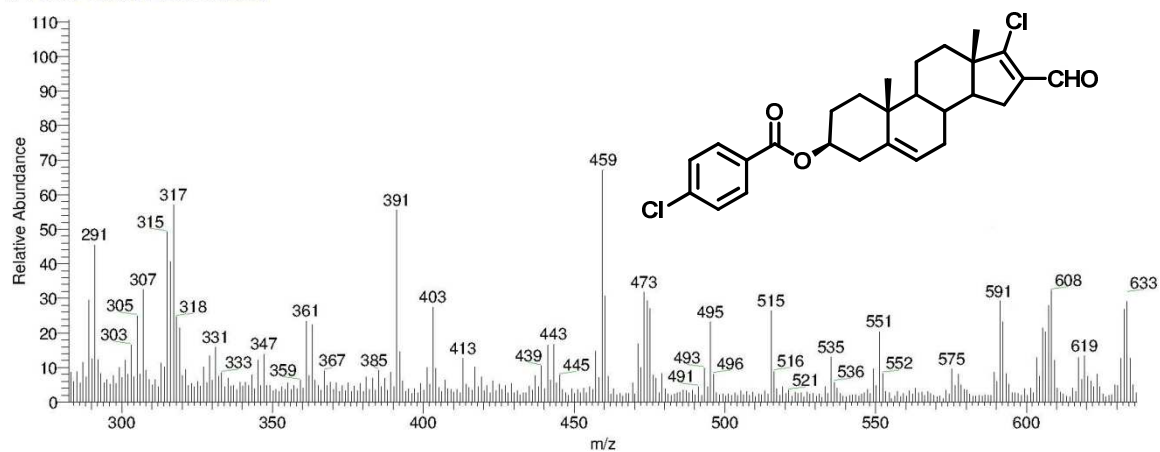
Espectro 9.3

OT4049_2 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.63E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

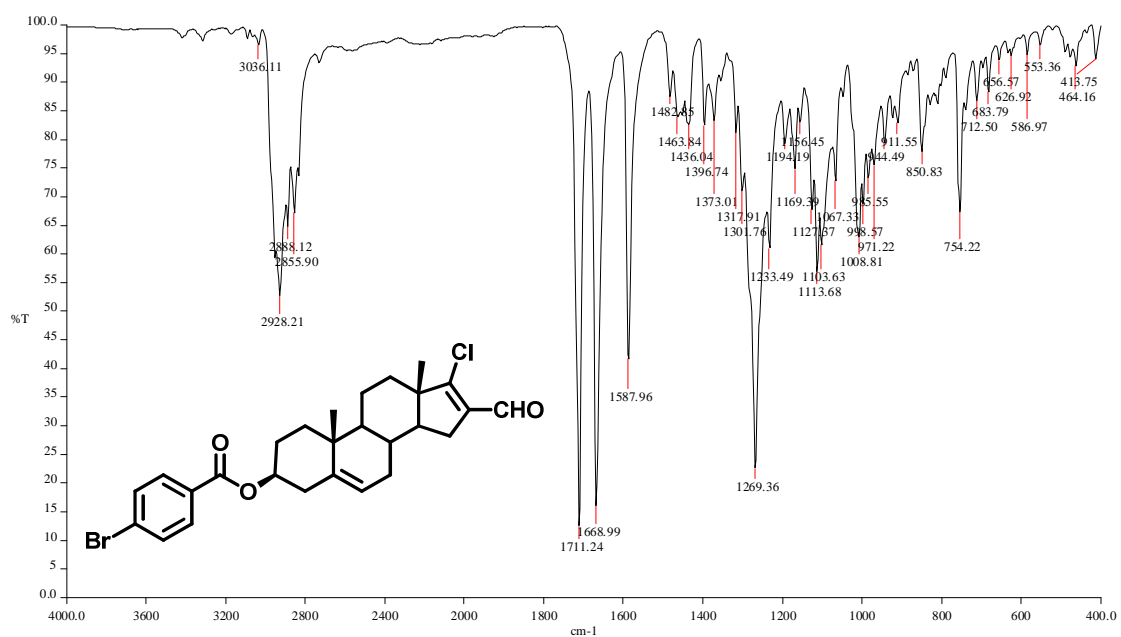


Espectro 9.4

OT4049_2 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 9.93E4
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

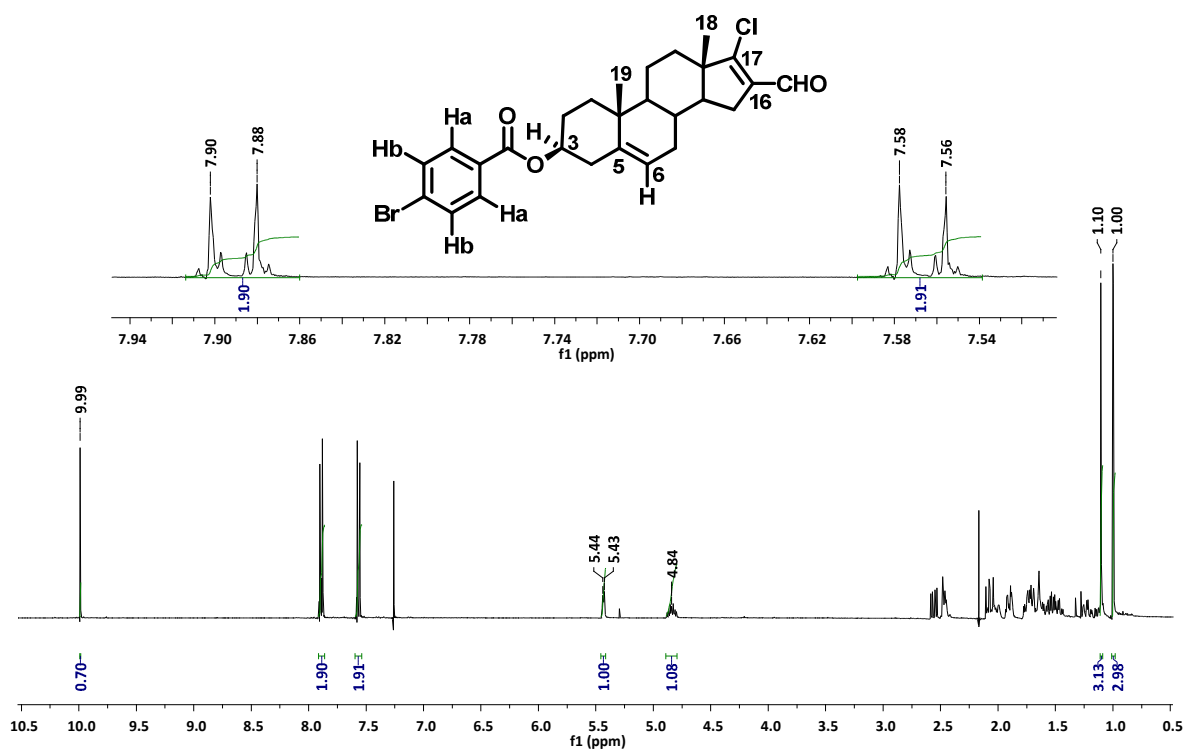


Espectro 9.4.1

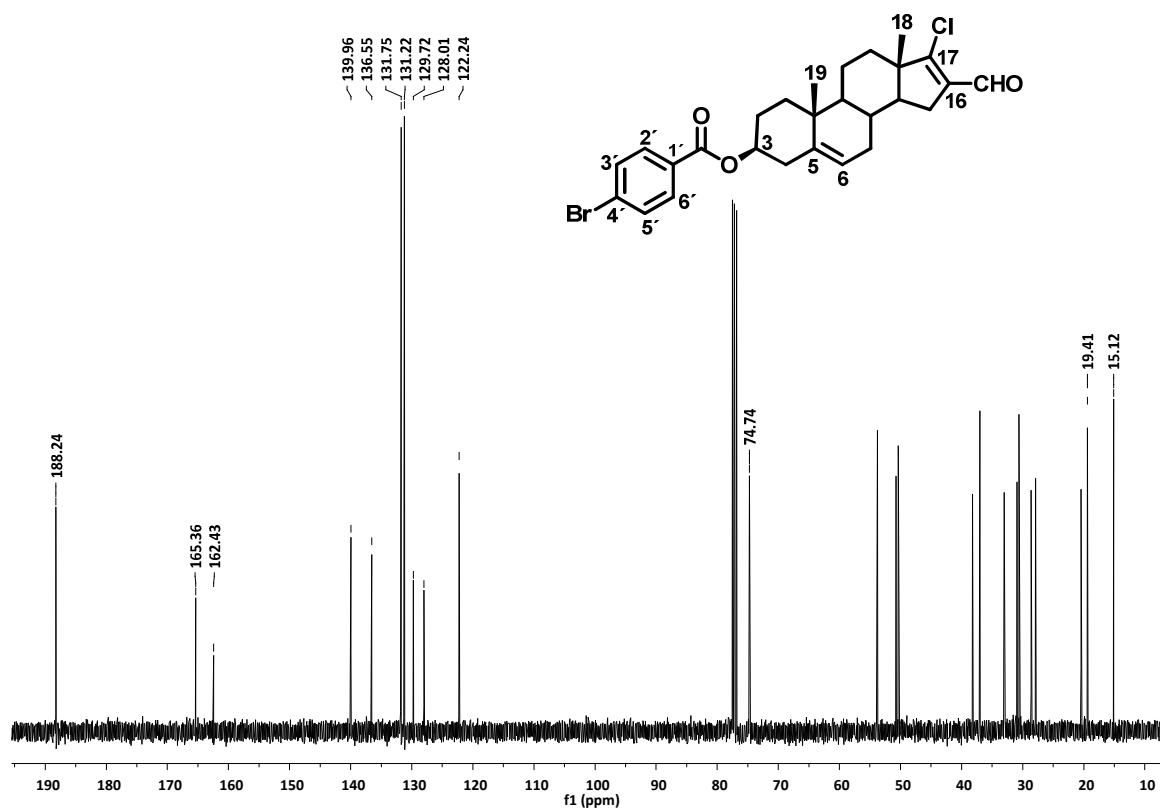


Espectro 10.1

Espectros 10.-10.4.1: *p*-Bromobenzoato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo



Espectro 10.2



Espectro 10.3

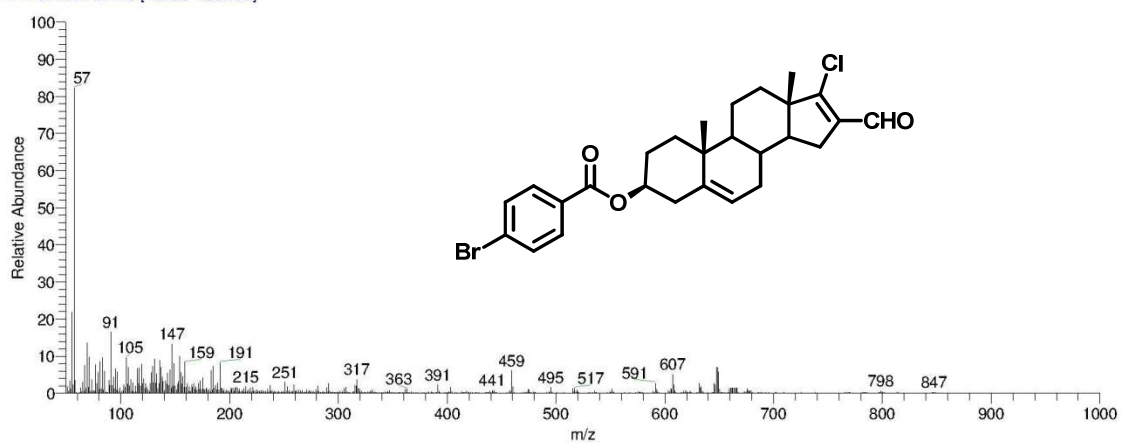
D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT4050_1

4/30/2010 8:52:22 PM

VMBR

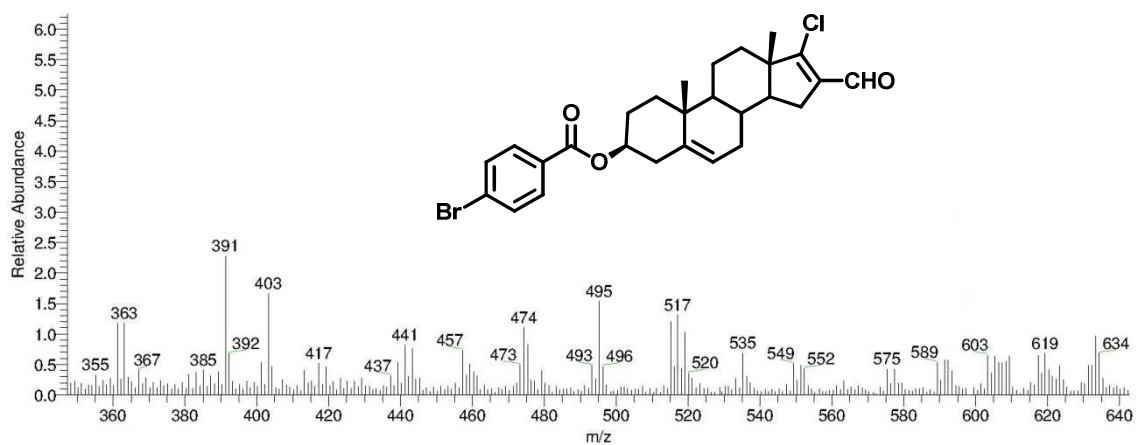
OT4050_1 #1-3 RT: 0.00-0.45 AV: 3 NL: 1.28E6

T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

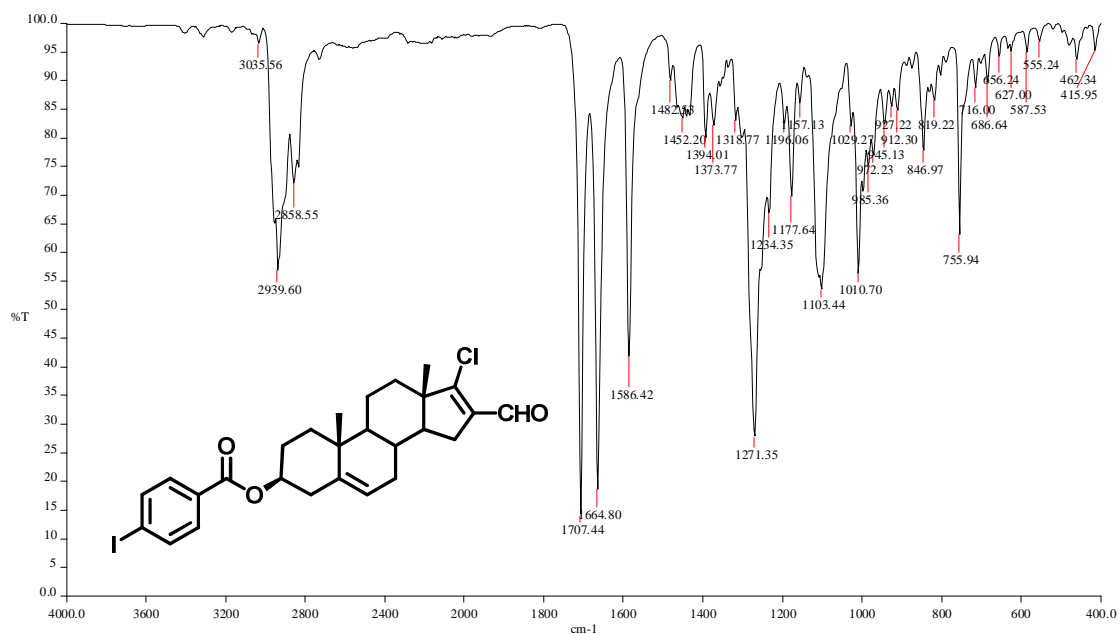


Espectro 10.4

OT4050_1 #1-3 RT: 0.00-0.45 AV: 3 NL: 1.28E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

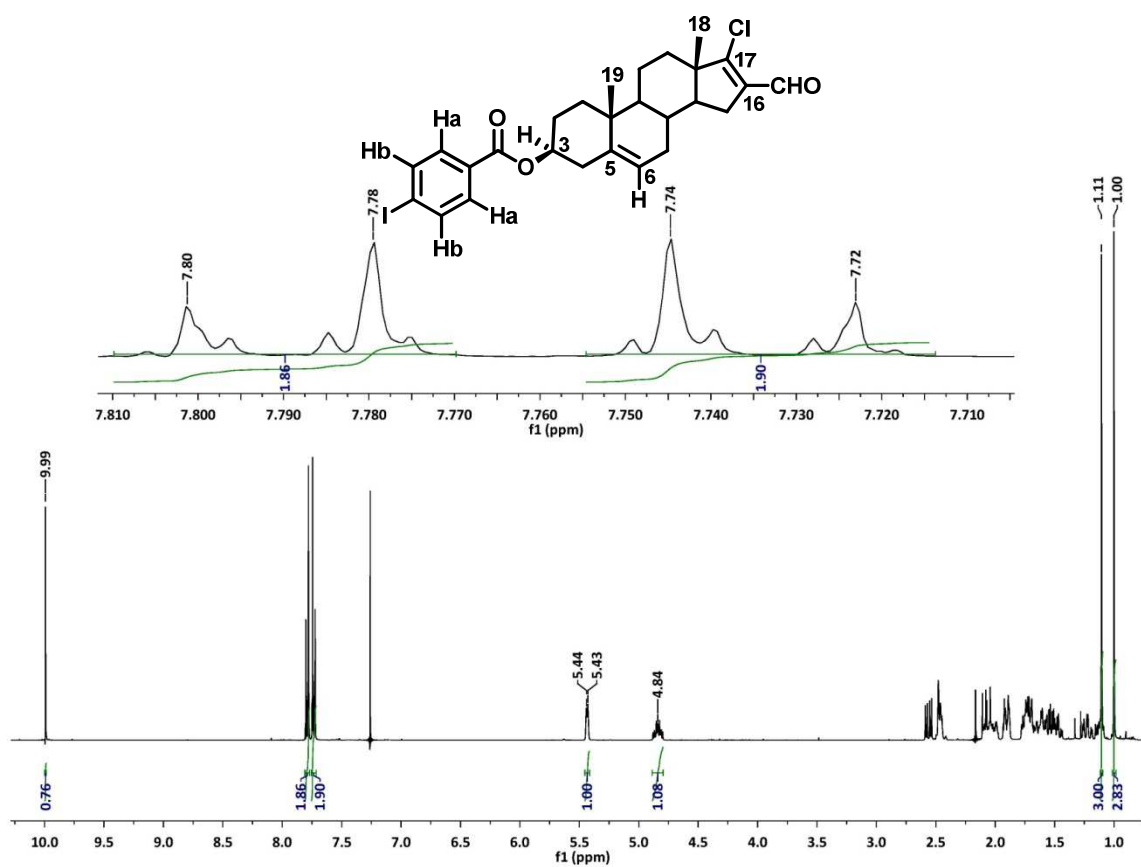


Espectro 10.4.1

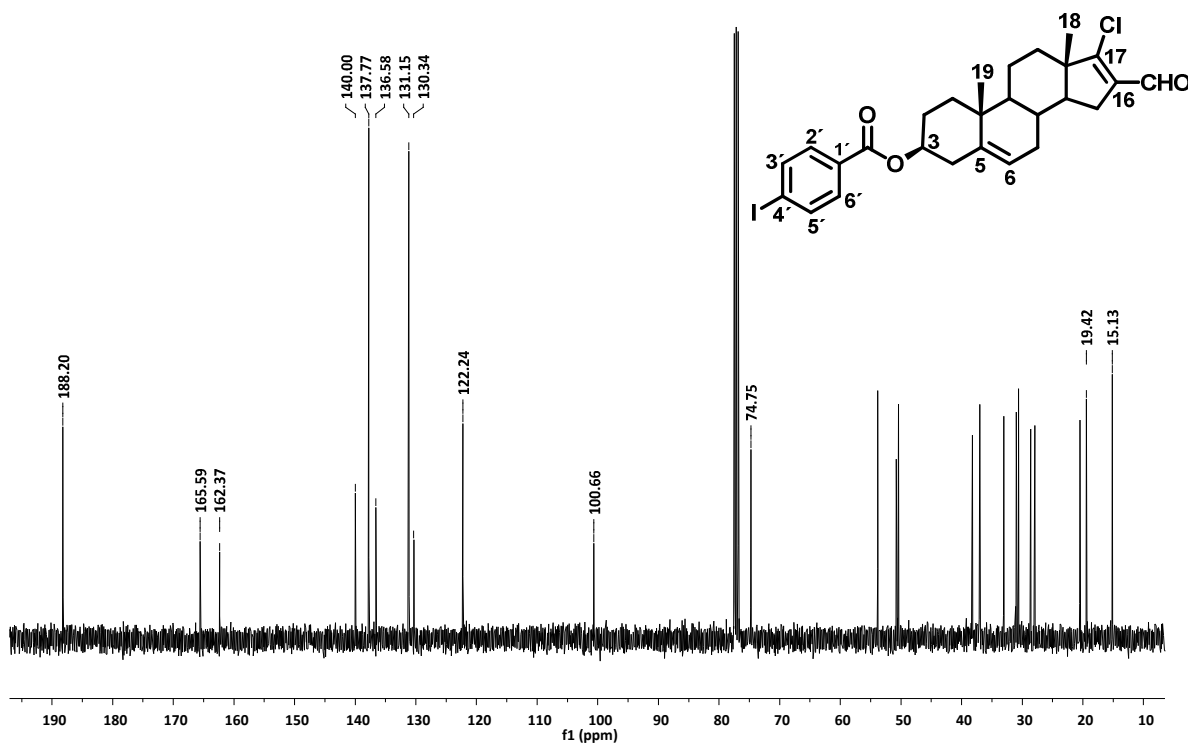


Espectro 11.1

Espectros 11.1-11.4.1: *p*-Yodobenzoato de 17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo



Espectro 11.2



Espectro 11.3

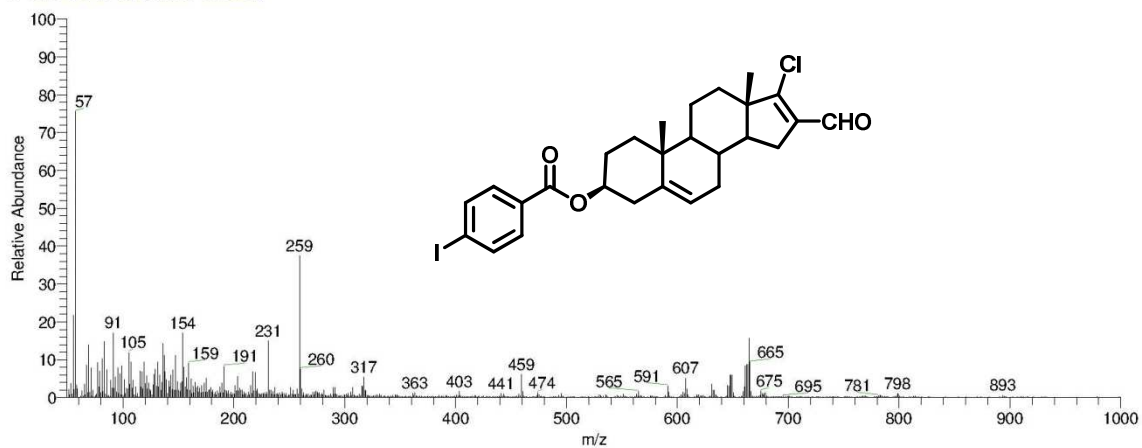
D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT4051_1

4/30/2010 8:58:30 PM

VMI

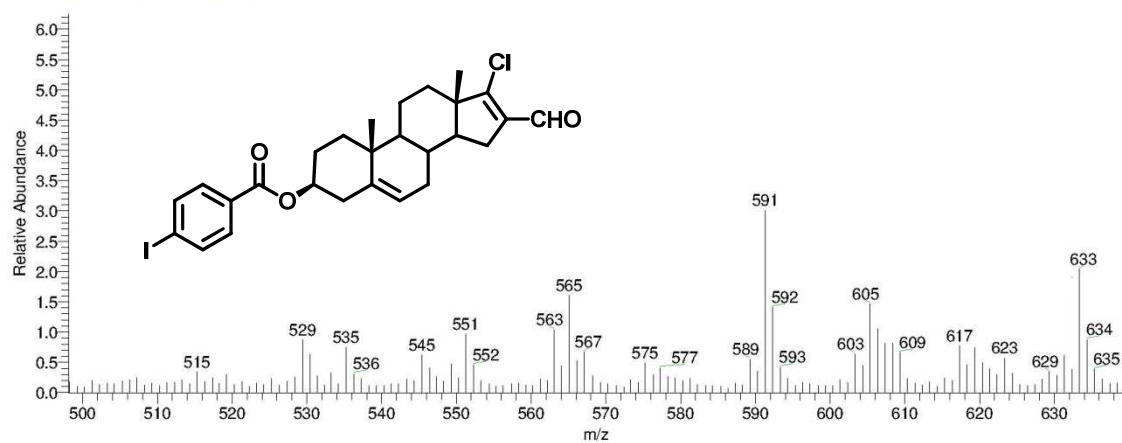
OT4051_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 9.25E5

T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

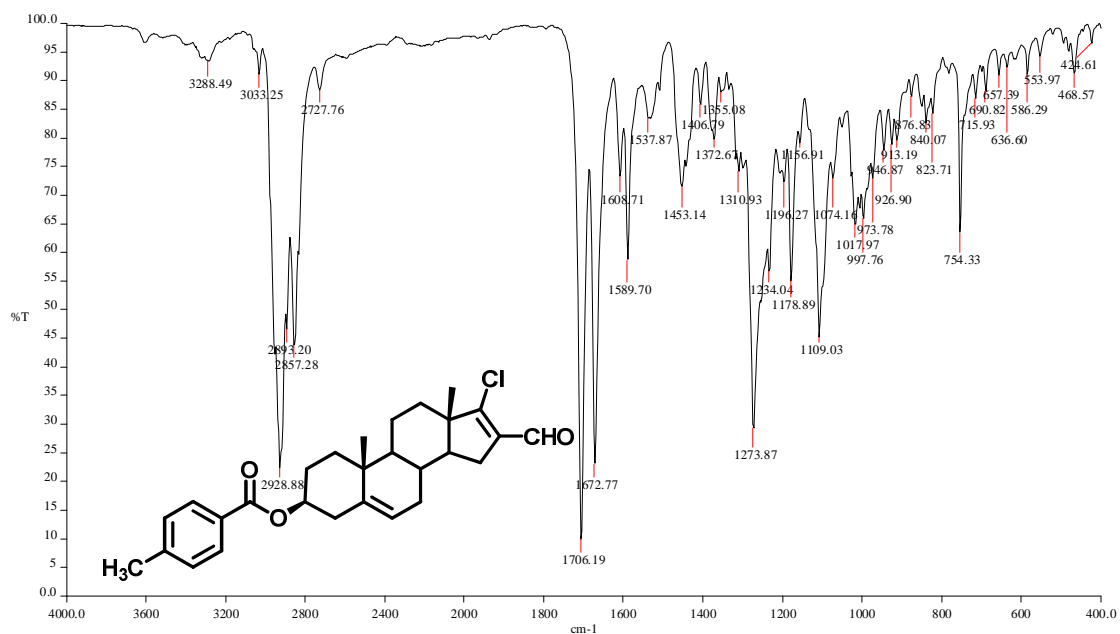


Espectro 11.4

OT4051_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 9.25E5
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

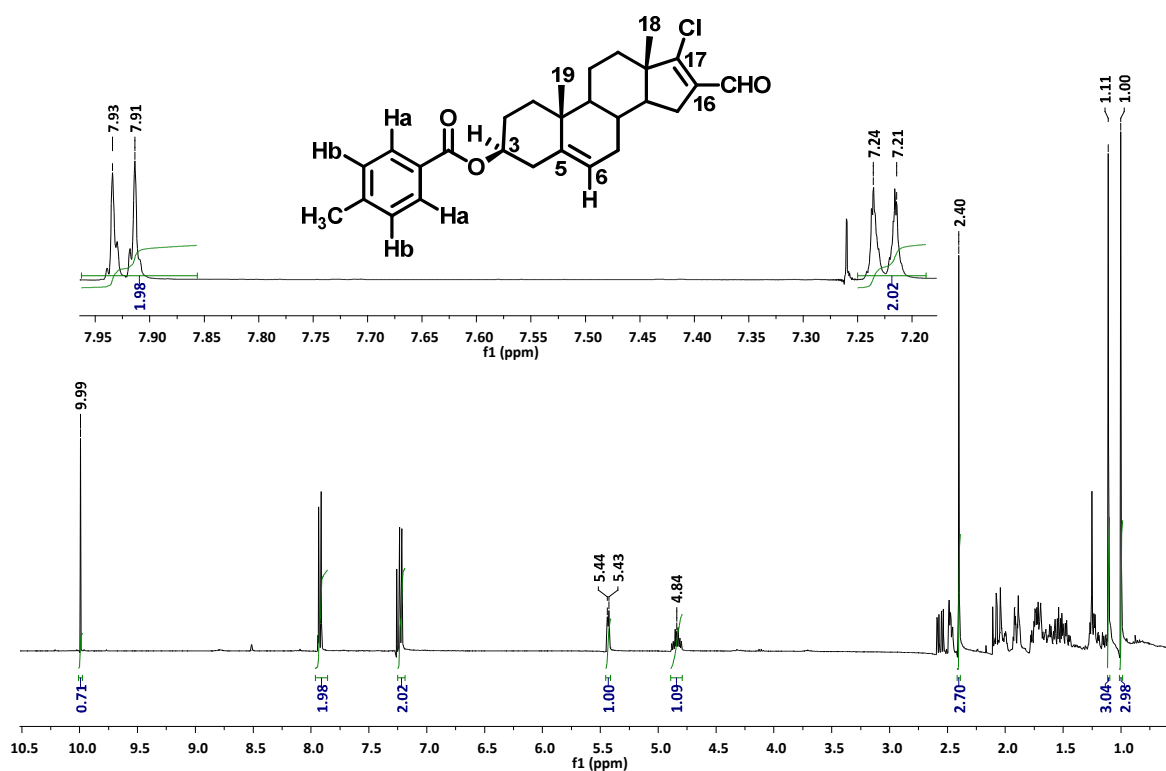


Espectro 11.4.1

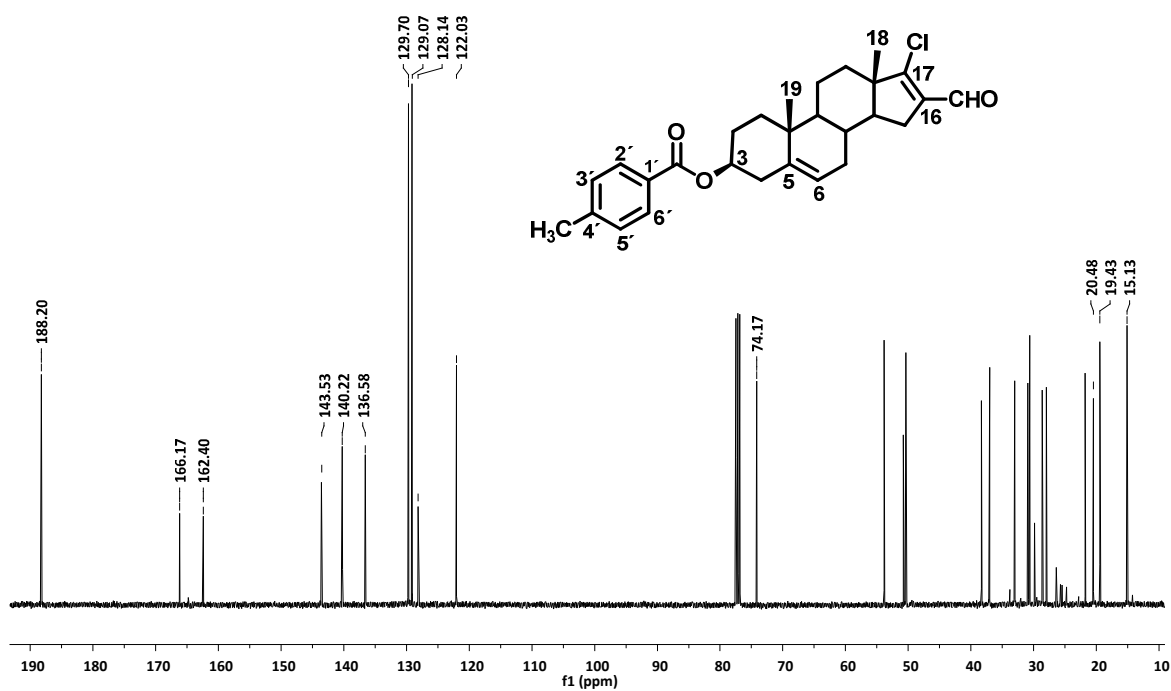


Espectro 12.1

Espectros 12.1-12.4: *p*-Metilbenzoato de 17-cloro-16-formilandroster-5,16-dien-3β-ilo



Espectro 12.2



Espectro 12.3

D:\Xcalibur\data\USAN\FABI\OT4214_1

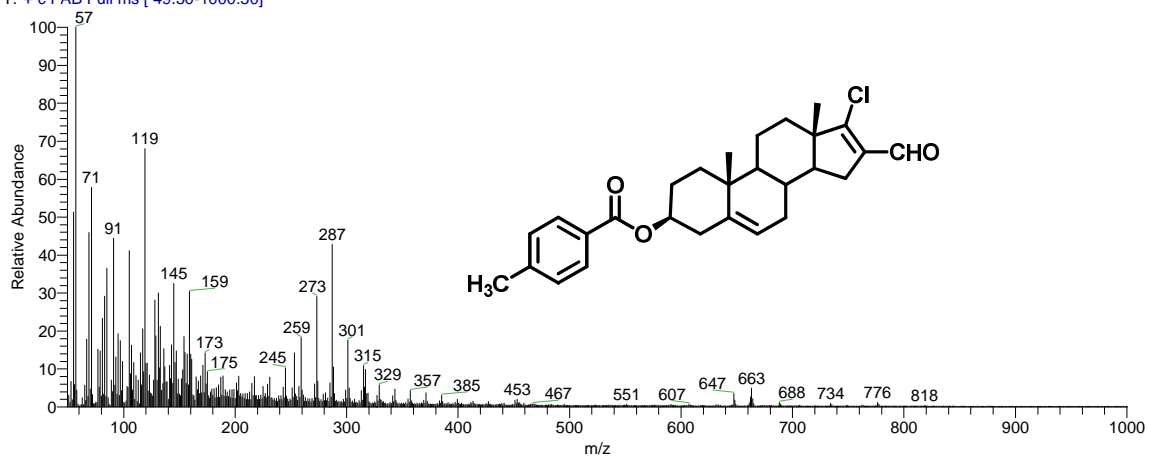
5/27/2010 1:14:47 PM

VMH-CH3

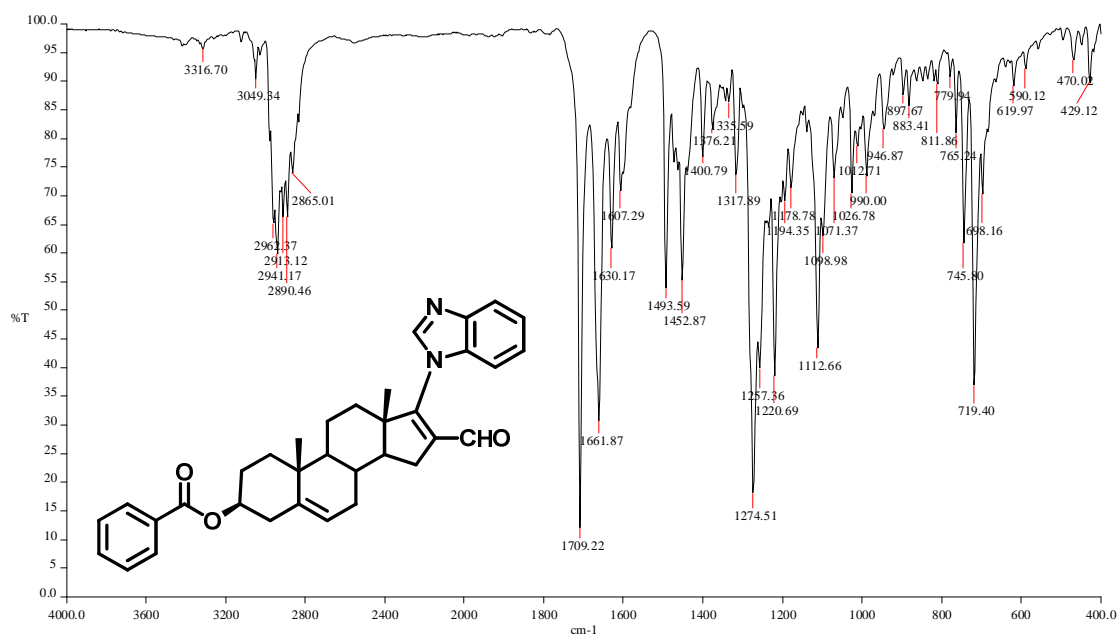
szComment

OT4214_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 3.46E6

T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

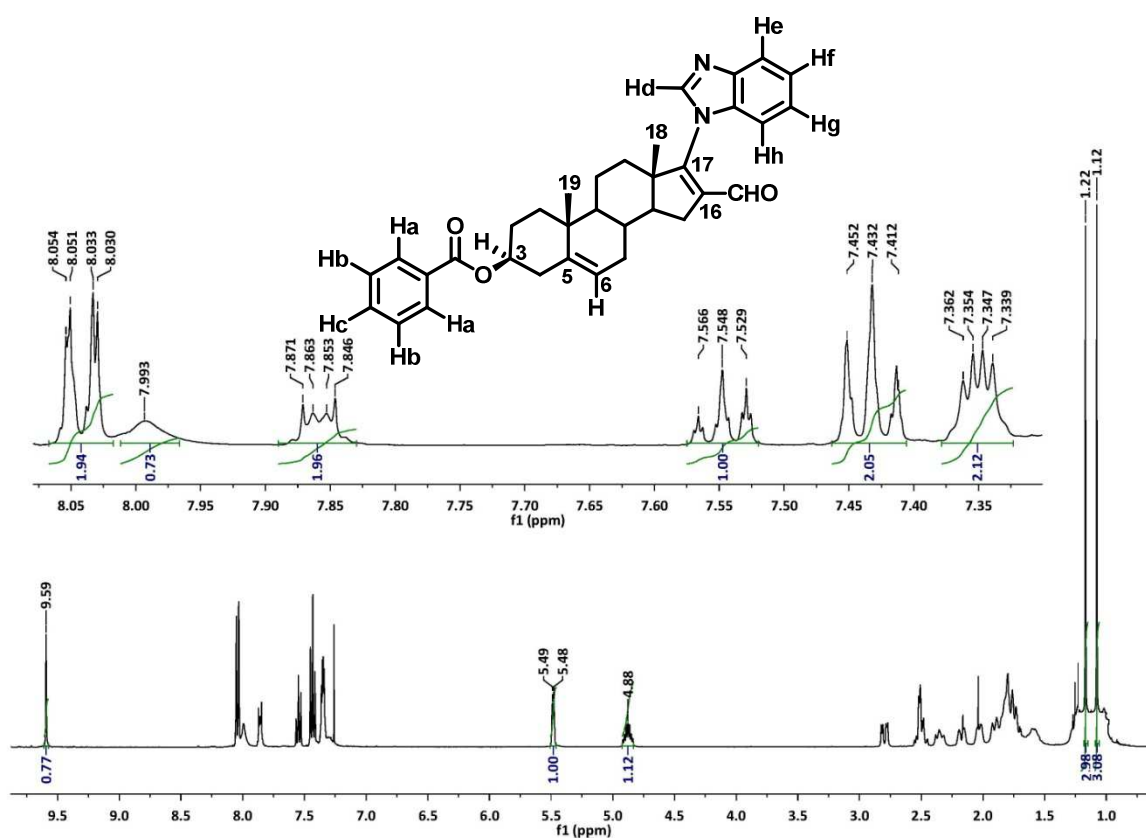


Espectro 12.4

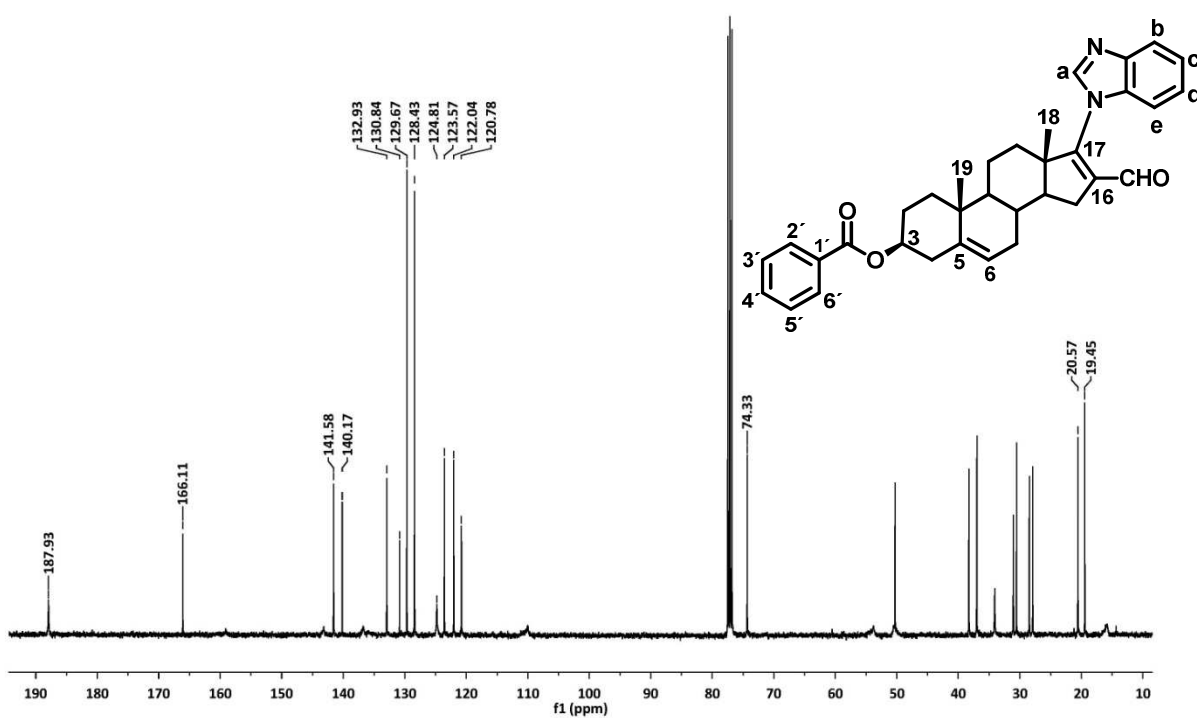


Espectro 13.1

Espectros 13.1-13.4: Benzoato de 17-(1H-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo



Espectro 13.2



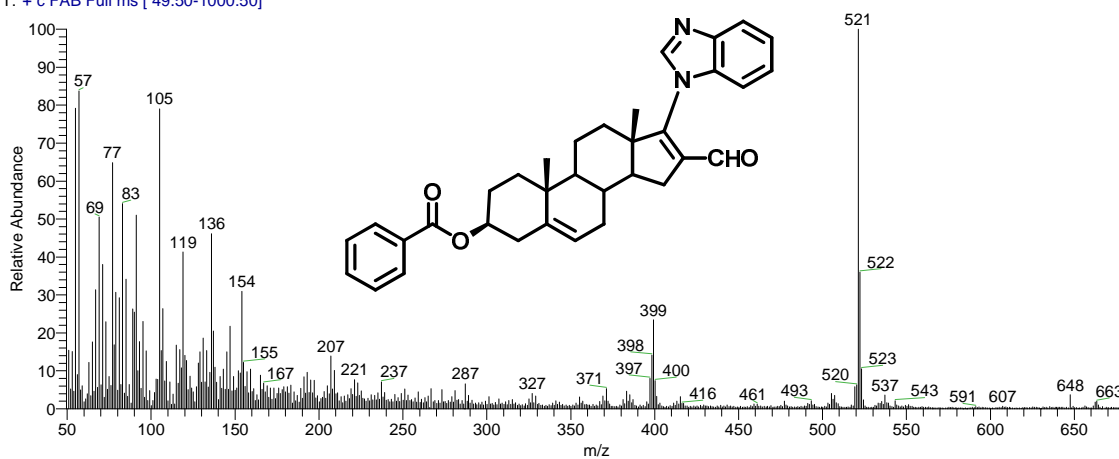
Espectro 13.3

D:\Xcalibur\data\USANFAB\OT4777_1

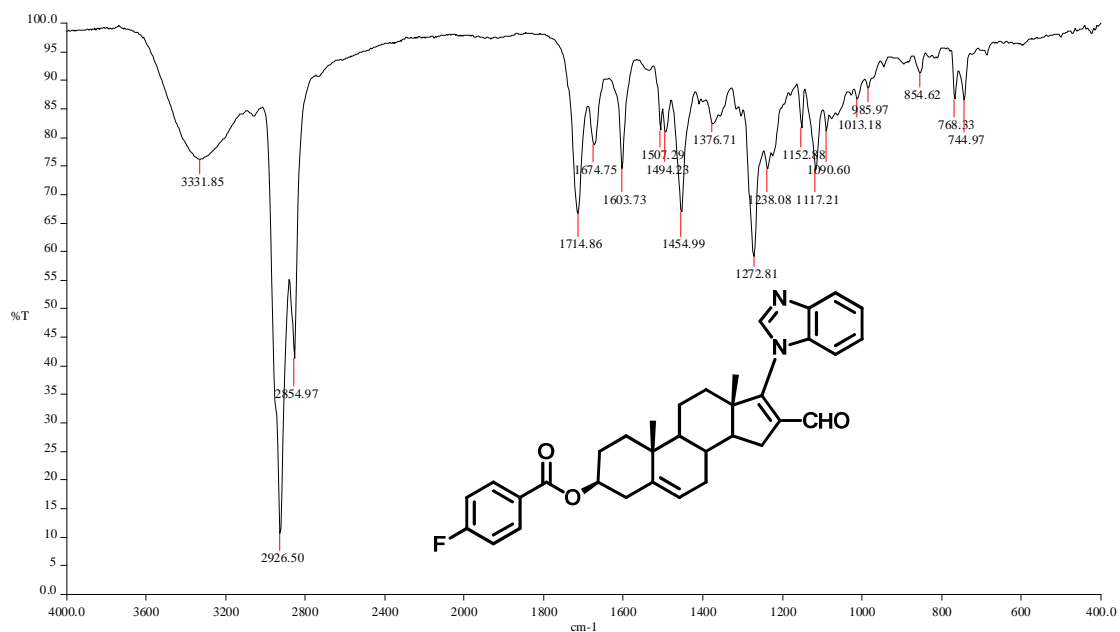
10/5/2010 3:01:41 PM

-PH

OT4777_1 #1-3 RT: 0.00-0.45 AV: 3 NL: 4.51E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

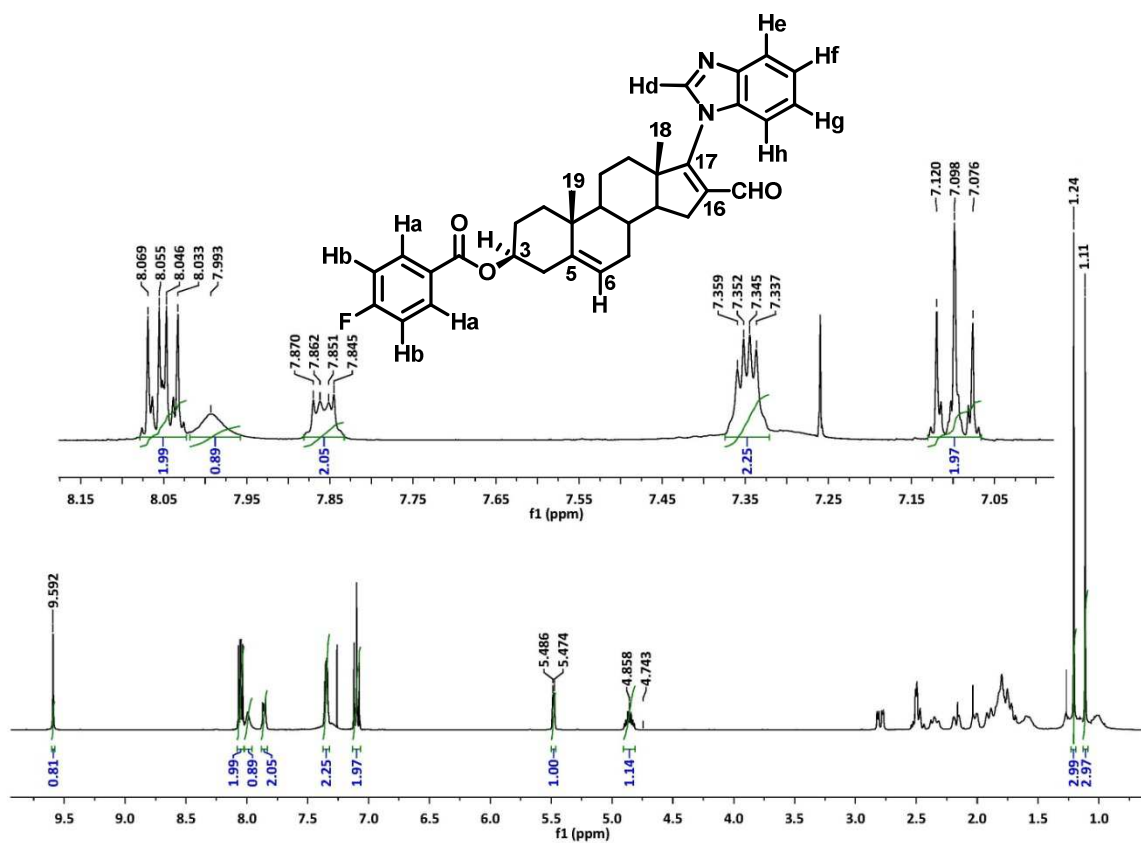


Espectro 13.4

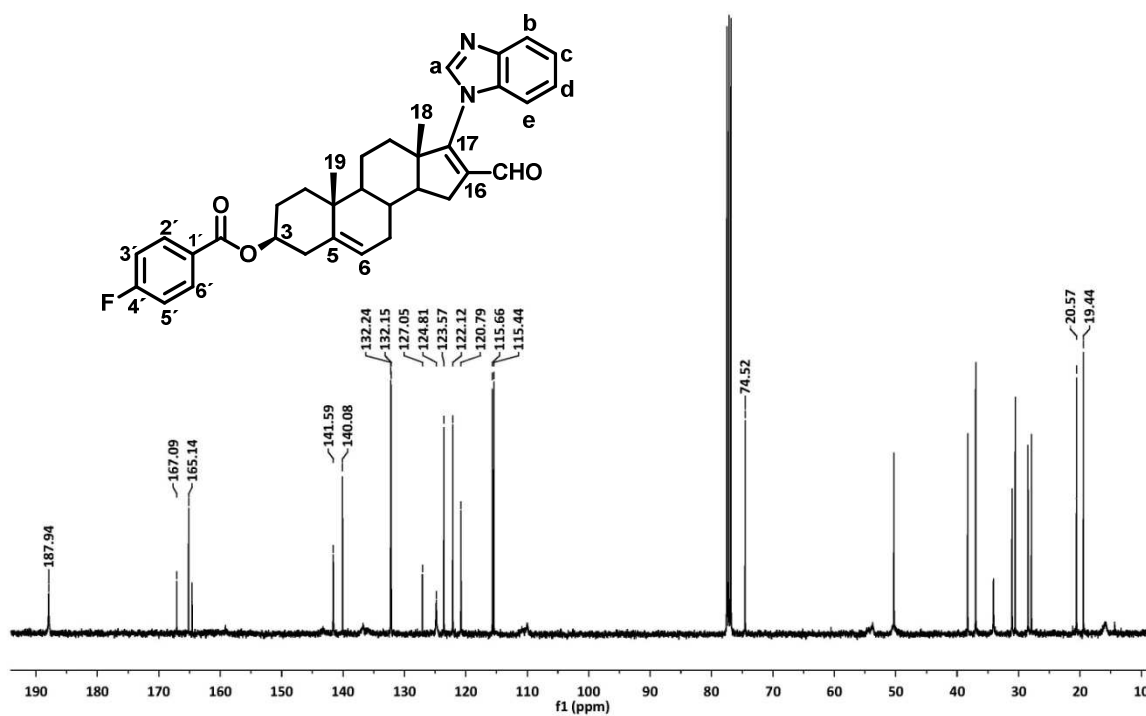


Espectro 14.1

Espectros 14.1-14.4: *p*-Fluorobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo



Espectro 14.2



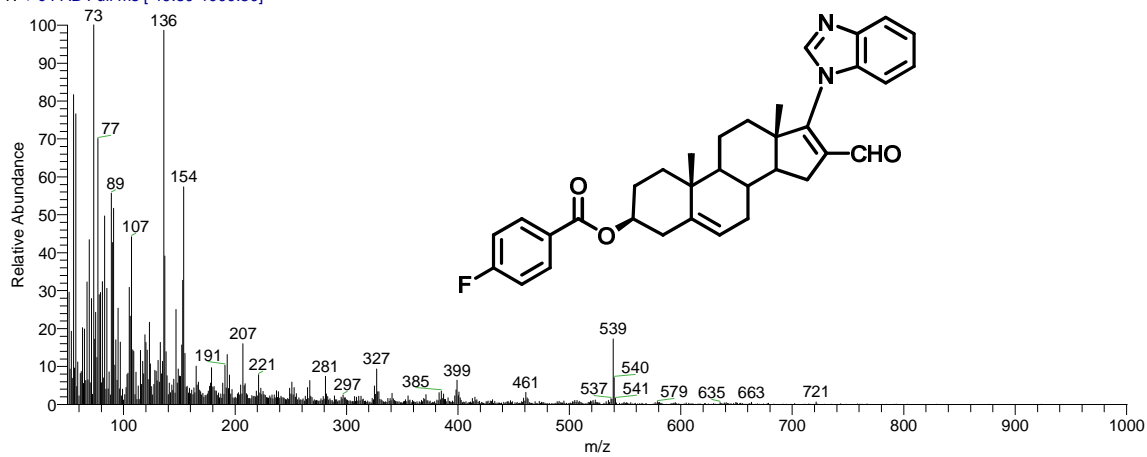
Espectro 14.3

D:\Xcalibur\data\USANFAB\OT4778_1

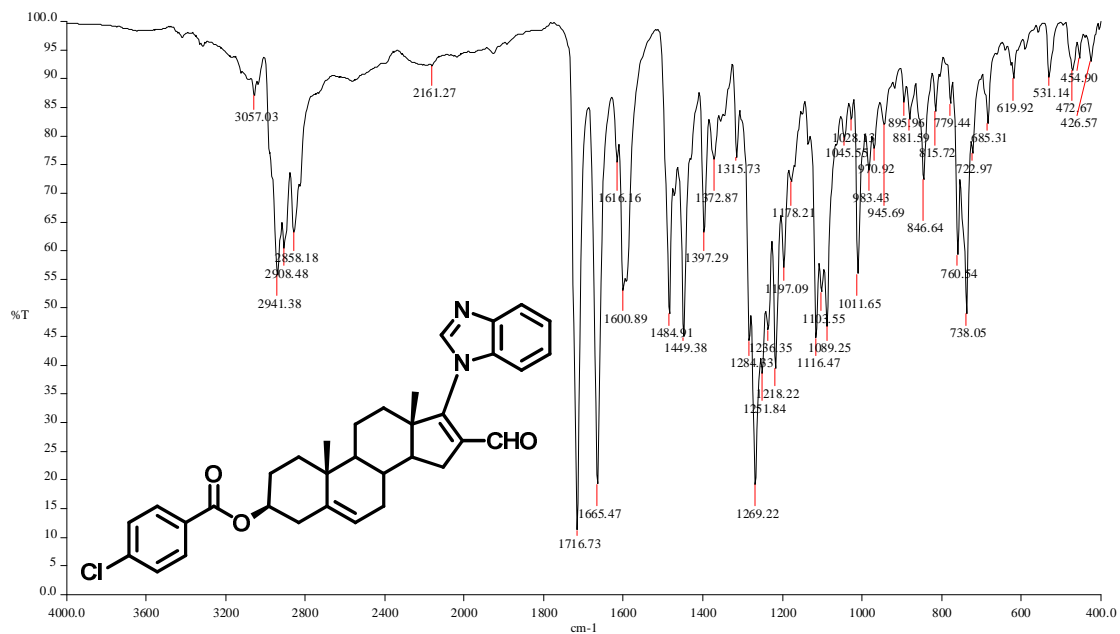
10/5/2010 3:08:59 PM

-F

OT4778_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 4.00E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

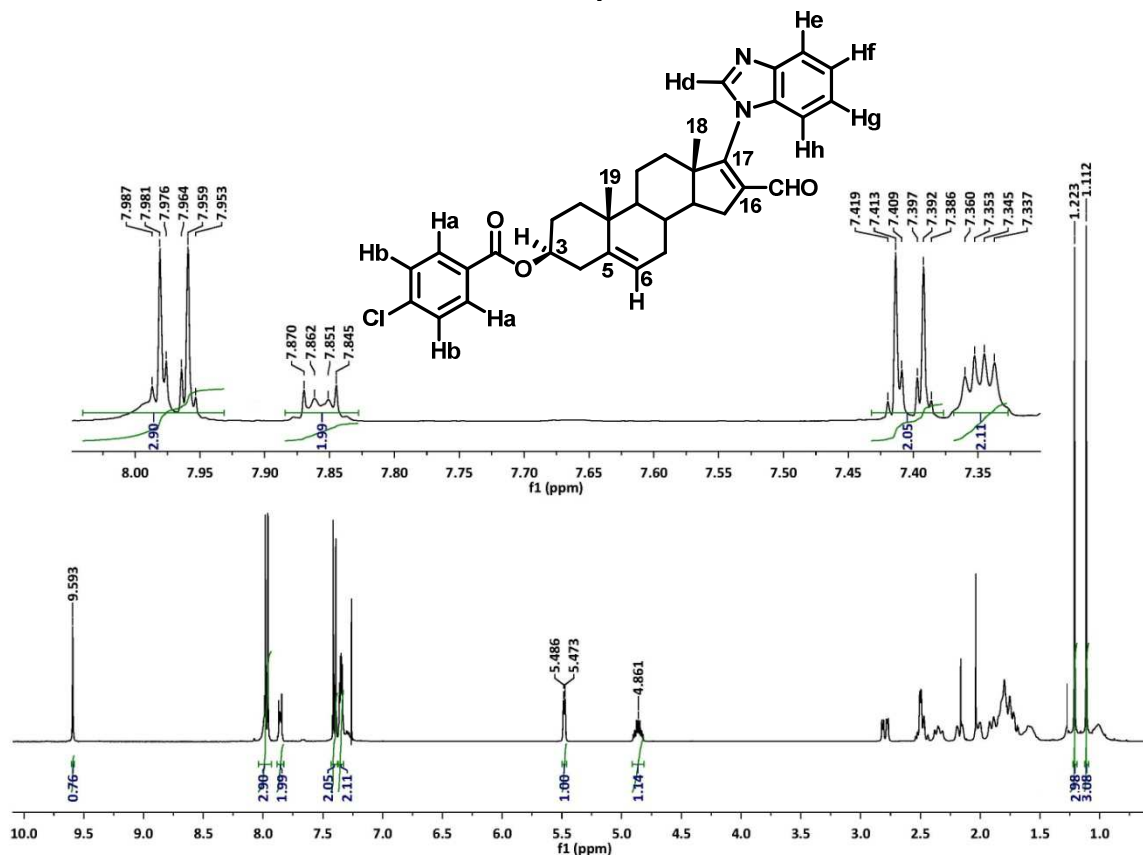


Espectro 14.4

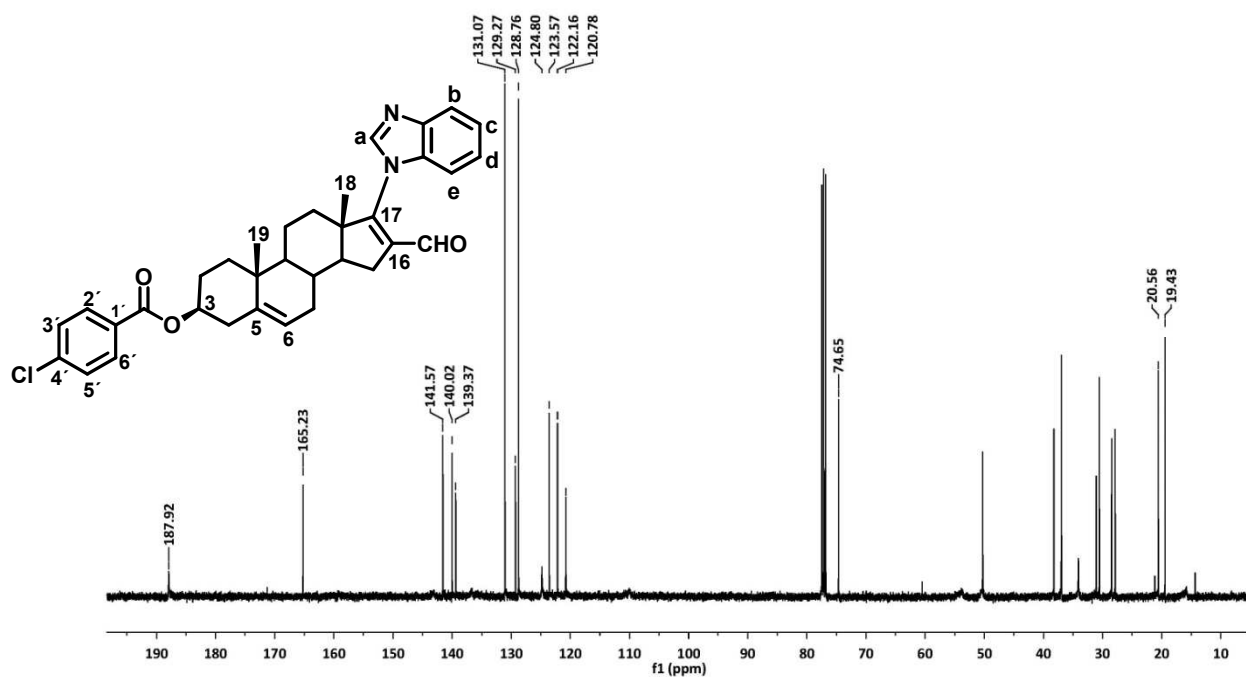


Espectro 15.1

Espectros 15.1-15.4: *p*-Clorobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo



Espectro 15.2



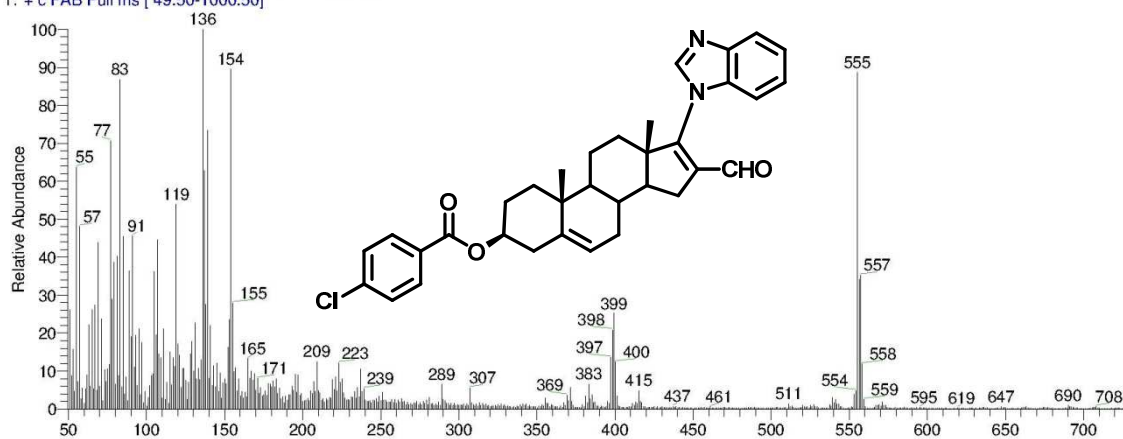
Espectro 15.3

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT4779_1

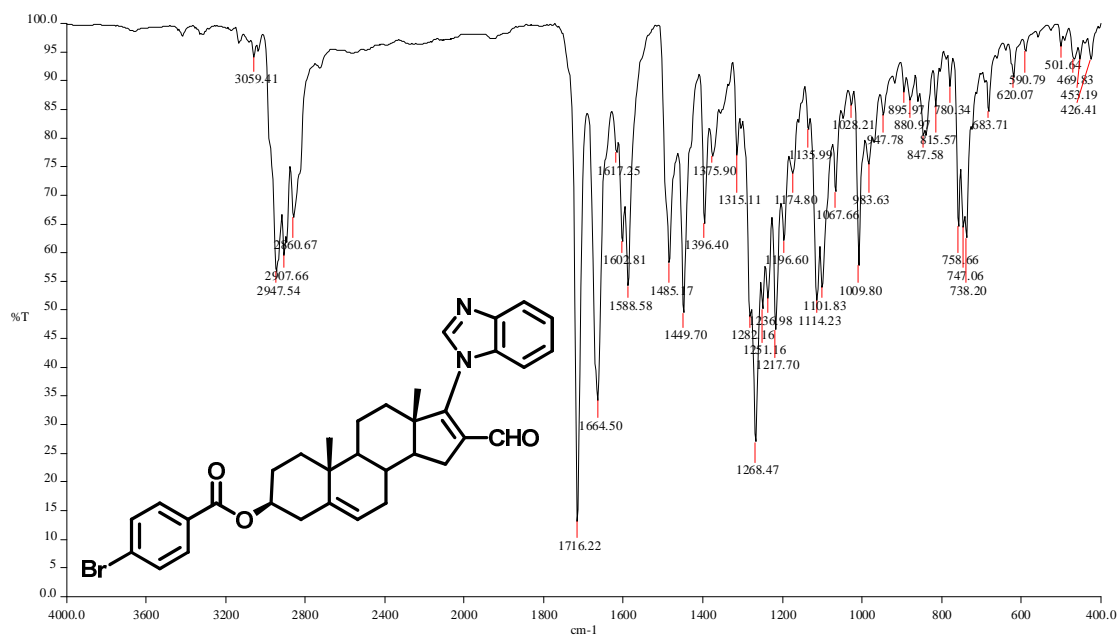
10/5/2010 3:04:55 PM

-CL

OT4779_1 #1-3 RT: 0.00-0.45 AV: 3 NL: 3.47E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

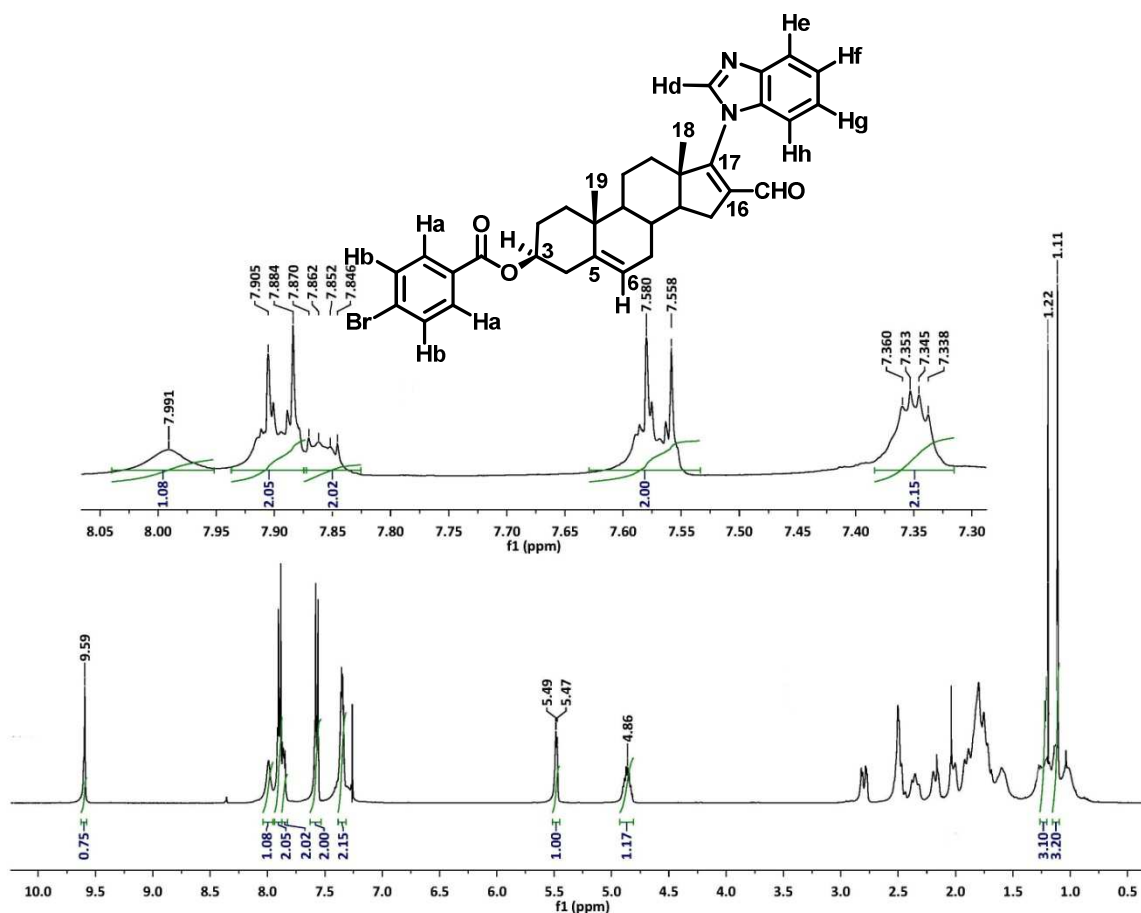


Espectro 15.4

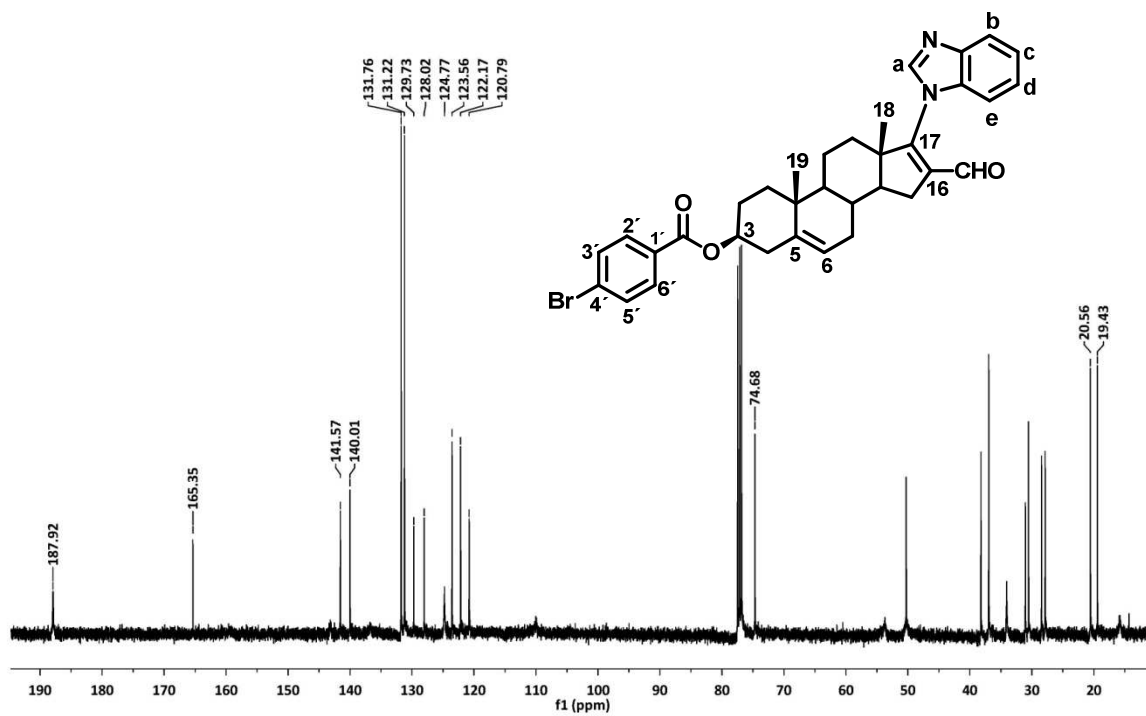


Espectro 16.1

Espectros 16.1-16.4: *p*-Bromobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo



Espectro 16.2



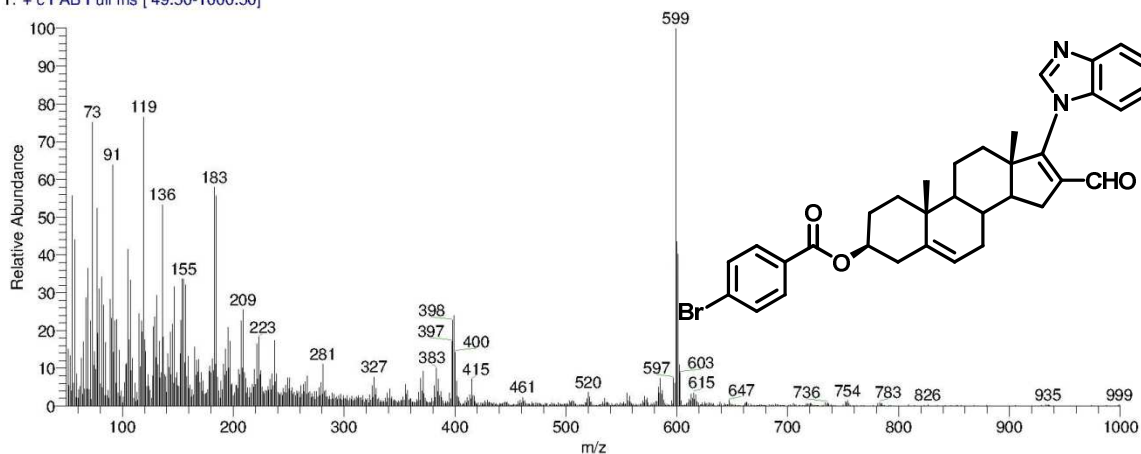
Espectro 16.3

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT5536_1

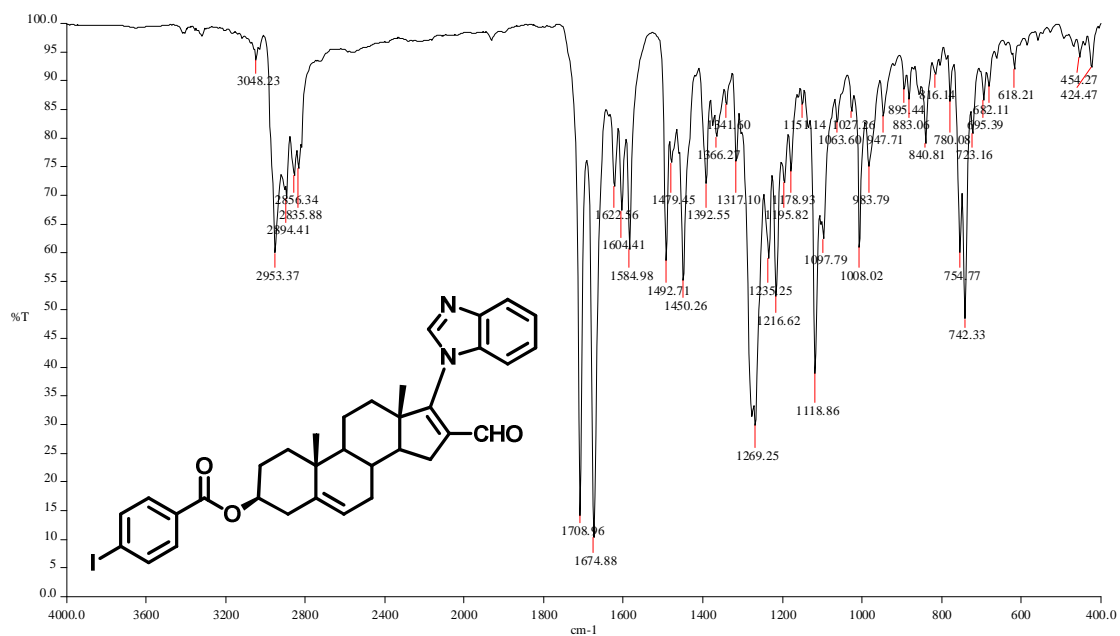
3/3/2011 7:34:42 PM

-BR

OT5536_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.58E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

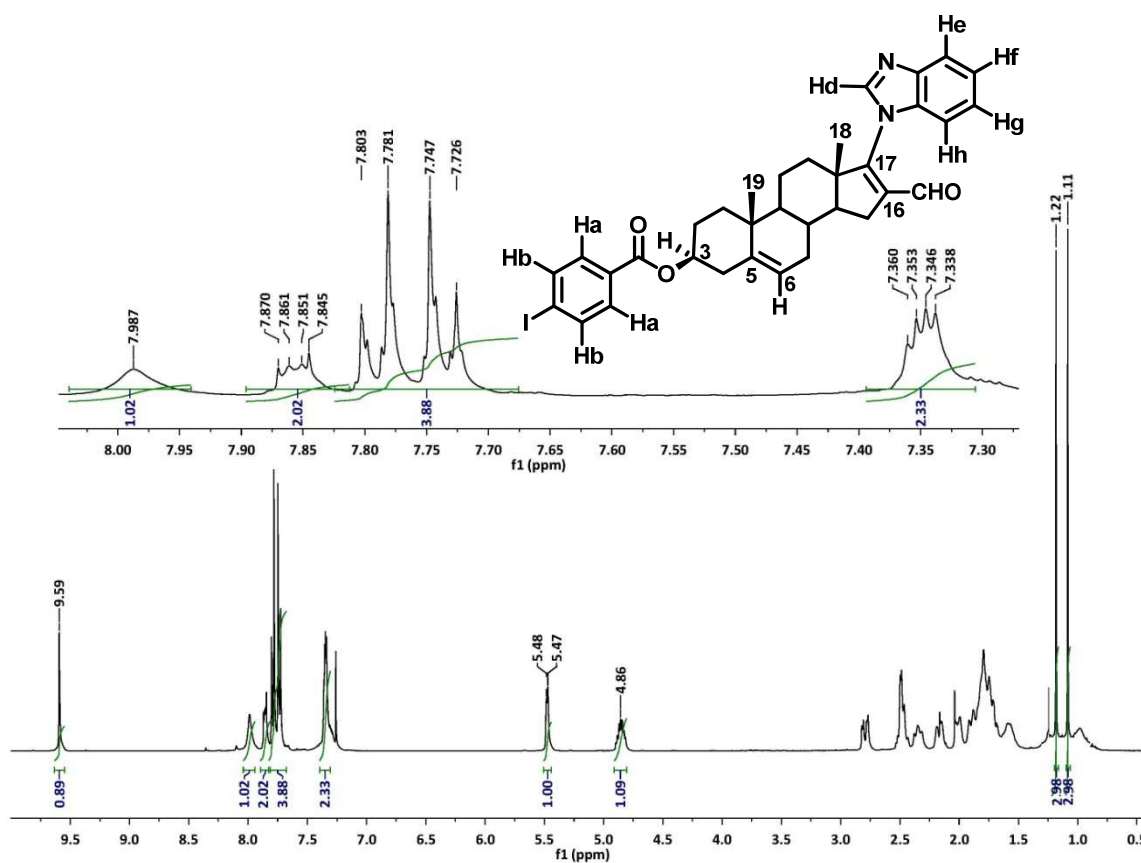


Espectro 16.4

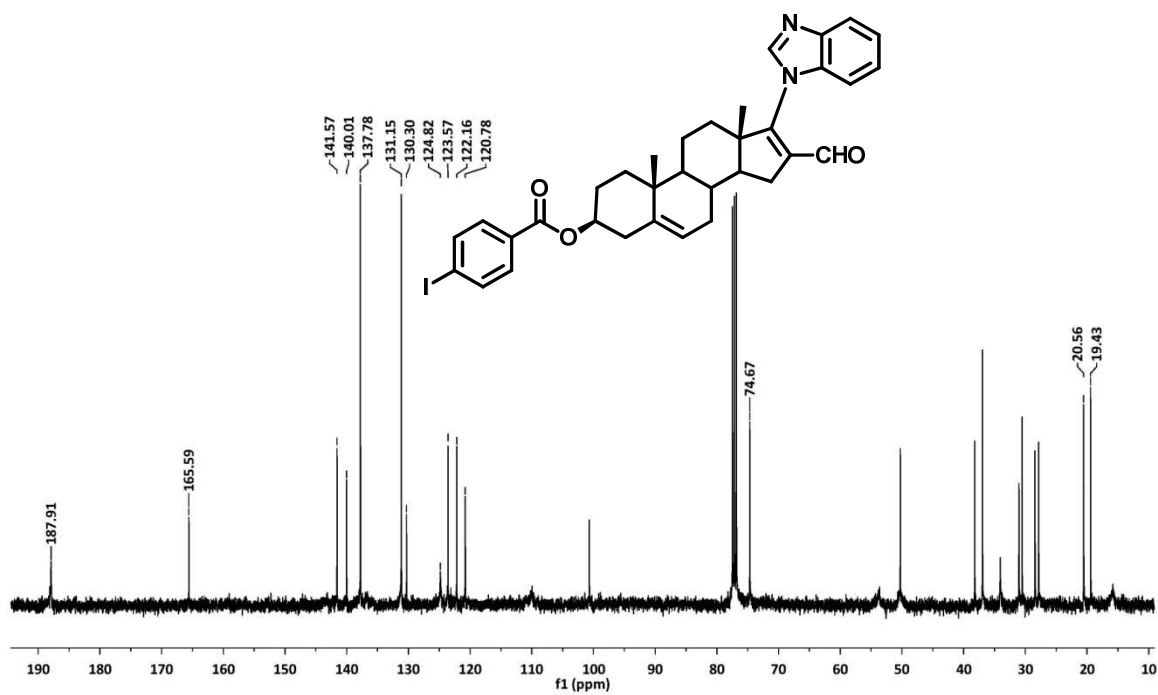


Espectro 17.1

Espectros 17.1-17.4: *p*-Yodobenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3 β -ilo



Espectro 17.2



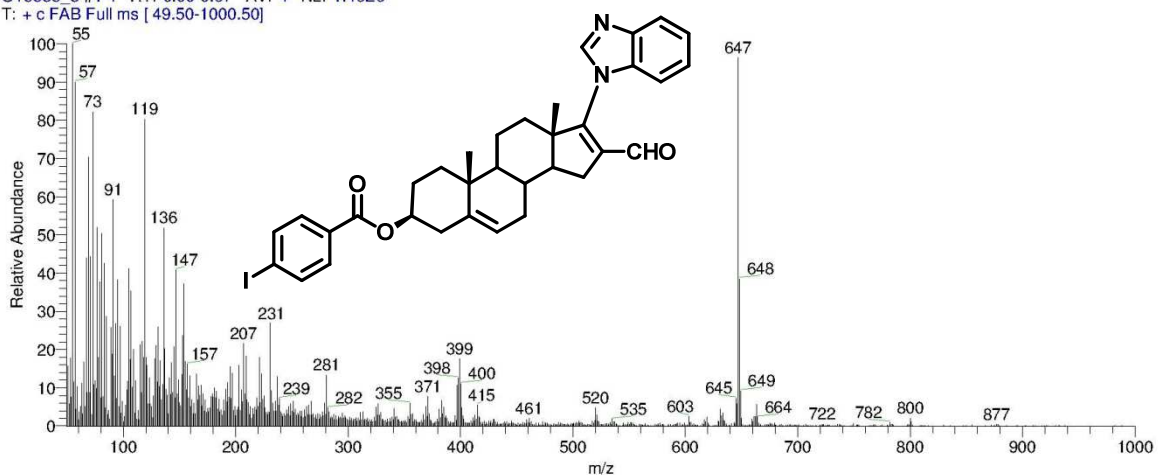
Espectro 17.3

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT5535_3

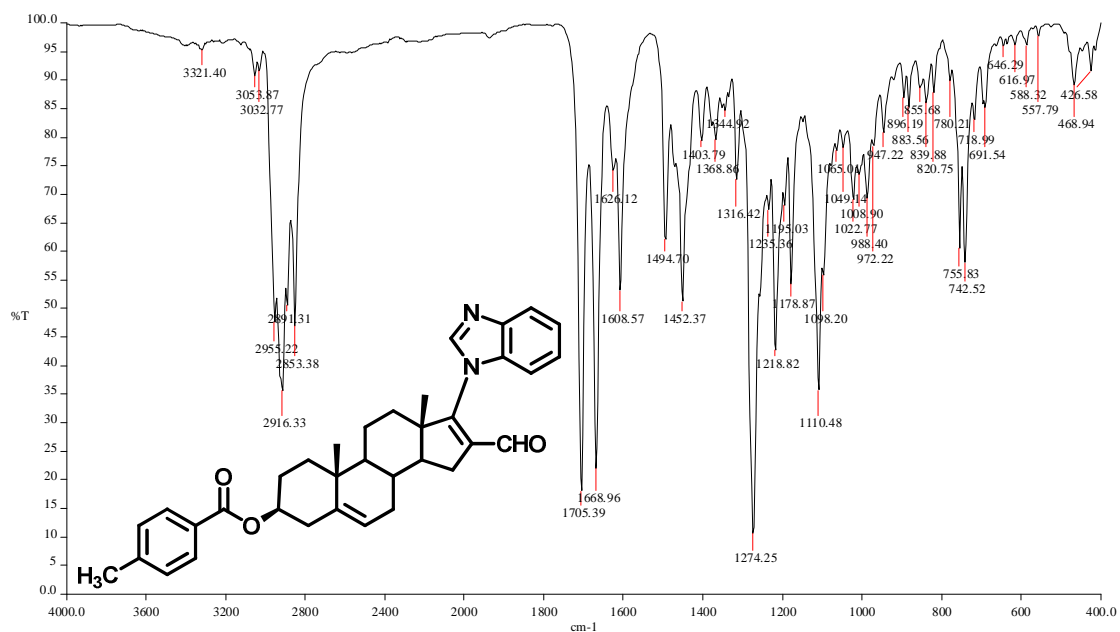
3/3/2011 7:27:36 PM

-1

OT5535_3 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.46E6
 T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

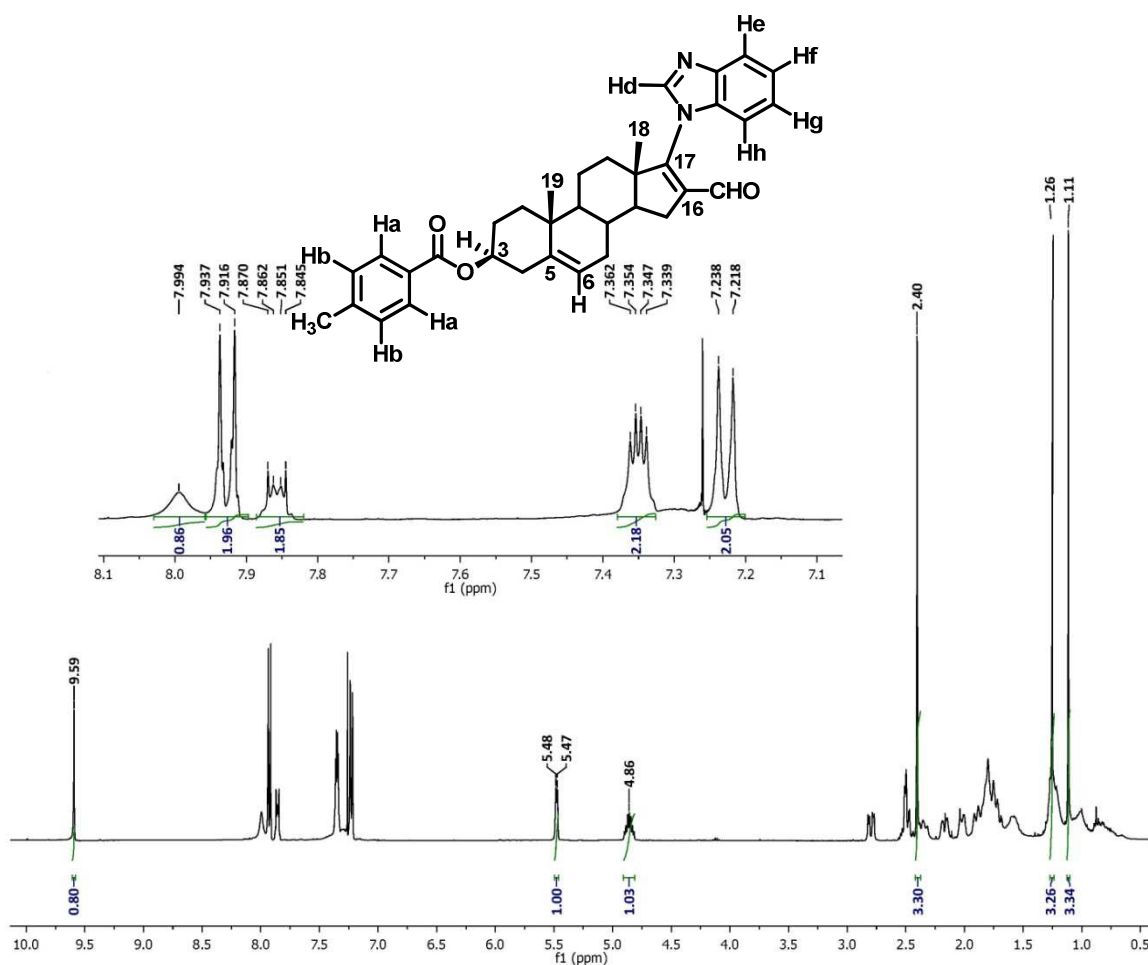


Espectro 17.4

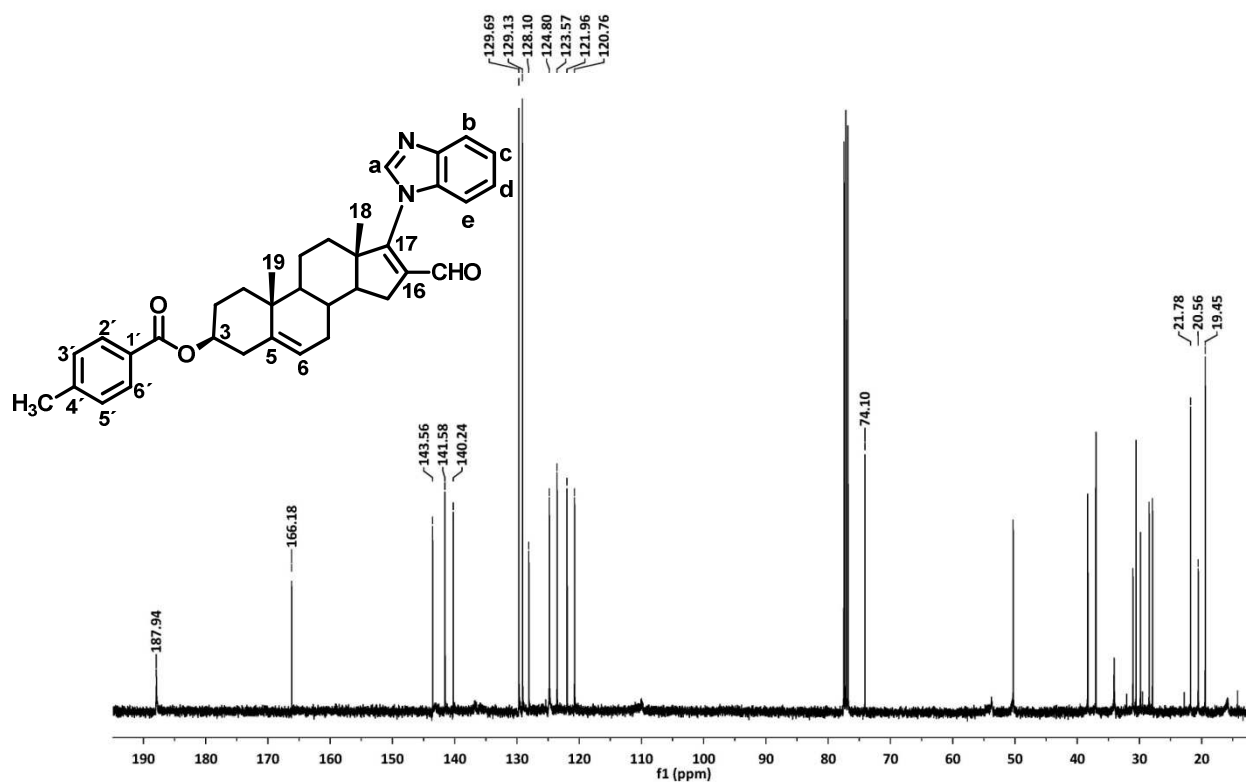


Espectro 18.1

Espectros 18.1-18.4: *p*-Metilbenzoato de 17-(1*H*-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3β-ilo



Espectro 18.2



Espectro 18.3

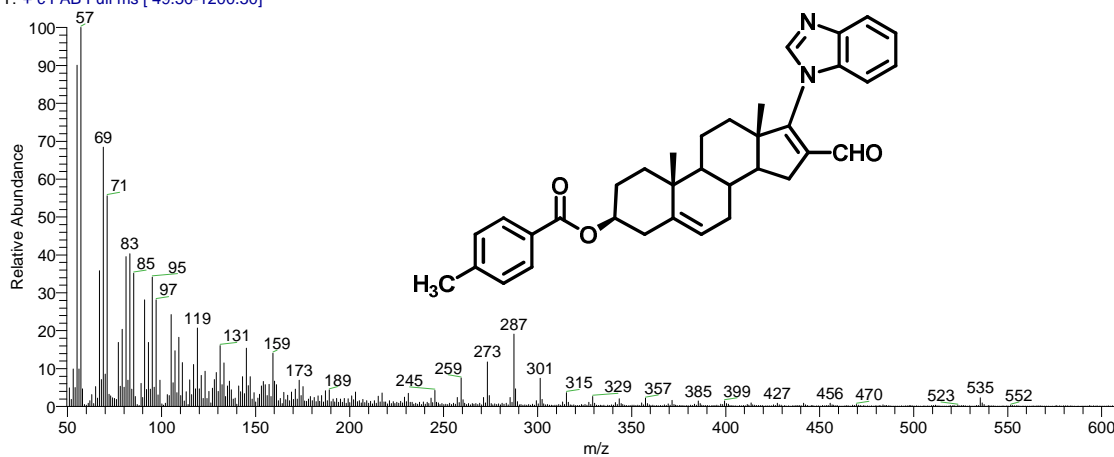
D:\Xcalibur\data\USANFAB\OT4416_1

7/30/2010 1:52:02 PM

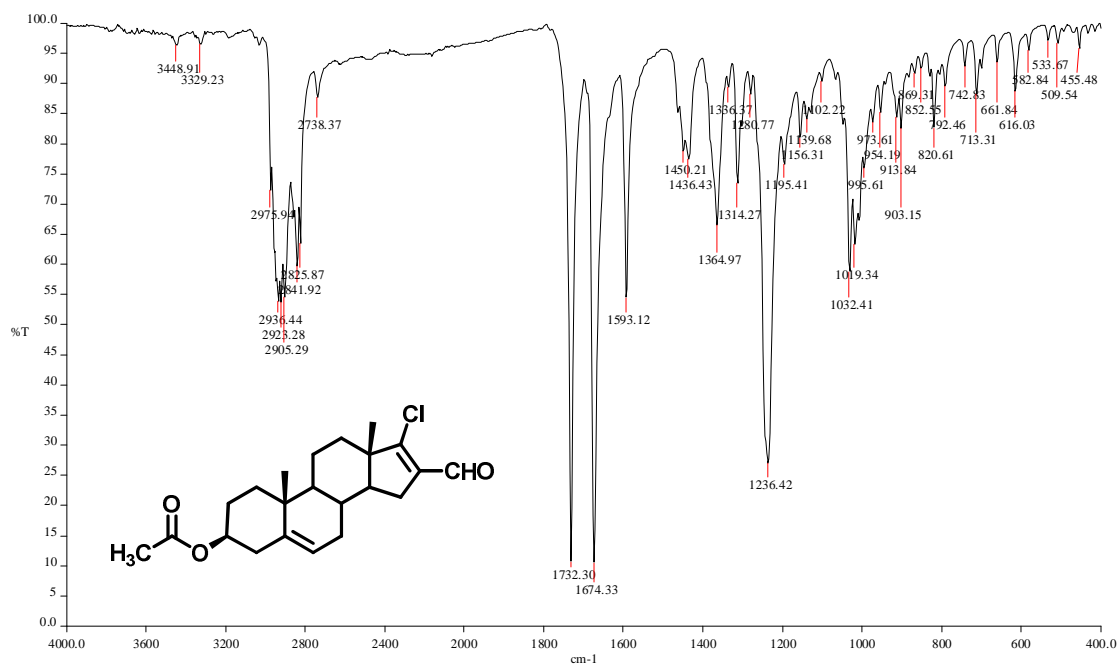
CH3-SUST

OT4416_1 #1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 1.50E7

T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]

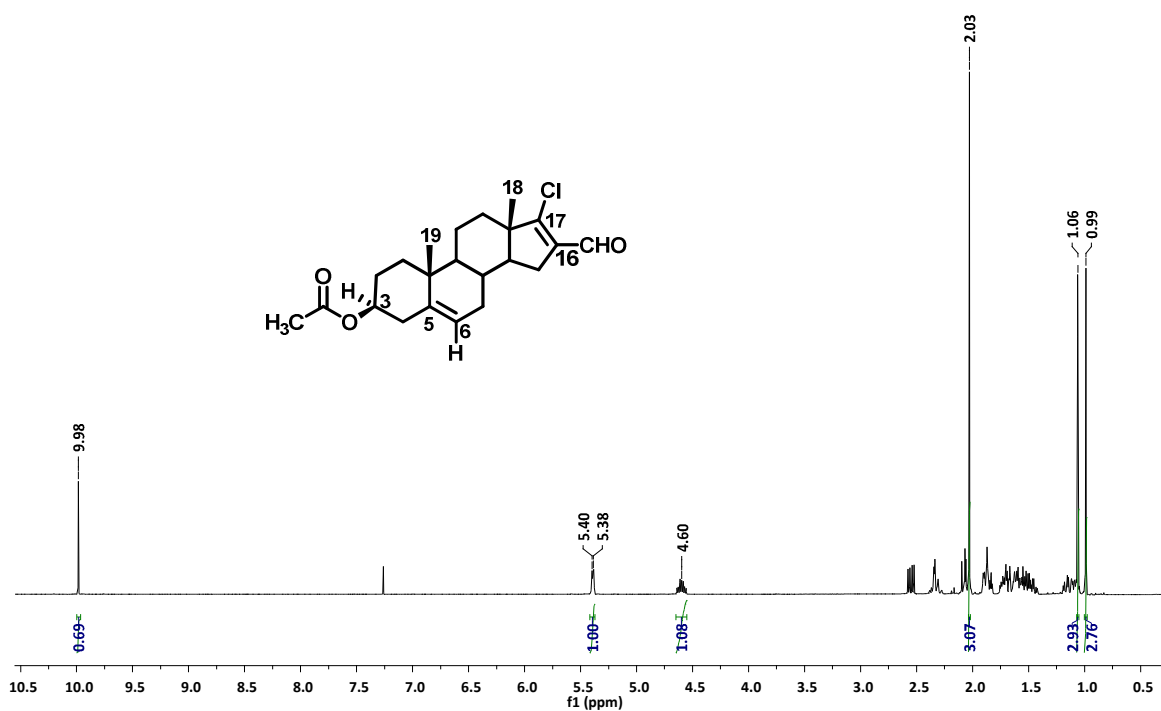


Espectro 18.4

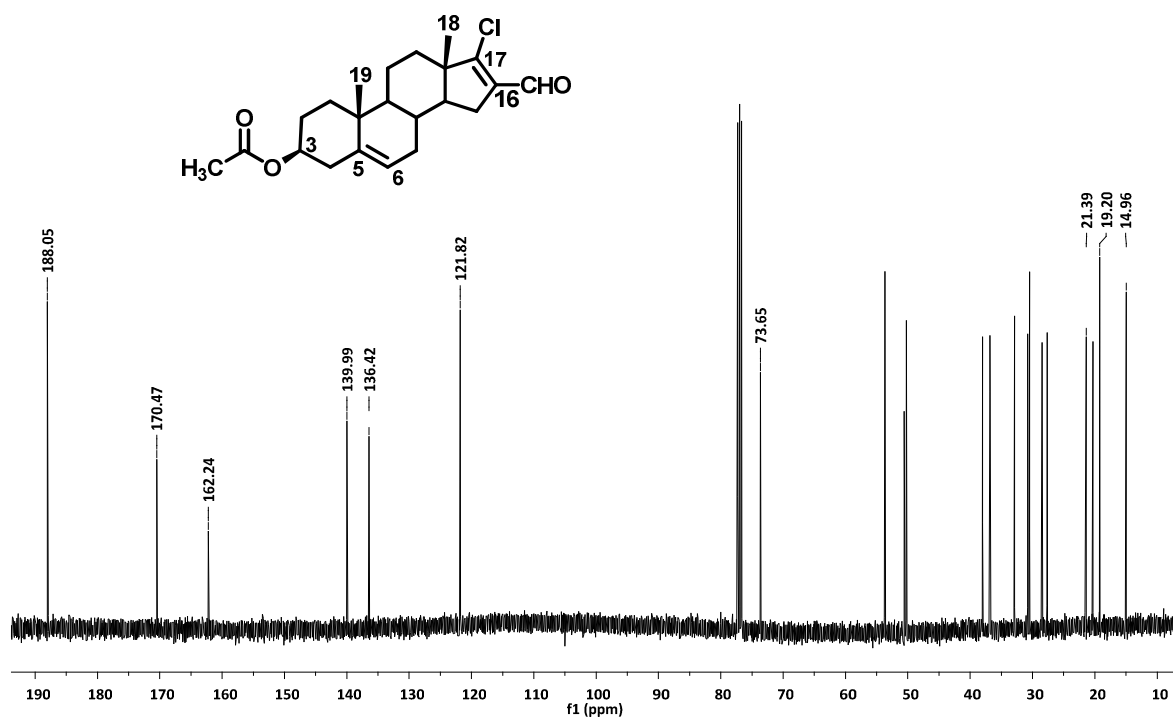


Espectro 19.1

Espectros 19.1-19.4: Acetato de 17-cloro-16-formilandrost-5,16-dien-3β-ilo



Espectro 19.2



Espectro 19.3

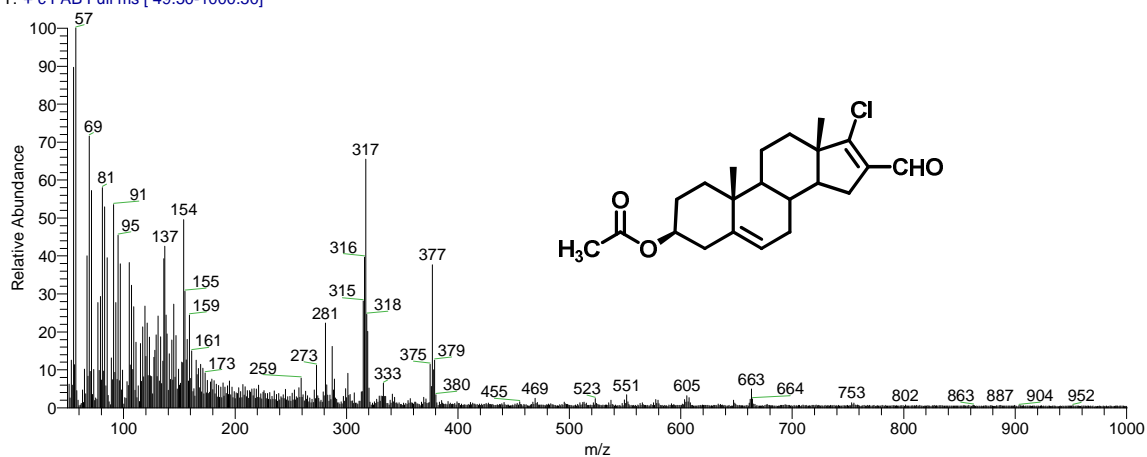
D:\Xcalibur\data\USANFAB\OT6027_1

5/20/2011 1:12:38 PM

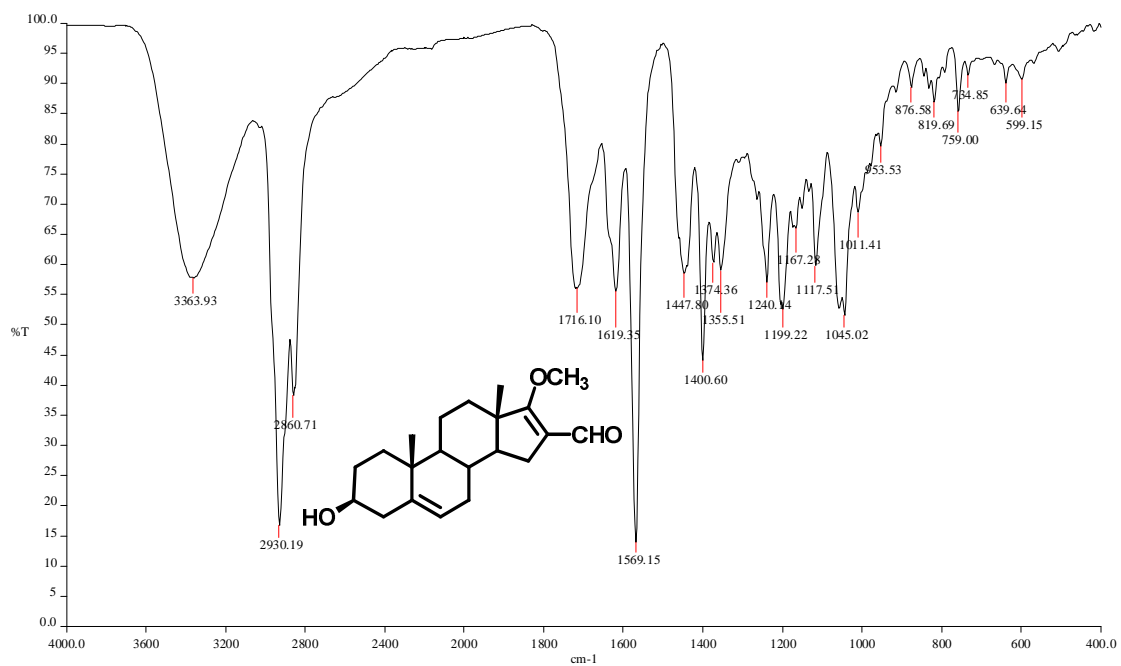
-UVMHACO

OT6027_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 5.96E6

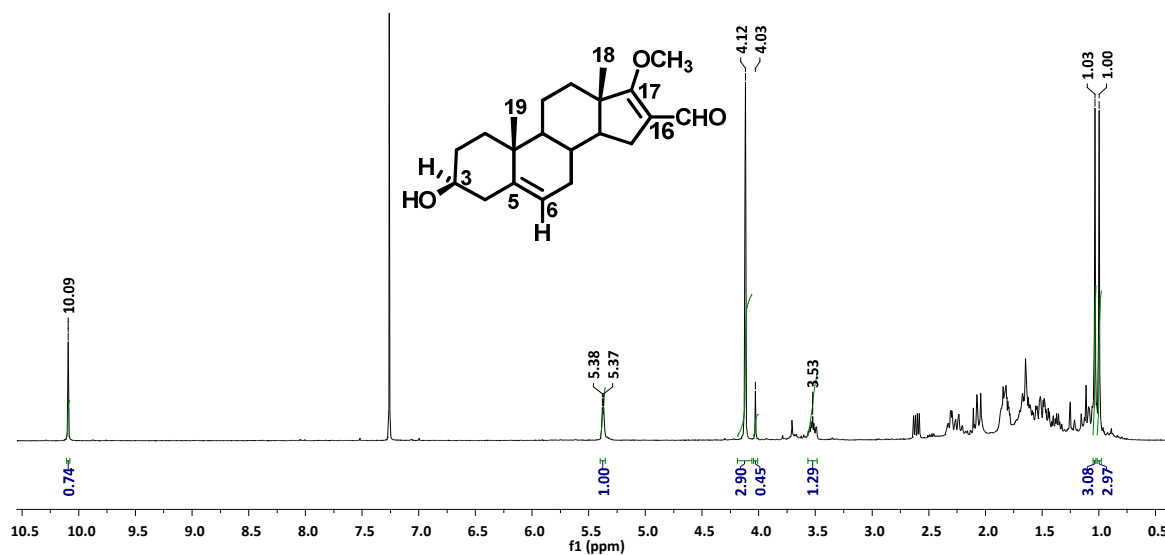
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



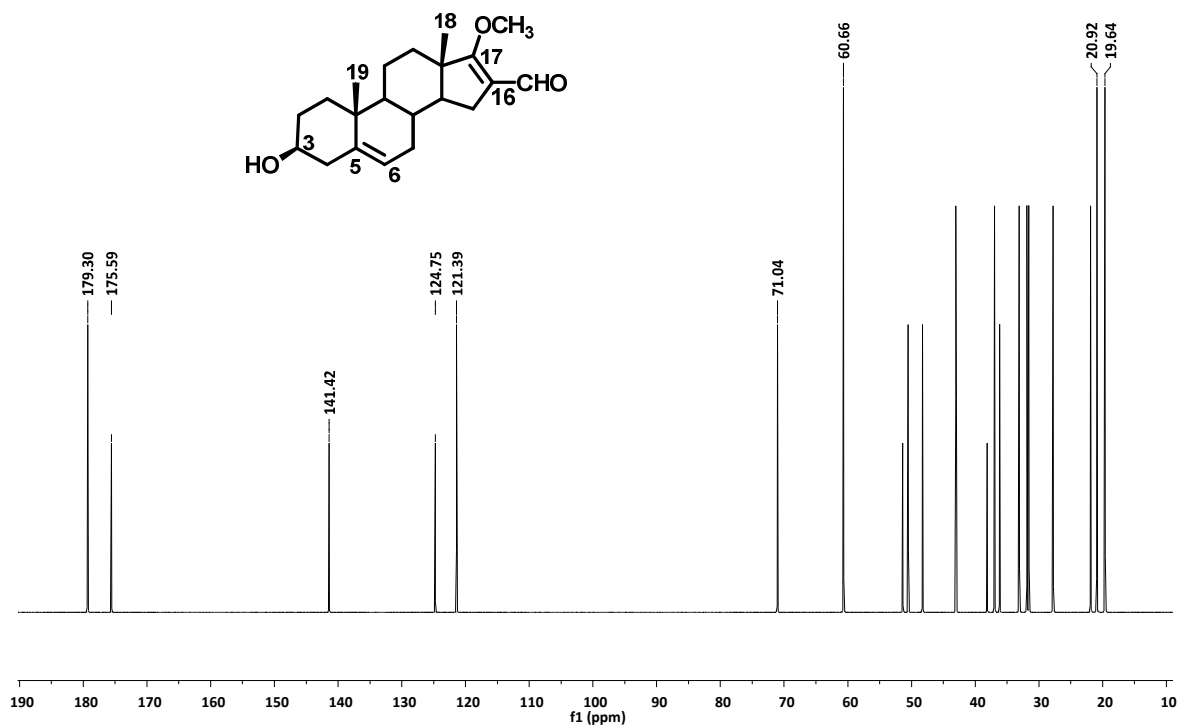
Espectro 19.4



Espectro 20.1
Espectros 20.1-20.4: 16-Formil-17-metoxiandrosto-5,16-dien-3β-ol



Espectro 20.2



Espectro 20.3

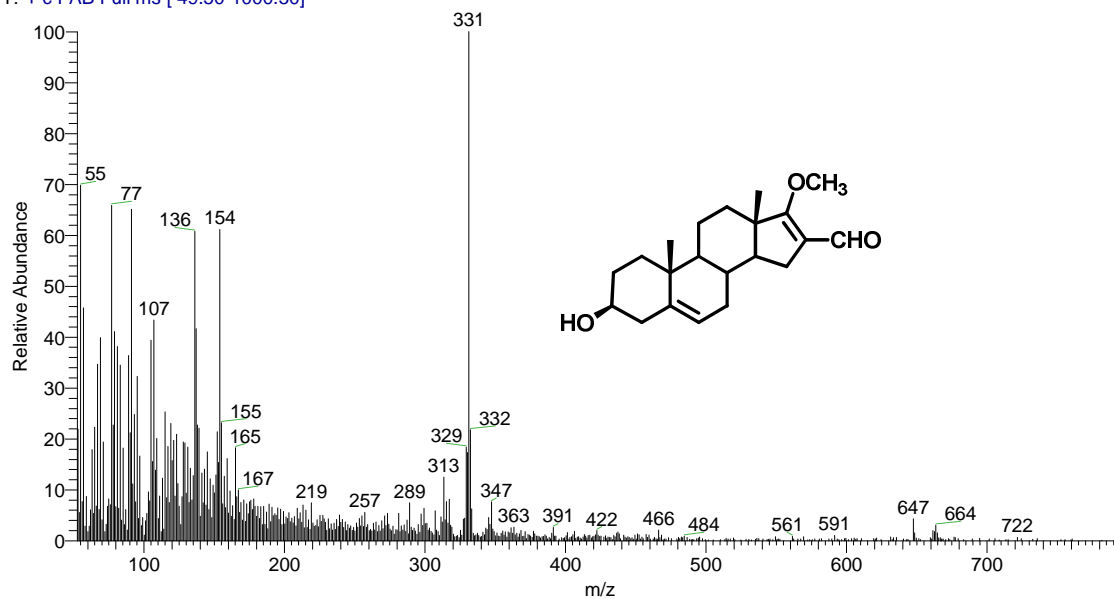
D:\Xcalibur\data\USANFAB\OT5224_2

1/20/2011 7:00:17 PM

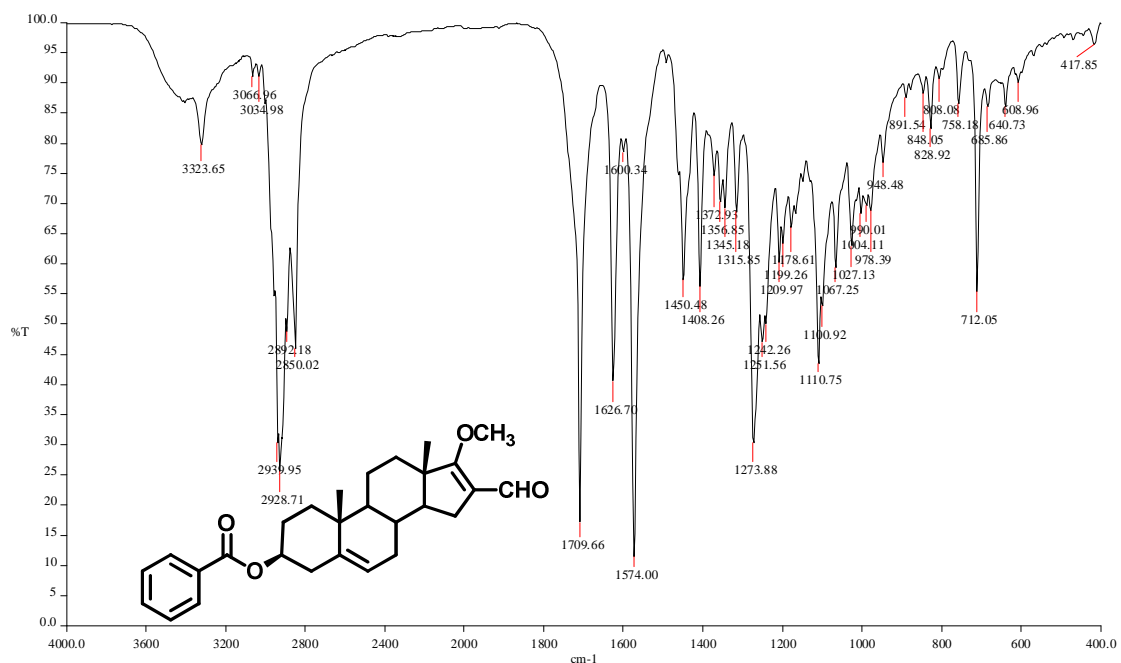
-OME

OT5224_2 #2-3 RT: 0.22-0.45 AV: 2 NL: 1.04E6

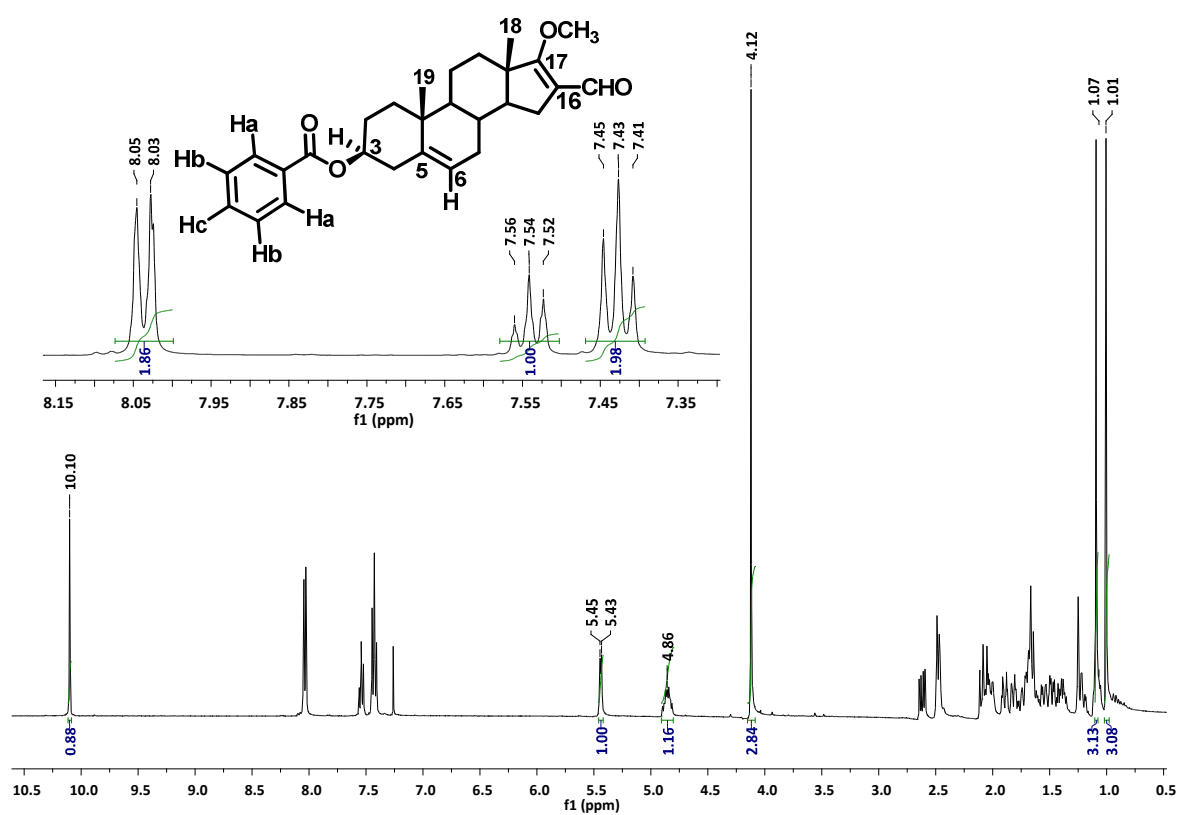
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



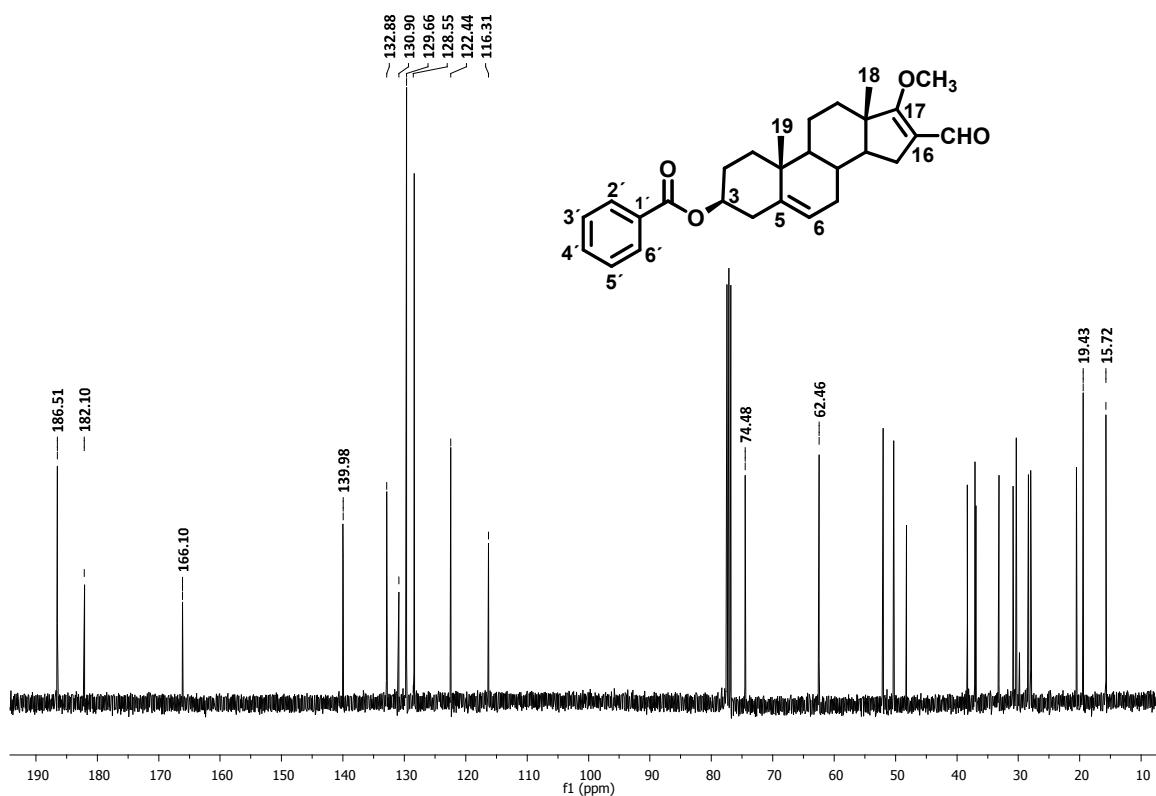
Espectro 20.4



Espectro 21.1
Espectros 21.1-21.4: Benzoato de 16-formil-17-metoxiandro-5,16-dien-3β-ilo



Espectro 21.2



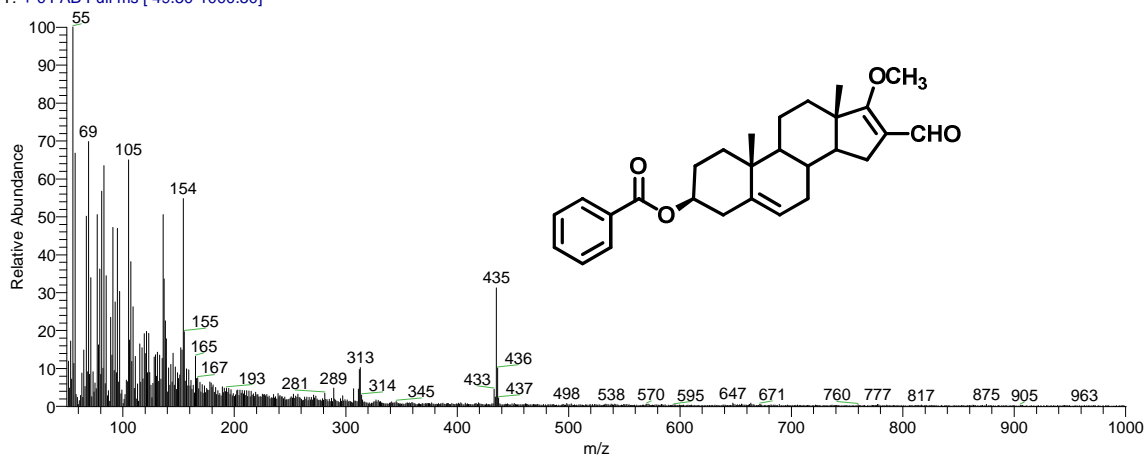
Espectro 21.3

D:\Xcalibur\data\USAINFAB\OT5410_1

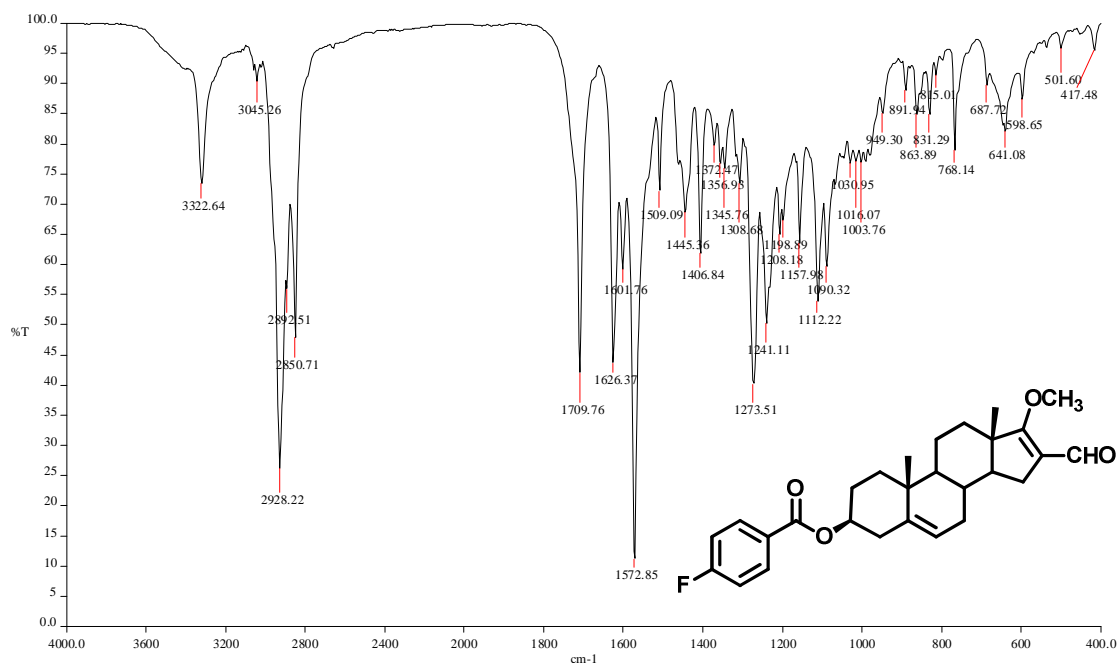
2/10/2011 2:32:38 PM

-OME-PH

OT5410_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 4.45E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

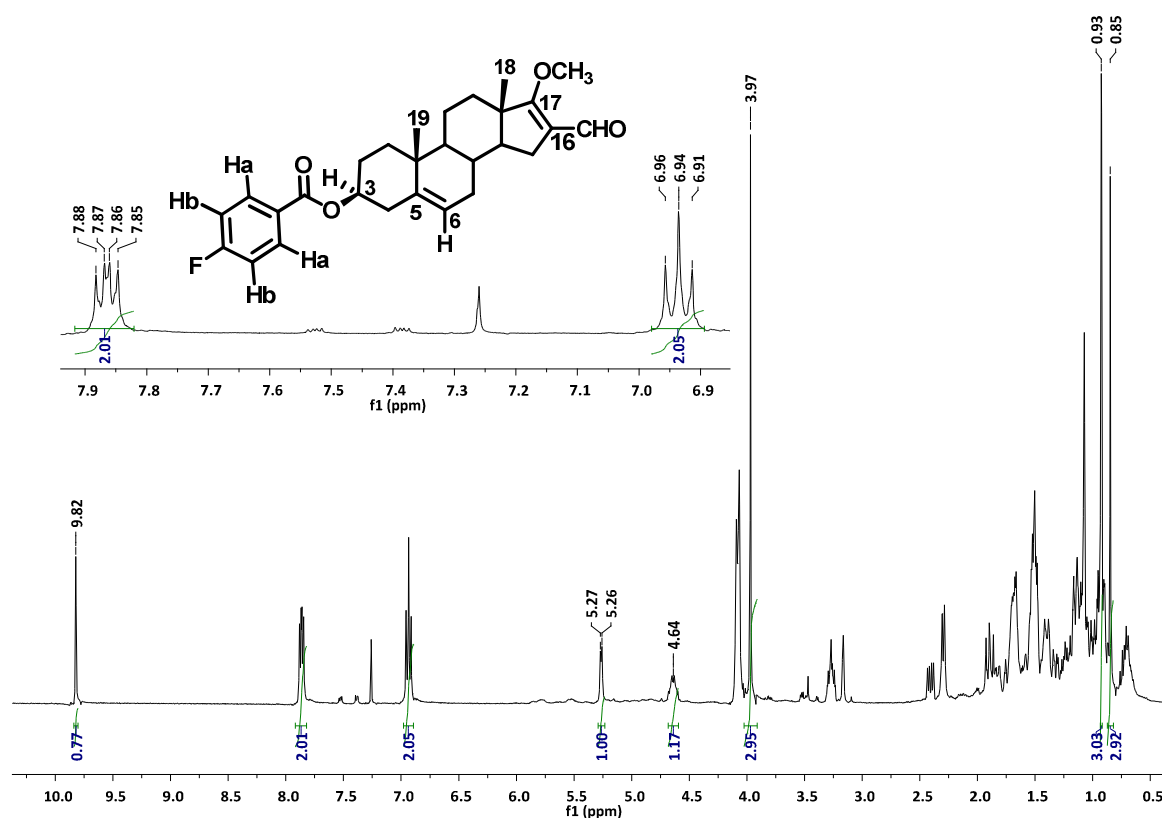


Espectro 21.4

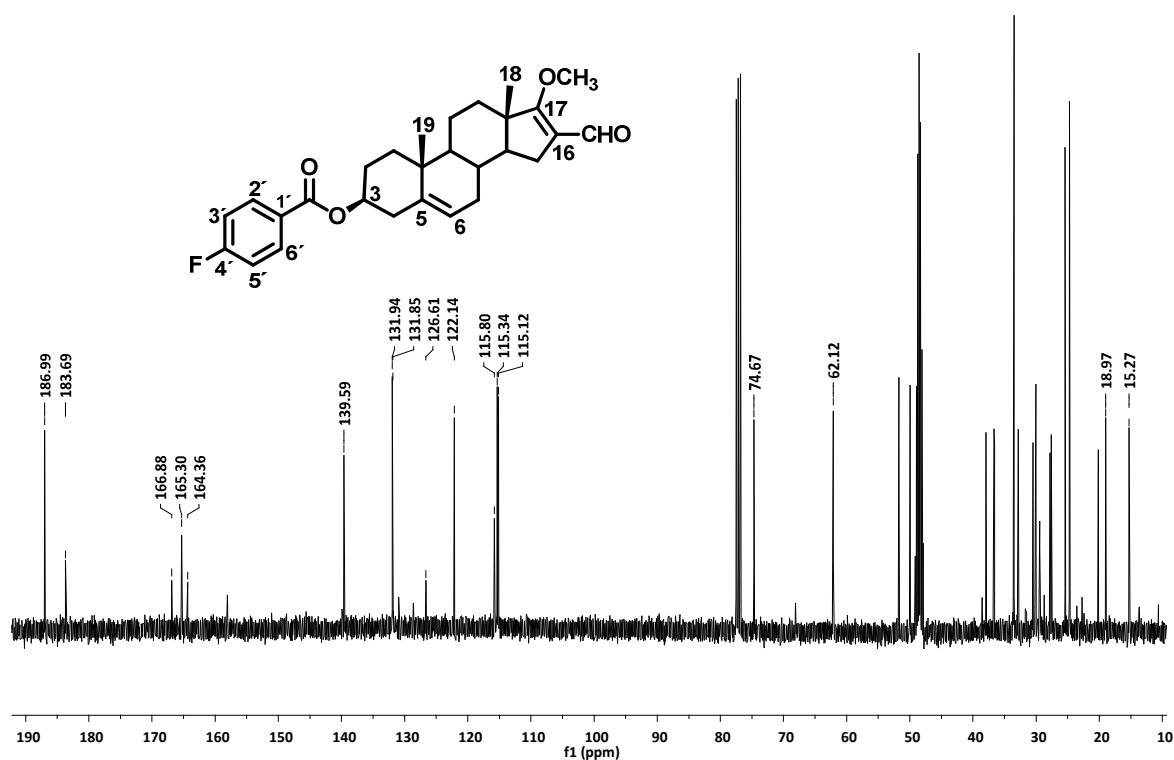


Espectro 22.1

Espectros 22.1-22.4: *p*-Fluorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo



Espectro 22.2



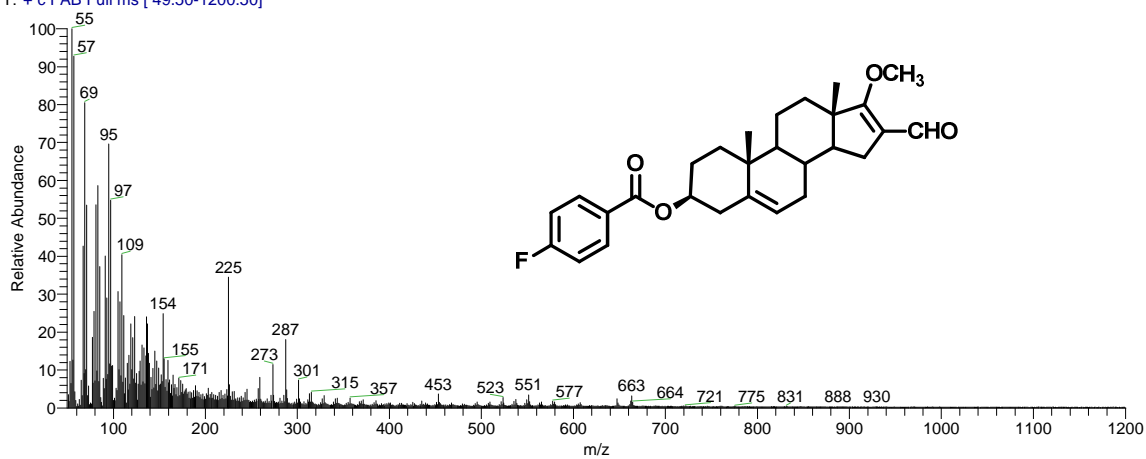
Espectro 22.3

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT5914_1

5/5/2011 7:15:32 PM

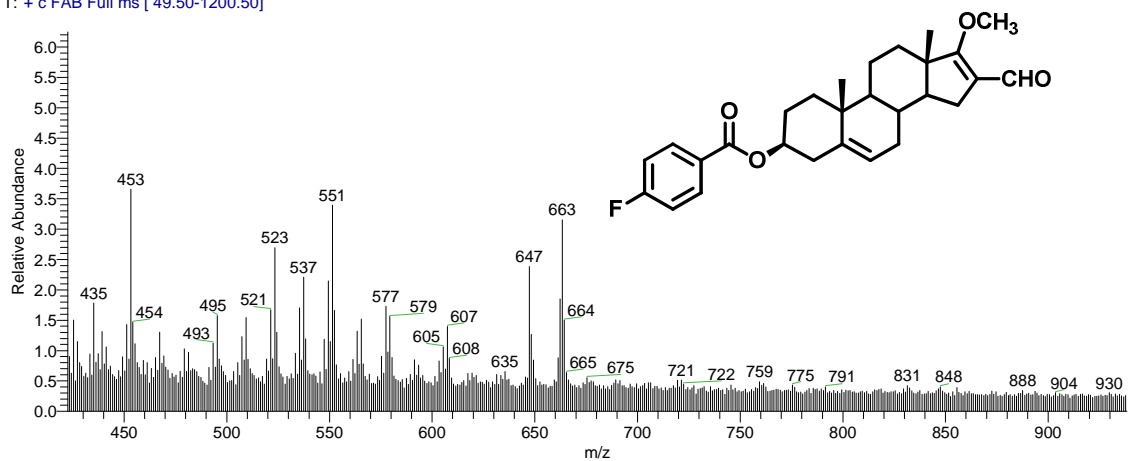
-FOME

OT5914_1 #1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 1.54E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]

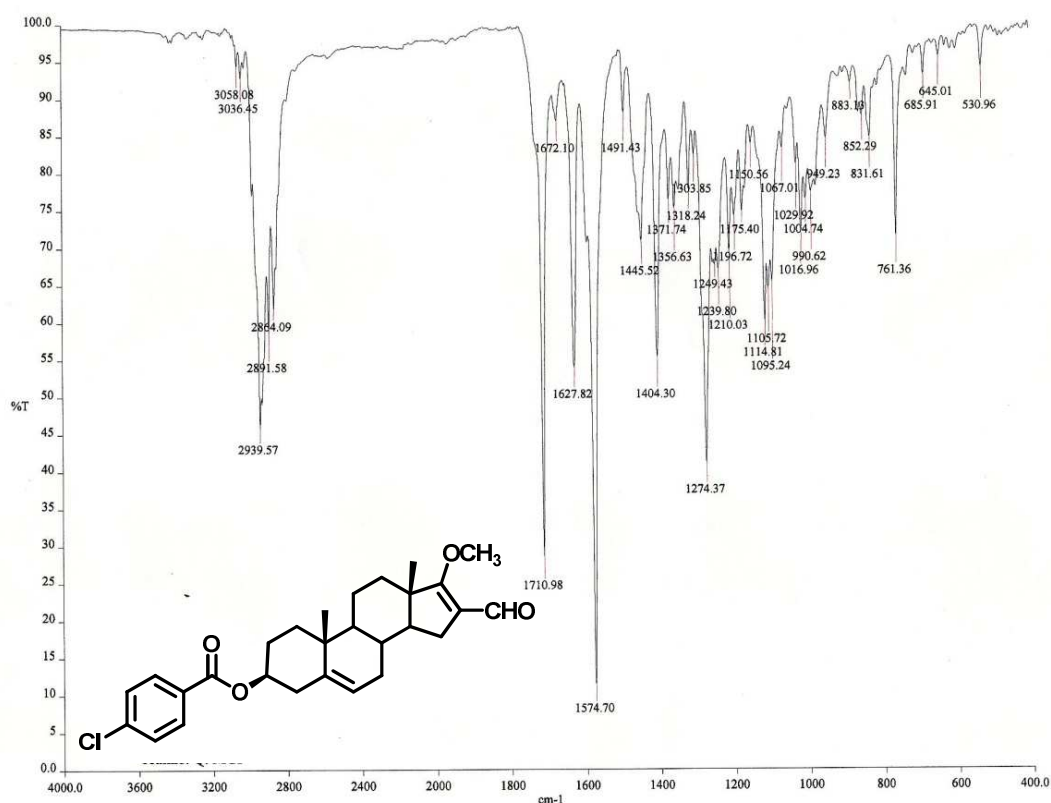


Espectro 22.4

OT5914_1 #1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 1.54E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]

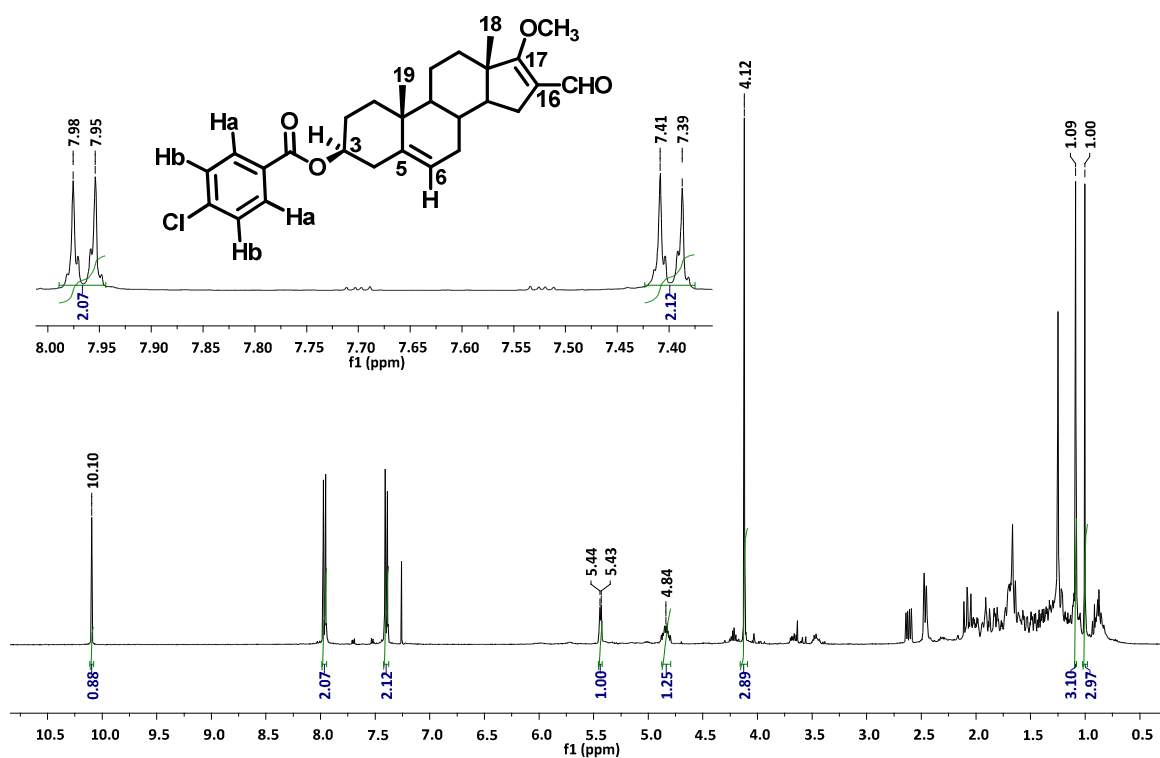


Espectro 22.4.1

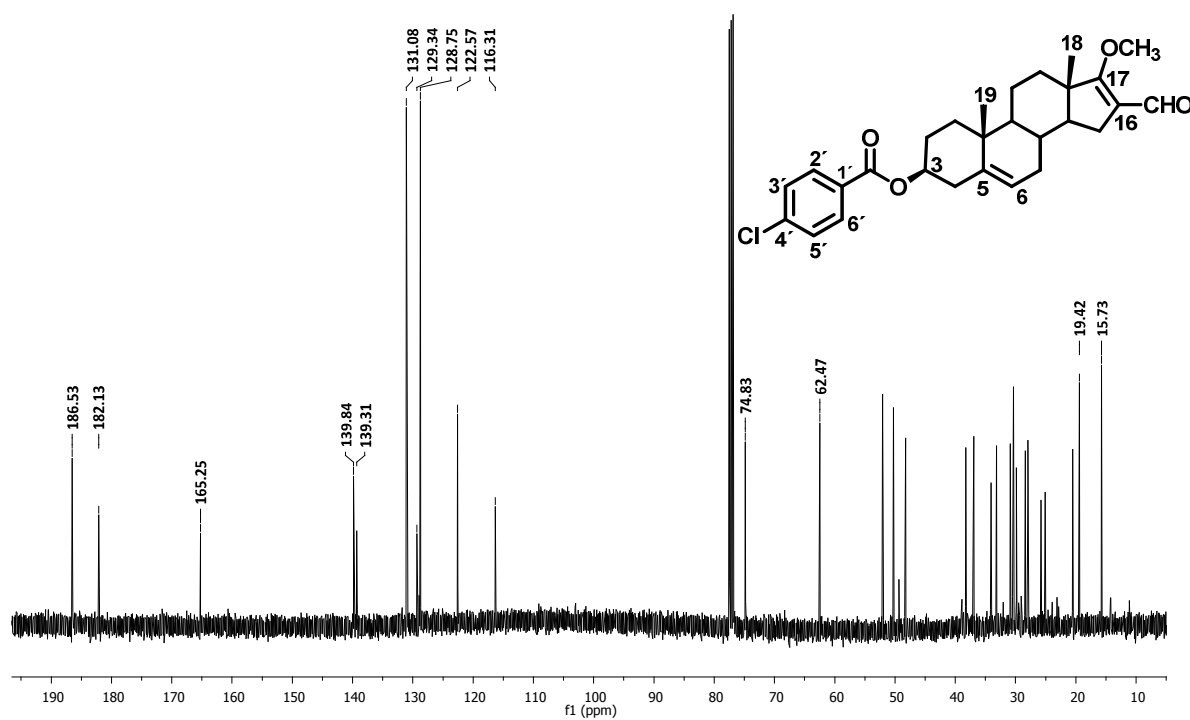


Espectro 23.1

Espectros 23.1-23.4.1: *p*-Clorobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3-ilo



Espectro 23.2



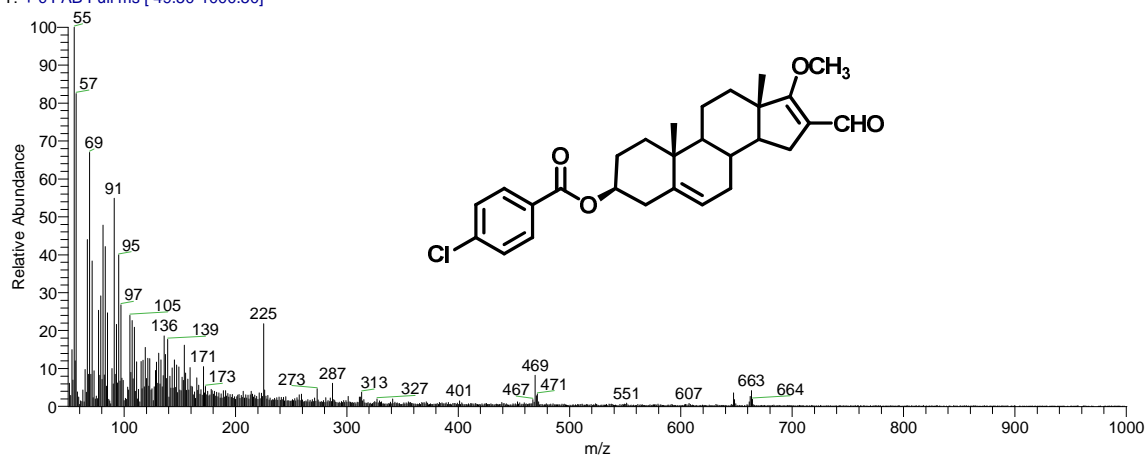
Espectro 23.3

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT6026_1

5/20/2011 1:08:53 PM

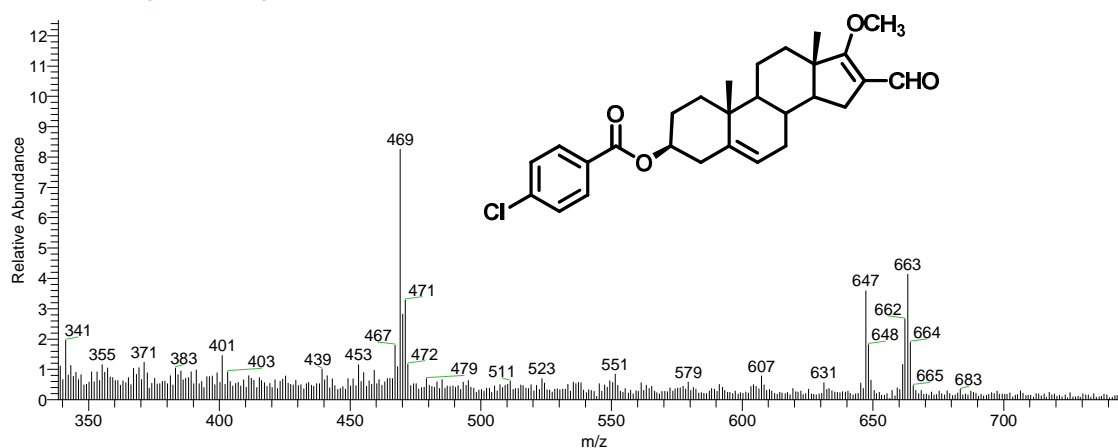
-OMECL

OT6026_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 5.38E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

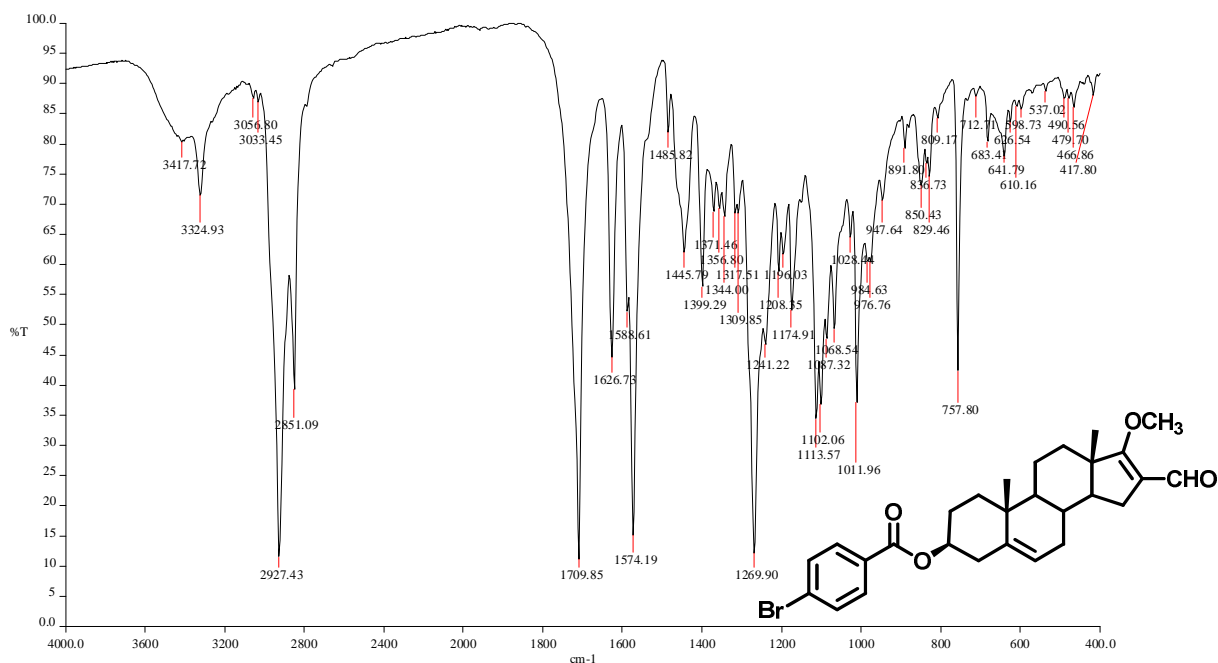


Espectro 23.4

OT6026_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 5.38E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

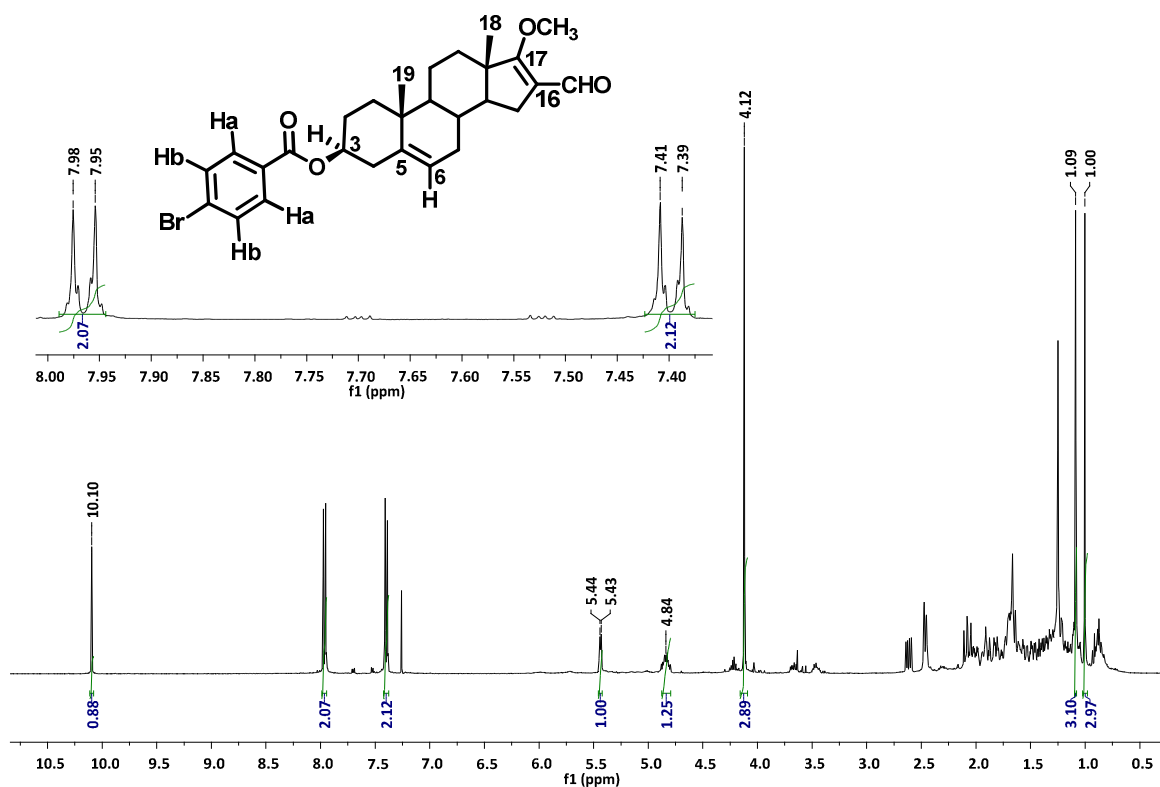


Espectro 23.4.1

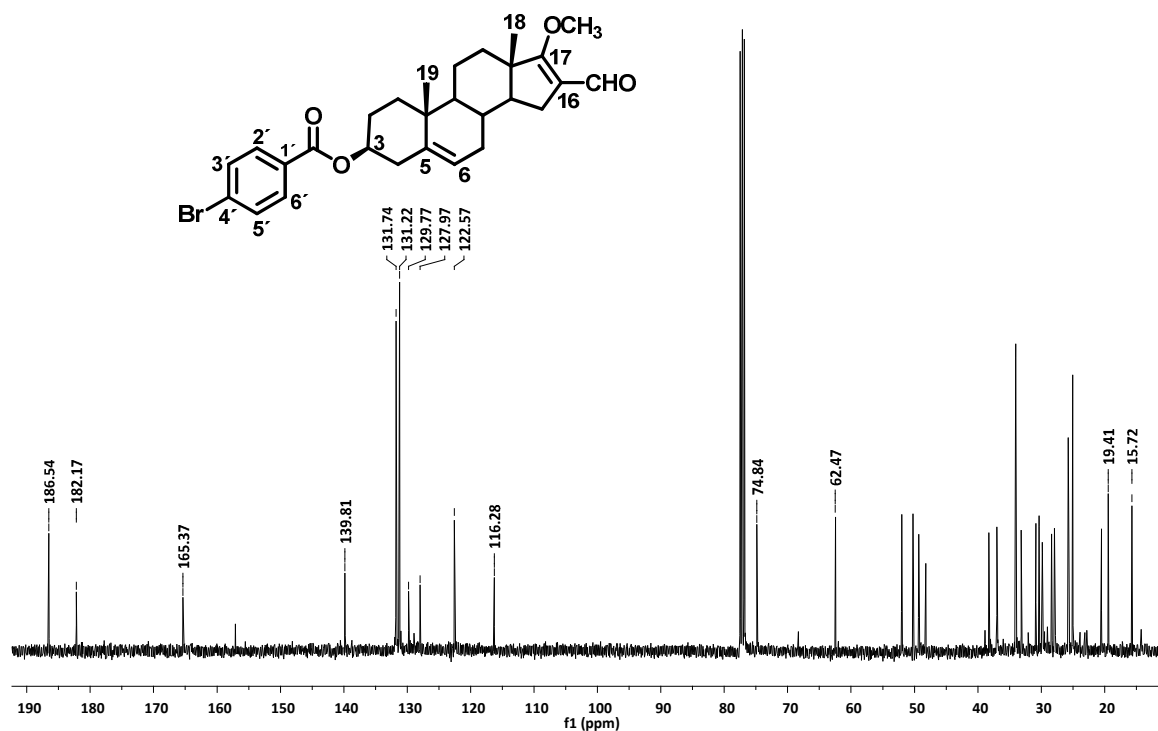


Espectro 24.1

Espectros 24.1-24.4.1: *p*-Bromobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrost-5,16-dien-3 β -ilo



Espectro 24.2



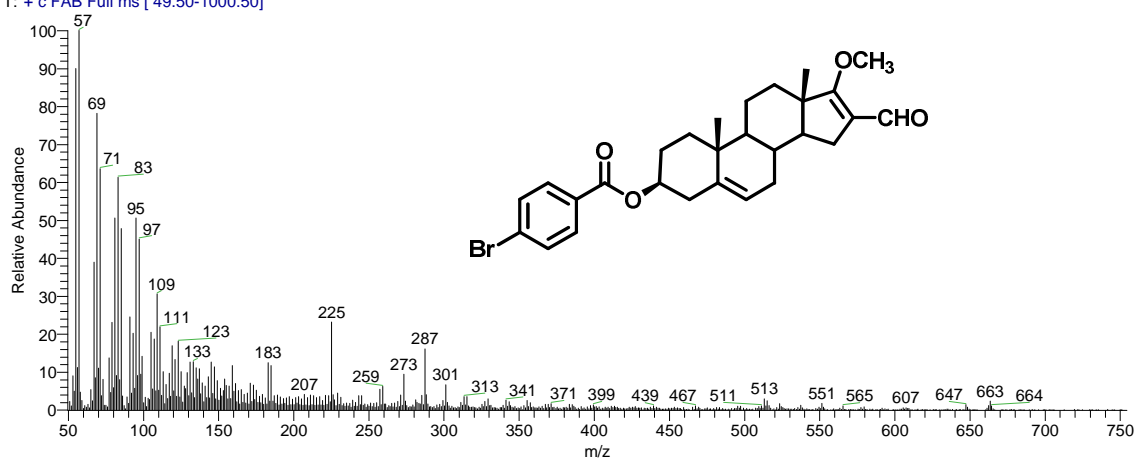
Espectro 24.3

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT6143_1
szComment

6/10/2011 4:56:44 PM

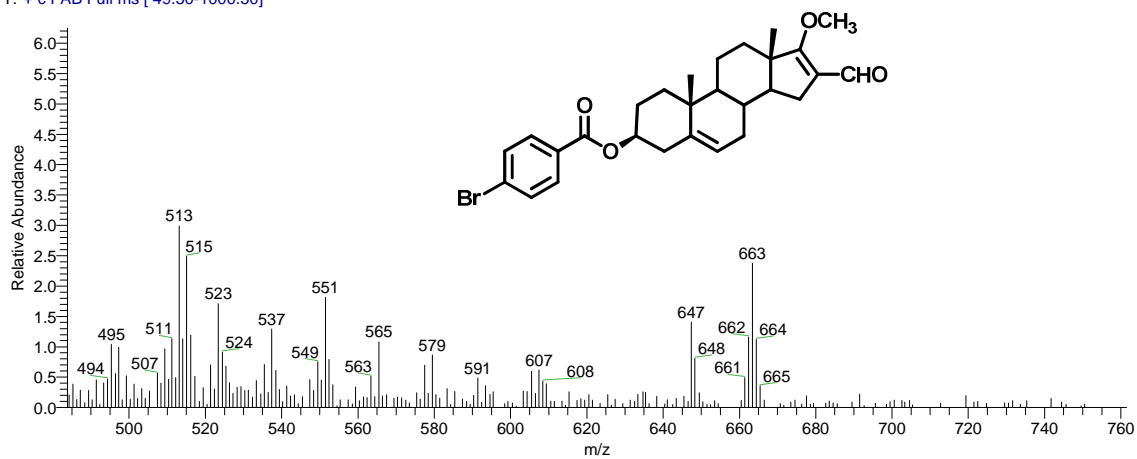
-OMEBR

OT6143_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 2.31E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

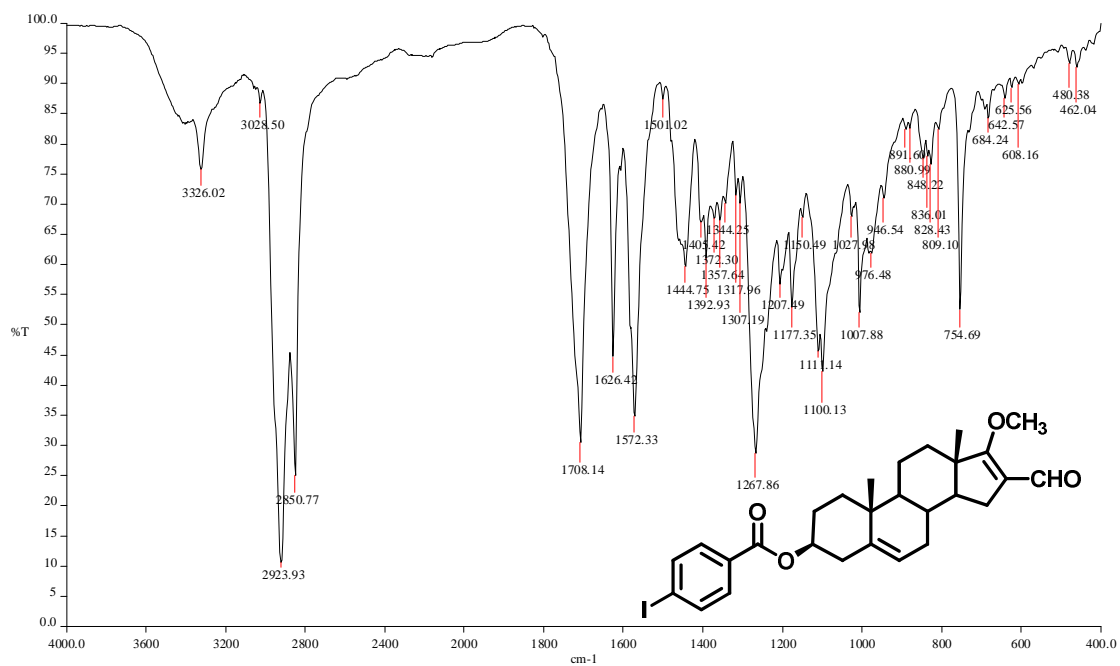


Espectro 24.4

OT6143_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 2.31E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

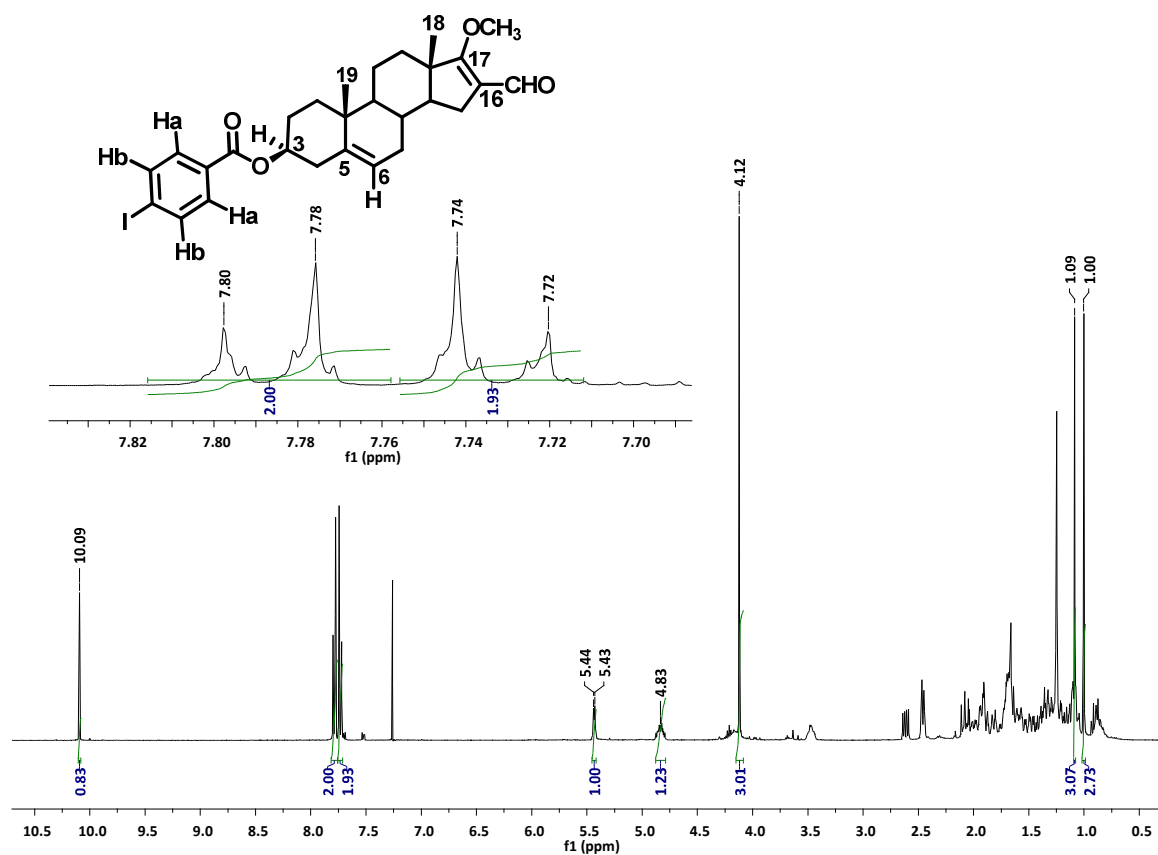


Espectro 24.4.1

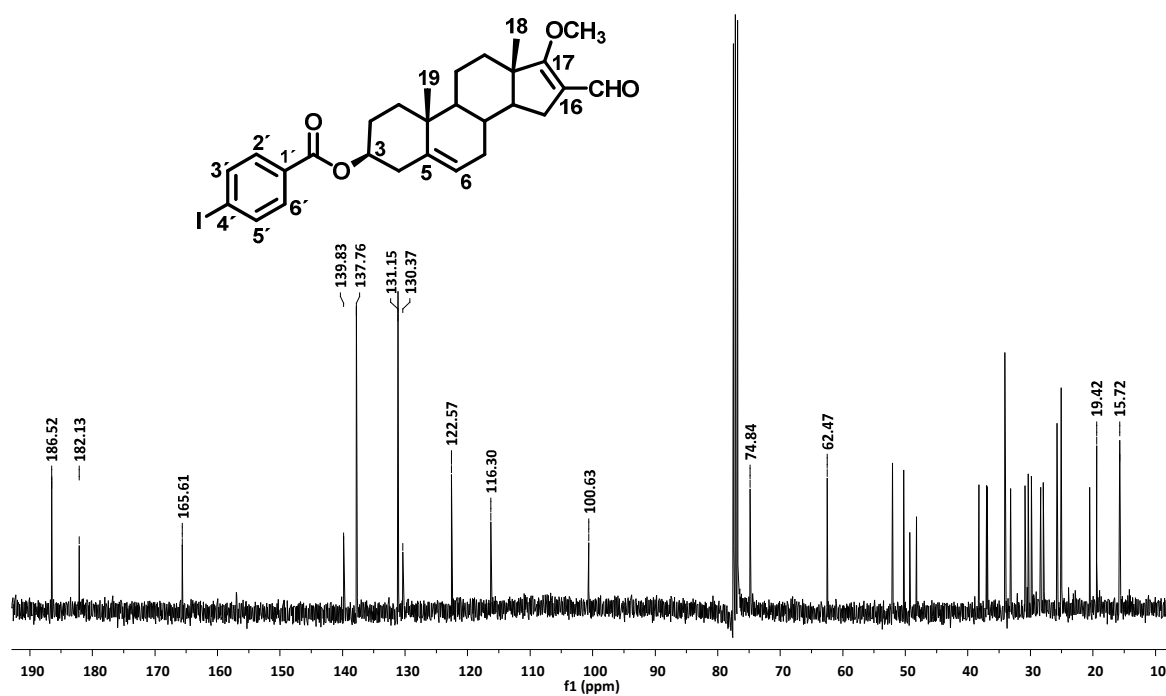


Espectro 25.1

Espectros 25.1-25.5.1: *p*-Yodobenzoato de 16-formil-17-metoxiandrosto-5,16-dien-3β-ilo



Espectro 25.2



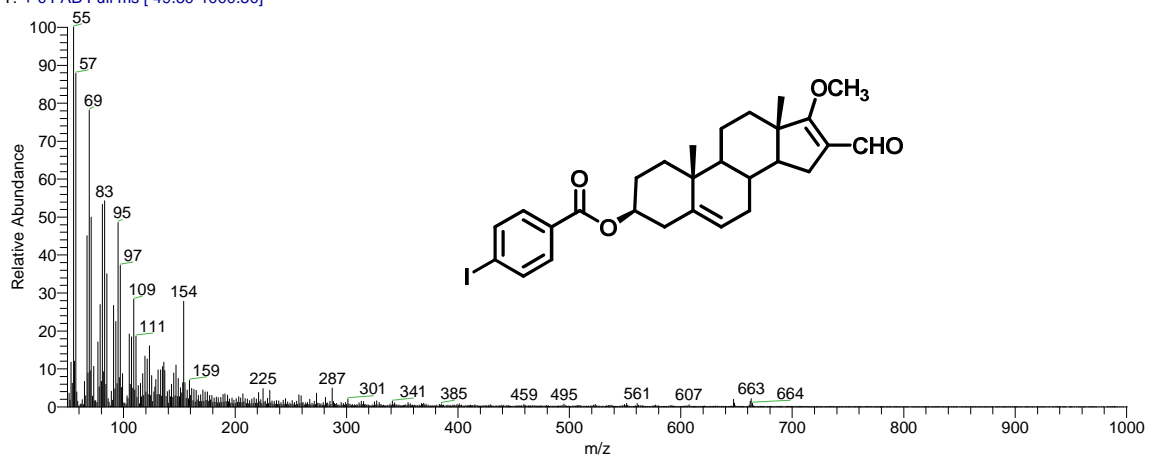
Espectro 25.3

D:\Xcalibur\data\USANFAB\OT6369_1

8/4/2011 3:10:18 PM

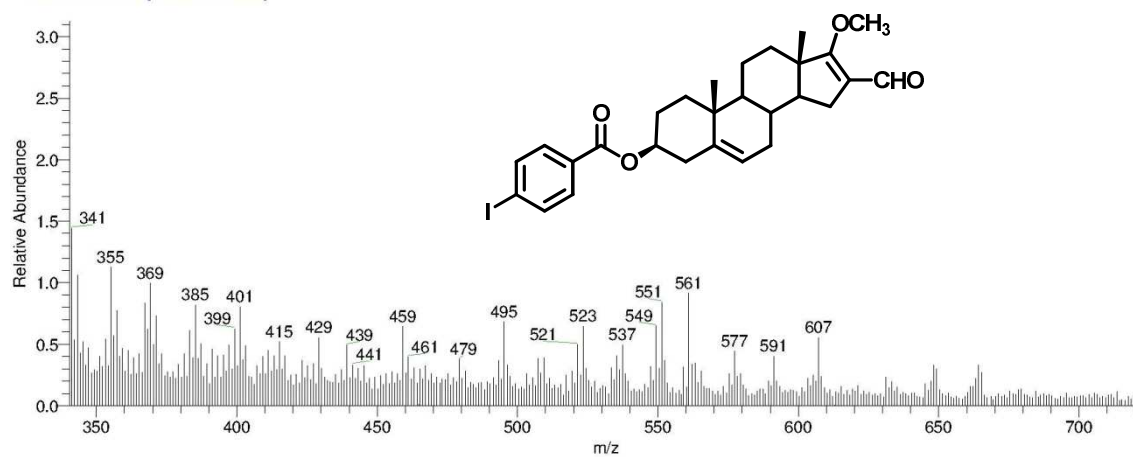
-OME

OT6369_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.33E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

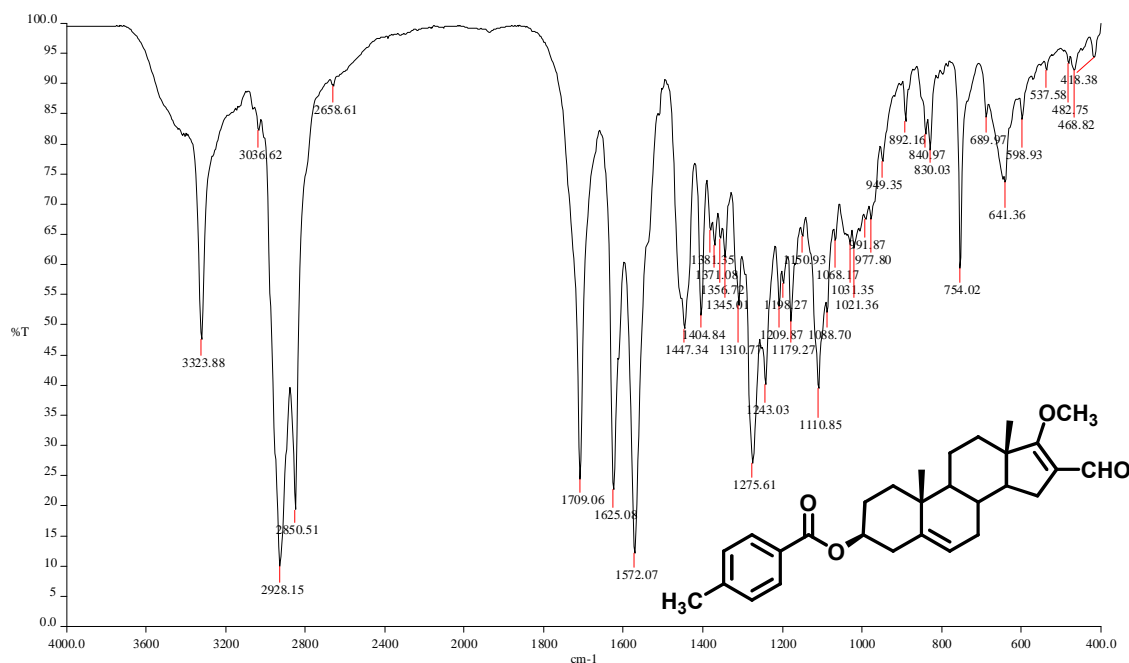


Espectro 25.4

OT6369_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 1.33E7
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]

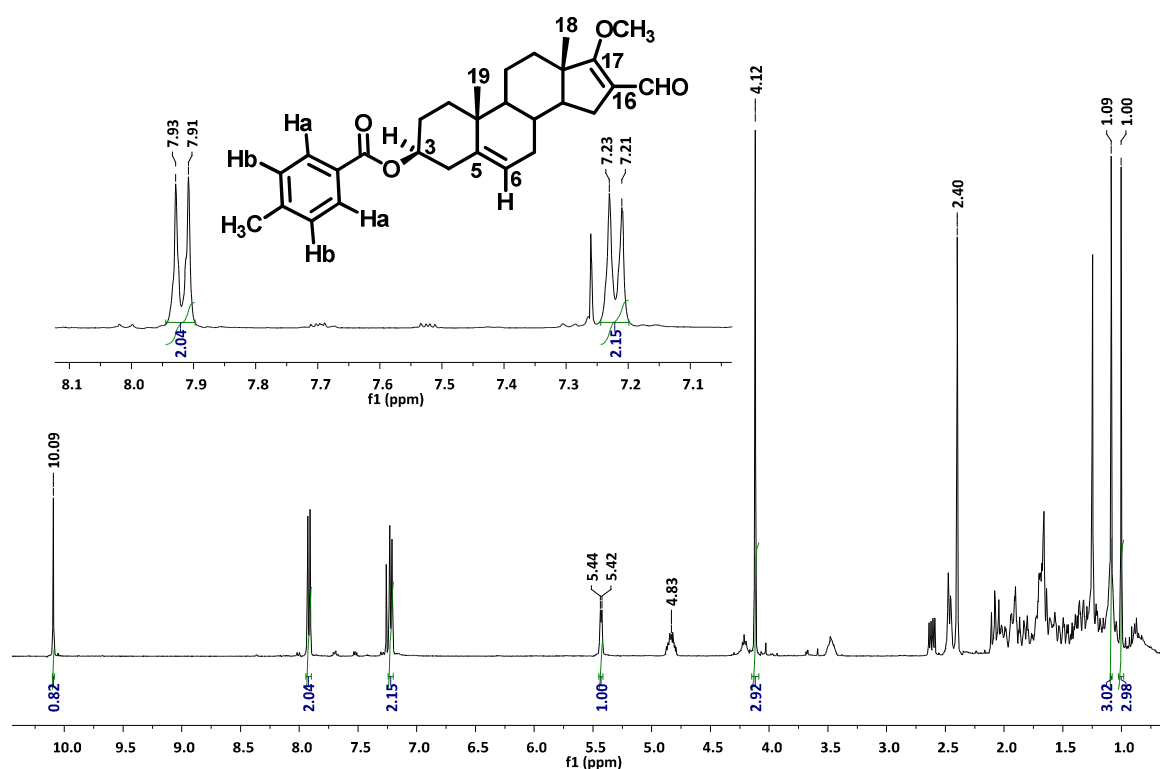


Espectro 25.4.1

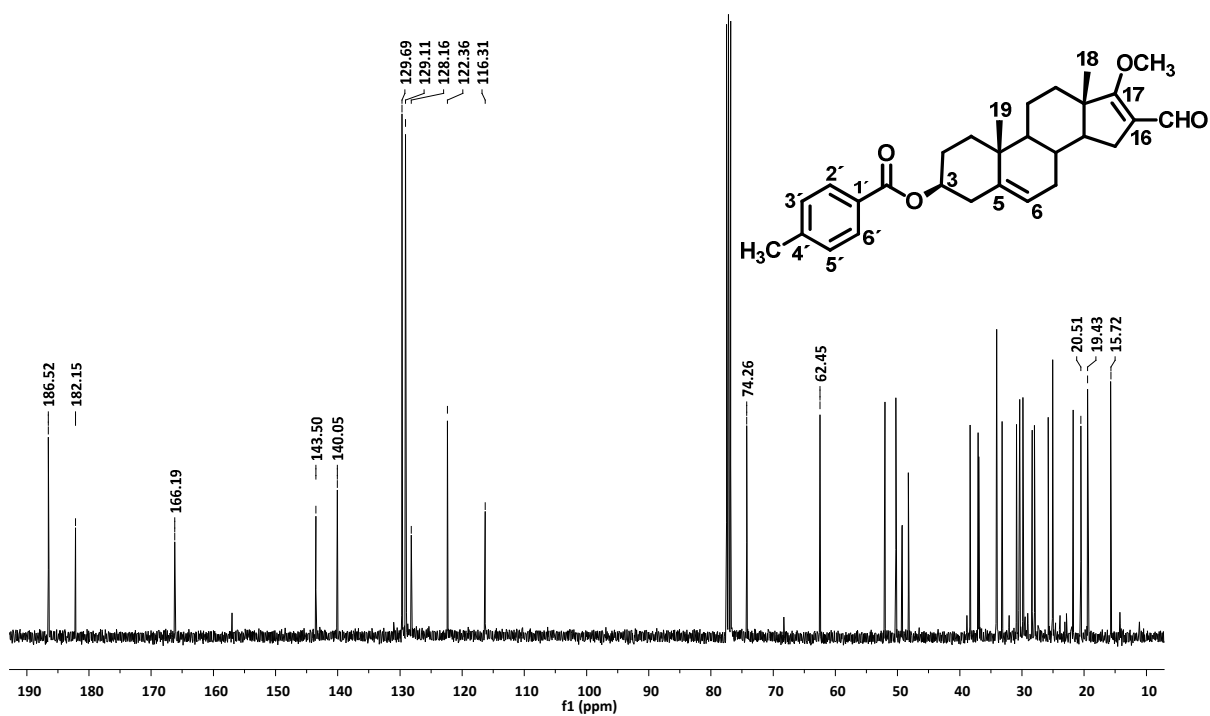


Espectro 26.1

Espectros 26.1-26.4.1: *p*-Metilbenzoato de 16-formil-17-metoxiandrosto-5,16-dien-3β-ilo



Espectro 26.2



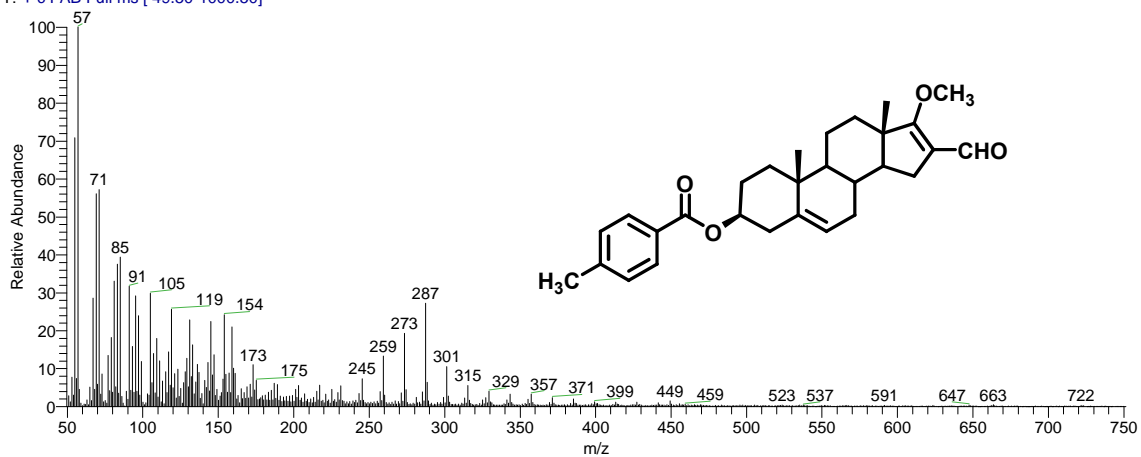
Espectro 26.3

D:\Xcalibur\data\USAINFAB\OT6699_1

9/6/2011 6:51:34 PM

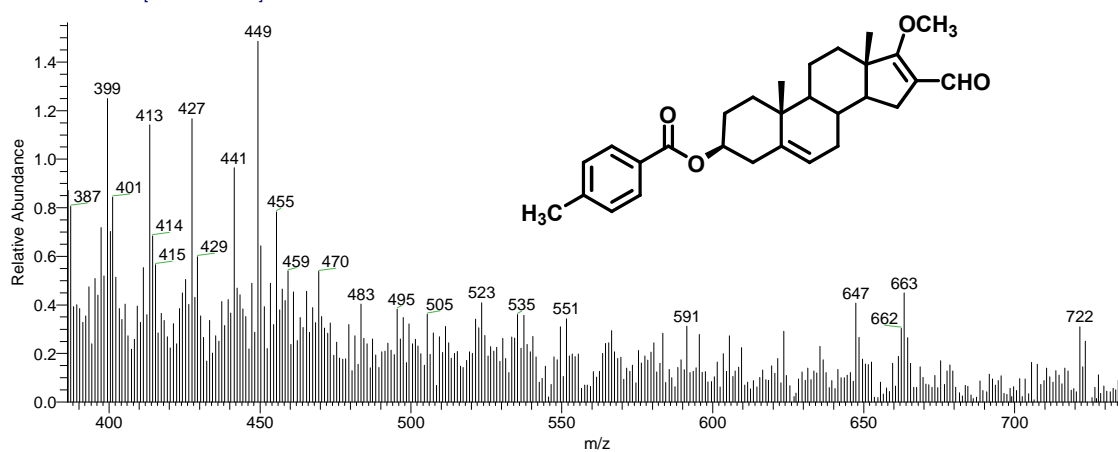
-OMECH3

OT6699_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 4.67E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



Espectro 26.4

OT6699_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 4.67E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]





New ester derivatives of dehydroepiandrosterone as 5 α -reductase inhibitors

Yazmín Arellano^a, Eugene Bratoeff^a, Mariana Garrido^a, Juan Soriano^c, Yvonne Heuze^b, Marisa Cabeza^{b,*}

^a Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry, National University of Mexico, Mexico, D.F., Mexico

^b Department of Biological Systems, Animal Production Metropolitan University-Xochimilco, Mexico, D.F., Mexico

^c Department of Pathology of the General Hospital of Mexico (SS), Mexico, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2011

Received in revised form 28 May 2011

Accepted 31 May 2011

Available online 25 June 2011

Keywords:

Human prostate

Hamster prostate

5 α -Reductase

Androgen receptor

Synthesis of ester derivatives of dehydroepiandrosterone

Antiandrogens

ABSTRACT

The aim of this study was to synthesize different ester derivatives of dehydroepiandrosterone with therapeutic potential as antiandrogens.

The biological effect of these steroids was demonstrated *in vivo* as well as *in vitro* experiments. In the *in vivo* experiments, we measured the activity of seven steroids on the weight of the prostate and seminal vesicles of gonadectomized hamsters treated with testosterone. For the *in vitro* studies, we determined the IC₅₀ values by measuring the concentration of the steroidal derivatives that inhibits 50% of the activity of 5 α -reductase present in human prostate and also its binding capacity to the androgen receptors (AR) obtained from rat's prostate cytosol. The results from these experiments indicated that compounds **7** 5 α ,6 β -dibromo-3 β -propanoyloxyandrost-17-one, **8** 5 α ,6 β -dibromo-3 β -butanoyloxyandrost-17-one and **9** 5 α ,6 β -dibromo-3 β -(3'-oxapentanoyloxy)-androst-17-one, significantly decreased the weight of the prostate and seminal vesicles as compared to testosterone treated animals; this reduction of the weight of these glands was comparable to that produced by Finasteride **11**. On the other hand, compounds **4** 3 β -acetoxyandrost-5-en-17-one, **5** 3 β -hexanoyloxyandrost-5-en-17-one **6** 3 β -(3'-oxapentanoyloxy)-androst-5-en-17-one, **7** and **12** dehydroepiandrosterone, (commercially available) inhibited the enzyme 5 α -reductase. Compounds **4**, **5**, **6**, **8** and **9** (IC₅₀ values of 5.2 \pm 1.2, 0.049 \pm 0.002, 6.4 \pm 1.1, 0.10 \pm 0.045, and 6.8 \pm 0.9 nM, respectively) exhibited the highest inhibitory activity. However, none of these compounds binds to the AR.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The 5 α -reductase enzyme (EC 1.3.99.5) converts Δ^4 -3-ketosteroids to 5 α -3-ketosteroids in androgen dependent tissues. The activity of this enzyme in androgen dependent tissues has long been known. The hyperplasia of the prostate gland has been associated with high levels of serum 5 α -dihydrotestosterone **1** (DHT), Fig. 1 [1,2]. The product of this enzyme is accumulated into the nuclei of responsive cells, binding to the androgen receptors (AR) such as those of the animal prostate [3,4]. Two types of 5 α -reductase enzyme had been identified: 1 and 2, each encoded by a different gene, which have been characterized in several species [5]. 5 α -Reductase type 2 enzyme plays a major role in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia as it is predominantly expressed in this tissue. However, some evidence indicates that type 1 is expressed in the prostate epithelial cells while the type 2 is mainly located in the stromal compartment [6,7]. 5 α -Reduc-

tase type 1 is also located in the liver and skin and acts in a neutral or basic medium, whereas type 2 is active in acidic pH [5].

Some dehydroepiandrosterone derivatives had been previously reported as inhibitors of 5 α -reductase enzyme and antagonists of the AR [8] which produced a decrease of prostate cancer tumors [9–11] and antagonized the effects of DHT as well as androst-5-ene-3 β -17-diol (Adiol) **2** on the growth of culture LNCaP cells [12]. On the other hand, our group had previously reported [13] that the ester moiety in C-3 of the pregnane skeleton decreased the weight of prostate and was a potent inhibitor of the 5 α -reductase activity present in prostate homogenates (low IC₅₀ value). Furthermore, previously we also demonstrated that bromine atom in C-6 position of the pregnane skeleton [14] is capable of decreasing the weight of the seminal vesicles and the conversion of T, **3** to DHT, **1** in hamster seminal vesicles homogenates. On the basis of these results, previously obtained in our laboratory, we decided to synthesize several similar compounds having an aliphatic ester side chain at C-3, and two bromine atoms at C-5 and C-6. However, in this series of new steroidal derivatives, we used the dehydroepiandrosterone structure instead of the above mentioned pregnane skeleton. The structure of these compounds (**4**, **5**, **6**, **7**, **8**, and **9**) with the corresponding IC₅₀ values are given in Fig. 1.

* Corresponding author. Address: Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100, México, D.F., C.P. 04960, Mexico. Tel./fax: +52 55 5483 72 60.

E-mail address: marisa@correo.xoc.uam.mx (M. Cabeza).

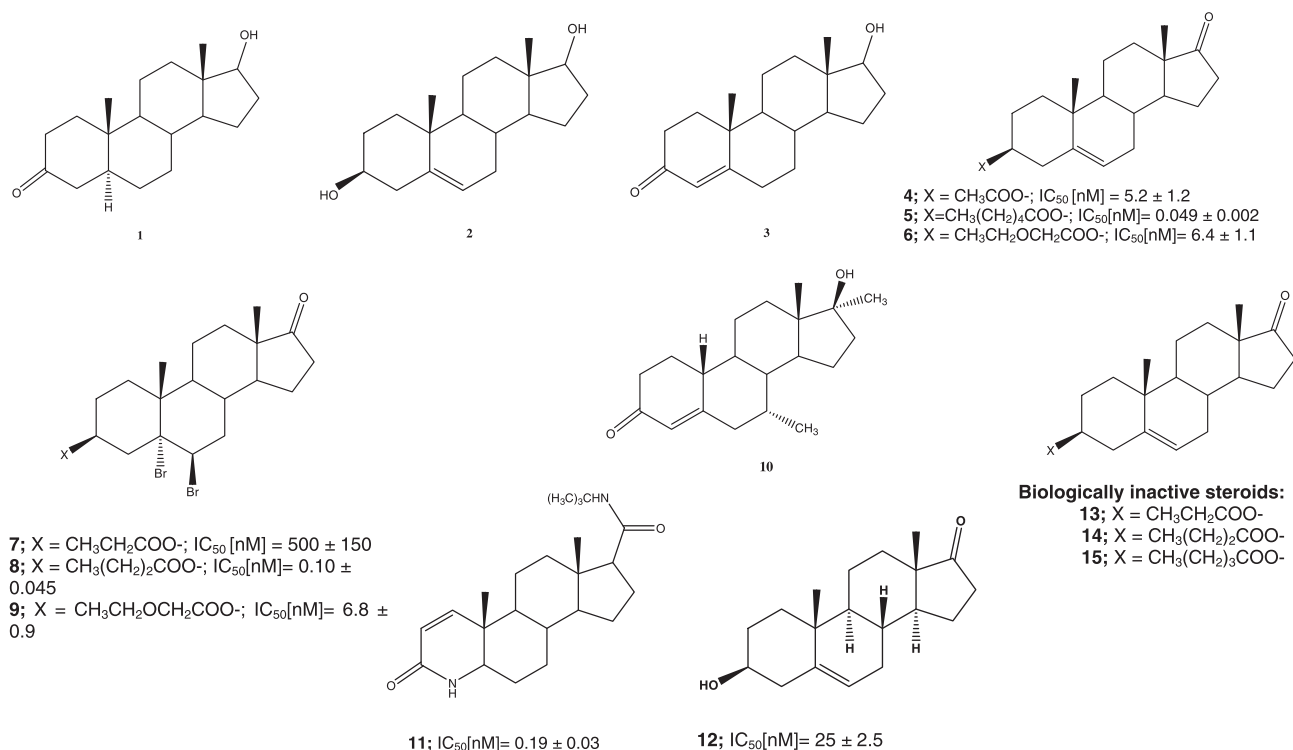


Fig. 1. Steroids structures and effect of different derivatives of dehydroepiandrosterone on the activity of 5 α -reductase enzyme: (1) Dihydrotestosterone; (2) Adiol; (3) testosterone; (4) 3 β -acetoxyandrost-5-en-17-one; (5) 3 β -hexanoyloxyandrost-5-en-17-one; (6) 3 β -(3'-oxapentanoyloxy)-androst-5-en-17-one; (7) 5 α ,6 β -dibromo-3 β -propanoyloxyandrost-17-one; (8) 5 α ,6 β -dibromo-3 β -butanoyloxyandrost-17-one; (9) 5 α ,6 β -dibromo-3 β -(3'-oxapentanoyloxy)-androst-17-one (10) Mibolerone; (11) Finasteride (Proscar[®]); (12) Dehydroepiandrosterone; (13) 3 β -propanoyloxyandrost-17-one; (14) 3 β -butanoyloxyandrost-17-one; (15) 3 β -pentanoyloxyandrost-17-one. The IC₅₀ values indicate the necessary concentration of the novel steroids for the inhibition of 50% of the activity of 5 α -reductase.

In this study, we describe the synthesis and biological activity of the following steroidal derivatives: 3 β -acetoxyandrost-5-en-17-one **4**; 3 β -hexanoyloxyandrost-5-en-17-one **5**, 3 β -(3'-oxapentanoyloxy)-androst-5-en-17-one **6**, 5 α ,6 β -dibromo-3 β -propanoyloxyandrostane-17-one **7**; 5 α ,6 β -dibromo-3 β -butanoyloxyandrost-17-one **8**; and 5 α ,6 β -dibromo-3 β -(3'-oxapentanoyloxy)-androst-17-one **9** (Fig. 1). The effect of these steroids was evaluated *in vivo* as well as *in vitro*, as potential therapeutic antiandrogens.

2. Materials and methods

2.1. Chemical and radioactive materials

Solvents were laboratory grade or better. Melting points were determined on a Fisher Johns melting point apparatus and are uncorrected. ¹H NMR and ¹³C NMR were taken on a Varian Gemini 200 and a VRX-300, respectively. Chemical shifts are given in ppm relative to that of Me₄Si (δ = 0) in CDCl₃ (the abbreviations of signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet, t, triplet; m, multiplet). Mass spectra were obtained with a HP5985-B spectrometer. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 200 spectrometer.

(1, 2, 6, 7-³H) Testosterone [³H] T specific activity: 95 Ci/mmol and Mibolerone (17 α -methyl-³H) [³H] MIB **10** (Fig. 1) specific activity 70–87 Ci/mmol were provided by a Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA). Radioinert T, 5 α -dihydrotestosterone and MIB were supplied by Steraloids (Wilton, NH, USA). Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) provided NADPH. Finasteride **11** (Fig. 1) was obtained by extraction from Proscar[®] (Merck, Sharp & Dohme). The tablets were crushed, extracted with chloroform and the solvent was eliminated in vacuum; the crude product

was purified by silica gel column chromatography. The melting point of the isolated Finasteride (252–254 °C) was identical to that reported in the literature.

2.2. Synthesis of the steroidal derivatives

General preparation of esters. To a solution of steroid **12**, Fig. 1 (commercially available starting material) (1 g, 3 mmol), DMAP (0.848 g, 6.94 mmol), DCC (2.147 g, 10.41 mmol) in chloroform (15 mL) was added the corresponding acid (14 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 2 h. Hexane (15 mL) was added and the mixture was filtered to remove the precipitated dicyclohexylurea. The organic phase was washed three times with 10% aqueous hydrochloric acid, 5% aqueous sodium bicarbonate and water. It was dried with sodium sulfate and the solvent was removed in vacuum. The crude ester was recrystallized from methanol.

From the above mentioned reaction, three esters were obtained: 3 β -propanoyloxyandrost-5-en-17-one, yield 90.4% **13**; 3 β -butanoyloxyandrost-5-en-17-one, yield 93.0% **14** and 3 β -(3'-oxapentanoyloxy)-androst-5-en-17-one, yield 96.1% **15**.

3 β -hexanoyloxyandrost-5-en-17-one 5. Yield: 92.7% of pure product, mp 72–74 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 2953, 1736 and 1736. ¹H RMN (CDCl₃) δ : 0.8 (3H, t, H-6'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q, H-5'), 1.5 (2H, m, H-4'), 1.6 (2H, m, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.8 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, J_1 = 4 Hz and J_2 = 2 Hz, H-6). ¹³C RMN (CDCl₃) δ : 13.7 (C-18), 13.9 (C-6'), 19.4 (C-19), 22.3 (C-5'), 24.7 (C-4'), 31.5 (C-3'), 34.6 (C-2'), 73.3 (C-3), 121.8 (C-6), 138.9 (C-5), 173.1 (ester carbonyl), 220.2 (C-17). FAB-MS calcd. for C₂₅H₃₈O₃ 378.3478 (M+H) found 378.3598.

General preparation of 5 α , 6 β -dibromo derivatives. A solution of the corresponding ester (2.9 mmol) in dichloromethane was cooled to 0–5 °C, a solution (2.4 mL) of bromine in carbon tetrachloride (bromine 0.9 mL and carbon tetrachloride 9.1 mL) was slowly added. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. Upon termination of the reaction, 10% aqueous sodium thiosulfate was added. The reaction mixture was extracted three times with dichloromethane. It was dried with sodium sulfate and the solvent was removed in vacuum. The crude product was recrystallized from methanol.

5 α ,6 β -dibromo-3 β -propanoyloxyandrost-17-one 7. Yield: 94.2%, mp 96–98 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2947, 1741 and 1667. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.1 (3H, t, H-3'), 2.3 (2H, q, H-2'), 4.9 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 5.4 (1H, m, H-3). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 9.1 (C-3'), 13.6 (C-18), 19.5 (C-19), 27.7 (C-2'), 55.33 (C-6), 71.6 (C-3), 87.4 (C-5), 173.8 (ester carbonyl), 220.3 (C-17). FAB–MS calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{Br}_2\text{O}_3$. 503.6578 (M+H) found 503.4398.

This compound was prepared from the corresponding ester 3 β -propanoyloxyandrost-5-en-17-one: mp 150–153 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2954, 1739 and 1666. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.1 (3H, t, H-3'), 2.3 (2H, q, H-2'), 4.6 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 9.1 (C-3'), 13.7 (C-18), 19.5 (C-19), 31.4 (C-2'), 73.5 (C-3), 121.7 (C-6), 139.9 (C-5), 173.9 (ester carbonyl), 221.02 (C-17). FAB–MS calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_3$ 345.4378 (M+H) found 345.4583.

5 α ,6 β -dibromo-3 β -butanoyloxyandrost-17-one 8. Yield: 88.7%, mp 128–130 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2946, 1726 and 1665. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, t, H-4'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.6 (2H, q, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.9 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 5.5 (1H, m, H-3). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 13.7 (C-18), 13.9 (C-4'), 18.5 (C-3'), 19.5 (C-19), 36.4 (C-4'), 55.3 (C-6), 71.5 (C-3), 87.4 (C-5), 172.9 (ester carbonyl), 220.1 (C-17). FAB–MS calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{Br}_2\text{O}_3$ 517.5428 (M+H) found 517.5347.

This compound was prepared from the corresponding ester 3 β -butanoyloxyandrost-5-en-17-one: mp 160–162 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2965, 1742, 1730 and 1665. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.8 (3H, t, H-4'), 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (2H, q, H-3'), 2.3 (2H, t, H-2'), 4.6 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 13.6 (C-4'), 13.7 (C-18), 18.5 (C-3'), 19.5 (C-19), 36.2 (C-4'), 73.4 (C-3), 121.8 (C-6), 139.9 (C-5), 173.1 (ester carbonyl), 221.0 (C-17). FAB–MS calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_3$ 359.7623 (M+H) found 359.6532

5 α ,6 β -dibromo-3 β -(3'-oxapentanoyloxy)-androst-17-one 9. Yield: 93.1%, mp 123–125 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2947, 1736 and 1627. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (3H, t, H-5'), 3.6 (2H, q, H-4'), 4.1 (2H, s, H-2'), 4.9 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6), 5.6 (1H, m, H-3). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 13.7 (C-18), 13.9 (C-5'), 19.4 (C-18), 67.2 (C-4'), 68.2 (C-2'), 55.2 (C-6), 72.5 (C-3), 87.1 (C-5), 170.2 (ester carbonyl), 220.1 (C-17) FAB–MS calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{Br}_2\text{O}_4$ 533.8734 (M+H) found 533.6594.

This compound was prepared from the corresponding ester 3 β -(3'-oxapentanoyloxy)-androst-5-en-17-one: mp 143–145 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2954, 1758, 1740 and 1627. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.9 (3H, s, H-18), 1.0 (3H, s, H-19), 1.3 (3H, t, H-5'), 3.6 (2H, q, H-4'), 4.1 (2H, s, H-2'), 4.7 (1H, m, H-3), 5.5 (1H, dd, $J_1 = 4$ Hz and $J_2 = 2$ Hz, H-6). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 13.7 (C-18), 14.9 (C-5'), 67.1 (C-4'), 19.5 (C-19), 68.2 (C-2'), 74.35 (C-3), 122.1 (C-6), 140.0 (C-5), 168.9 (ester carbonyl), 220.9 (C-17). FAB–MS calcd. $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4$ 475.3287 (M+H) found 475.5473.

2.3. Biological activity of the new compounds

The human prostate of a man 53 years old, who died from diabetes and renal insufficiency was introduced to a solution of NaCl 150 mM and stored at –70 °C. This gland was obtained from the

Department of Pathology, The General Hospital (SS) in Mexico City. Frozen human prostate was thawed on ice and minced with scissors. Unless specified, the following procedures were carried out at 4 °C.

3. Animals and tissues

Adult male golden hamsters 2.5 month old (150–200 g) were obtained from the Metropolitan University in Xochimilco, Mexico. Gonadectomies were performed under pentobarbital anesthesia and the castrated hamsters were kept in a room with controlled temperature (22 °C) and light-dark periods of 12 h. Food and water were provided *ad libitum*. After 30 days of maintaining these conditions, the hamsters were sacrificed with CO_2 [15]. This protocol was approved by the Institutional Care and Use Committee of the Metropolitan University of Mexico (UAM). This study with gonadectomized animals was carried out on 8 groups of 4 animals/experiments.

In order to determine the binding of steroids **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** and **12** to the androgen receptors, adult rats 8 months old weighing 500 g were used [16,17]. In this study we used rats because the prostate gland is bigger and there is no difference in the binding activity between rats and hamsters cytosol.

The prostate of the rats was removed, blotted, weighed and soaked in cold TEMD (40 mM tris–HCl, 3 mM EDTA and 20 mM sodium molybdate, dithiothreitol 0.5 mM, 10% glycerol at pH 8) prior to their use. Unless specified, all procedures were carried out in ice bath. Tissues were homogenized with a tissue homogenizer (Tekmar, Cincinnati, OH).

Tissues were homogenized in one volume of buffer TEMD plus protease inhibitors (2 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antipain, 5 mM leupeptin [18]) in an ice bath with a tissue homogenizer. Homogenates were centrifuged at 140,000g for 60 min [19] in a SW 60 Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA).

The cytosolic fraction obtained from the supernatant liquid of the rat prostate homogenate described above, was stored at –70 °C. Prostatic cytosol proteins (6 mg of protein in 200 μL) were determined by the Bradford's Method [20].

3.1. Competitive studies

For competitive studies, tubes containing 1 nM of [^3H] MIB plus a range of increasing concentrations (1×10^{-10} – 4×10^{-7} M) of cold MIB **10** (Fig. 1) and **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, and **12** in ethanol or chloroform, or in absence of the competitor were prepared [21]. Incubates also contained 200 nM of triamcinolone, in ethanol (Sigma) to prevent interaction of MIB with glucocorticoid receptors and progesterone receptors, the solvent was evaporated.

Aliquots of 200 μL of prostate cytosol were added and incubated in the presence of 300 μL of TEMD buffer containing protease inhibitors (duplicate) for 24 h at 4 °C in the tubes as previously described. After incubation, 0.27 mL saturated ammonium sulfate in TEMD buffer (35%) was added [22]. The mixture was further incubated for 1 h with occasional shaking to facilitate the precipitation of the [^3H] MIB-complex. The precipitate was collected by centrifugation at 10,000g, 10 min and the pellet was redissolved in 0.5 mL of TEMD and mixed with 0.5 of 0.1% dextran-coated 1% charcoal in TEMD buffer. The mixture was incubated for 40 min at 4 °C. To prepare the dextran-coated charcoal mixture, the dextran was agitated for 30 min before adding the charcoal to the mixture. The tubes were agitated on a vortex and immediately centrifuged at 800g for 10 min to pellet the charcoal; aliquots (600 μL) were taken and submitted for radioactive counting. The IC_{50} of each compound was calculated according to the plots of concentration versus percentage of binding.

3.2. *In vitro* experiments

Human prostate was homogenized in 2 volumes of medium A (20 mM sodium phosphate, pH 6.5 containing 0.32 M sucrose, 0.1 mM dithiothreitol Sigma–Aldrich, Inc.) with a tissue homogenizer. Homogenates were centrifuged at 1500g for 20 min [23,24] in a SW 60 Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). The pellets were separated, suspended in medium A and kept at -70°C . The suspension, 5 mg of protein/mL for human prostates, determined by the Bradford's Method [20] was used as source of 5α -reductase.

3.3. Determination of 5α -reductase activity

The enzyme 5α -reductase was assayed as previously described [23,24]. The reaction mixture for human prostate contained: 1 mM dithiothreitol, sodium phosphate buffer 40 mM, at pH 6.5, 2 mM, NADPH, 2 nM [1,2,6,7- ^3H]T [22] in a final volume of 1 mL. The reaction in duplicate was started when it was added to the enzymatic fraction (500 μg protein in a volume of 80 μL) incubated at 37°C for 60 min [24] and stopped by mixing with 1 mL of dichloromethane; this was considered as the end point. Incubation without tissue was used as a control. The mixture (incubation medium/dichloromethane) was agitated on a vortex for one minute and the dichloromethane phase was separated and placed in another tube. This procedure was repeated 4 more times. The dichloromethane extract was evaporated to dryness under a nitrogen stream and suspended in 50 μL of methanol that was spotted on HPTLC Keiselgel 60 F₂₅₄ plates. T and DHT were used as carriers and were applied in different lanes on both lateral sides of the plates (T, T + DHT and DHT). The plates were developed in chloroform-acetone 9:1 and were air-dried; the chromatography was repeated 2 more times. The steroid carriers were detected using phosphomolibdic acid reagent (DHT) and T with an UV lamp (254 nm). After the plates were segmented in areas of one cm each, they were cut off and the strips soaked in 5 mL of Ultima Gold (Packard). The radioactivity was determined in a scintillation counter (Packard tri-carb 2100 TR). The radioactivity content in the segment corresponding to T and DHT carriers was identified. The radioactivity that has identical chromatographic behavior as the DHT standard was considered as the DHT transformation. Control incubations, chromatography separations and identifications, were carried out in the same manner as described above except that the tubes did not contain tissue. The DHT transformation yields were calculated from the strips, taken into account the entire radioactivity in the plate.

3.4. Determination of 50% of the inhibitory concentration of steroids 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 12 in human prostatic 5α -reductase

In order to calculate the IC_{50} values (the concentration of steroids 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 12 or Finasteride required to inhibit 5α -reductase activity by 50%), six series of tubes containing increasing concentrations of these steroids (10^{-11} – 10^{-3} M) were incubated in duplicate, in the presence of: 1 mM of dithiothreitol, 40 mM sodium phosphate buffer pH of 6.5; 2 mM NADPH, 2 nM [1,2,6,7- ^3H]T and 500 μg of protein from enzymatic fraction in a final volume of 1 mL. The reaction was carried out in duplicate at 37°C for 60 min; 1 mL of dichloromethane was added to stop the reaction. The extraction and the chromatographic procedures were carried out as described above.

After the chromatography, the plates were segmented in areas of one cm each, cut off and the strips were soaked in 10 mL of Ultima Gold (Packard). The radioactivity was determined in a scintillation counter (Packard tri-carb 2100 TR). The radioactivity content in the segments corresponding to T and DHT carriers was identified.

The fraction that has identical chromatographic behavior as the DHT standard was considered as the DHT transformation in the presence of the tested compounds. Control incubations, chromatography separations and identifications, were carried out in the same manner as described above except that these tubes did not contain tissue. The DHT transformation yields were calculated from the strips, taking into account the entire radioactivity in the plate.

3.5. *In vivo* experiments

For the daily subcutaneous injections, 2 mg/kg of the steroids 4–9, and 12 were dissolved in 200 μL of sesame oil and administered for 6 days to the gonadectomized animals, together with 1 mg/kg of testosterone. Three groups of gonadectomized animals were kept as control; one was injected with 200 μL of sesame oil, the second one with 1 mg/kg of testosterone and the third one with T plus 1 mg/kg of Finasteride for 6 days. After the treatment, the animals were sacrificed by CO_2 . The prostate and seminal vesicles of each animal were dissected and weighed. Two separate experiments were performed for each group of steroid treated animals. The results were analyzed using one-way analysis of variance and the Dunnett's Method for compare means, with JMP IN 5.1 software.

4. Results

4.1. Competitive studies

These studies showed that compounds 4–9 and 12 did not inhibit labeled MIB 10 binding as compared to unlabeled MIB with IC_{50} values of 1 nM, which has a very high ability of binding to the androgen receptor (Fig. 2).

4.2. *In vitro* experiments

The *in vitro* biological activity of steroids 4–9 and 12 was determined in human 5α -reductase activity. The radioactive zone that had identical chromatographic behavior as the standard T (R_f value of 0.56) corresponds to 70% of the accounted radioactivity in the plate. The radioactivity contained in the zone corresponding to DHT standard (R_f value of 0.67) of the experimental chromatogram was identified as the transformed DHT and corresponds to 27% of

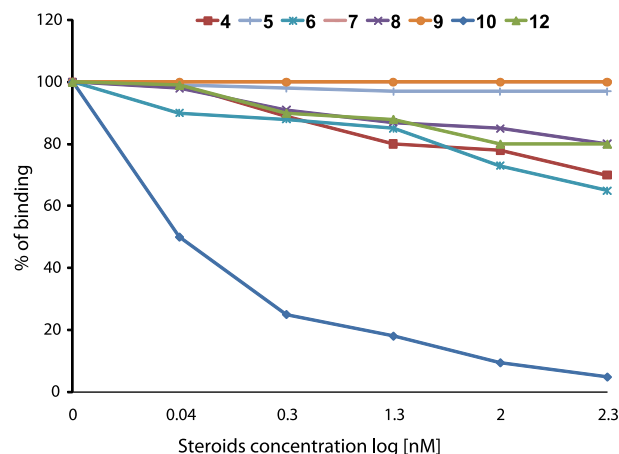


Fig. 2. Binding specificity of the new dehydroepiandrosterone derivatives was determined by using rat cytosol aliquots which were incubated for 18 h at 0°C in the presence of 1 nM of [^3H] mibolerone (MIB) and using increasing concentrations of the unlabeled steroid. (Data on the X axis of the plot is a semi log scale.)

the total radioactivity accounted in the plate. This result was considered to be 100% of the activity of 5α -reductase for the development of inhibition plots. Unmodified [^3H]T was identified (R_f value of 0.56) from control incubations which did not contain tissue and had identical chromatographic behavior as the non labeled standard. The radioactivity contained in the zone corresponding to DHT standard (R_f value of 0.67) of the control chromatogram is of 1% of the total radioactivity accounted in the plate and was considered as an error; it was subtracted from the experimental chromatograms.

4.3. Determination of the 50% inhibitory concentration of the new compounds in human prostate

The concentrations of Finasteride **11** and compounds **4–9**, and **12** (Fig. 1) required for inhibiting 5α -reductase activity by 50% (IC_{50}) were determined from the inhibition plots using Sigma Plot software.

These data show that steroids **4–9** and **12** inhibited the activity of human 5α -reductase, with compounds **4**, **5**, **6**, **8** and **9** exhibiting the highest inhibitory activity with IC_{50} values of 5.2 ± 1.2 , 0.049 ± 0.002 , 6.4 ± 1.1 , 0.10 ± 0.045 and 6.8 ± 0.9 nM, respectively. However, none of these compounds bind to the AR.

4.4. In vivo experiments

4.4.1. Weight of the prostate and seminal vesicles

After castration, the weight of the hamster prostate and seminal vesicles decreased ($P < 0.05$) compared to the normal glands. Treatment with vehicle alone did not change this condition, whereas s.c. injections of 1 mg/kg of T for 6 days significantly increased ($P < 0.05$) the weight of these glands in castrated male hamsters (Fig. 3). When T (1 mg/kg) and Finasteride or compounds **7**, **8** and **9** were injected together, the weight of the prostate and seminal vesicles decreased significantly ($P < 0.05$) as compared to that of T-treated animals (Fig. 3). This reduction of the weight of these glands was comparable to that produced by Finasteride **11** (2 mg/kg). Compound **9** showed the lowest weight of the prostate, thus indicating a higher effect, whereas **4**, **5**, **6** and **12** did not significantly reduce the weight of these glands in the treated hamsters ($P > 0.05$).

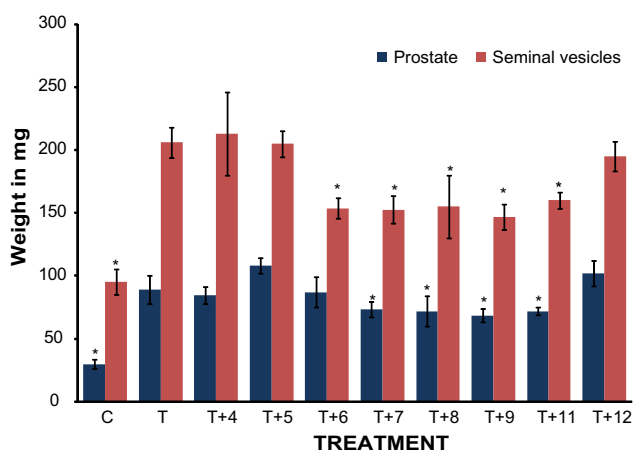


Fig. 3. Weight of prostate and seminal vesicles glands \pm standard deviation from castrated hamsters receiving different s.c. treatments for 6 days. The control animals (C) were treated with vehicle only. The pharmacological experiment was carried out in duplicate. The asterisk shows the statistically significant difference between the group of hamsters treated with T and those treated with Finasteride (**11**) or the synthesized steroids.

5. Discussion

In this paper we report the synthesis and biological activity of several new ester derivatives of dehydroepiandrosterone **4–9** and **9** (**12** is the commercially available starting material). All steroidal compounds described in this paper are good inhibitors for the human 5α -reductase enzyme; compounds **5** and **8** showed a higher inhibitory potential in the *in vitro* assays (lower IC_{50} value), comparable to that of Finasteride **11** (the drug of choice for the treatment of benign prostatic hyperplasia). This enhanced 5α -reductase inhibitory activity of compounds **5** and **8** could be explained by considering the higher lipophilicity of these molecules, which enhanced their interaction with the enzyme sites thus forming more readily a steroid-enzyme activated complex. On the other hand steroid **7** showed a lower potential inhibitory activity (higher IC_{50} value) probably due to the low lipophilicity of the ester side chain, (compound **8** contains 4 C atom in the side chain, **9** contains 4 C atom and one oxygen atom and compound **7** contains only 3 C atoms). As a result of this, both steroidal derivatives (**8** and **9**) showed a higher 5α -reductase inhibitory activity.

Previously, it had been reported that dehydroepiandrosterone derivatives containing a benzazole functional group at C-17 [8] inhibited the enzyme 5α -reductase. These compounds had IC_{50} values considerably higher (lower potential inhibitory activity) than that of compounds **4**, **5**, **6**, **8** and **9**, thus indicating that the ester moiety at C-3 and the two bromine atoms at C-5 and C-6 in the steroidal skeleton of dehydroepiandrosterone are more important for the 5α -reductase inhibitory activity than the C-17 benzazole substituent.

Finasteride **11** as well as steroids **7**, **8** and **9** showed a pharmacological activity; these results correlate very well with the analysis of IC_{50} values obtained in the *in vitro* experiments. As a result of this, the decrease of the prostate and seminal vesicles weight produced by compounds **7**, **8** and **9** was a consequence of the inhibition of the 5α -reductase present in this tissue [25]. The decrease in the weight of these glands possible could be explained by considering that these steroids could bind to the androgen receptors. However, the results obtained in this study showed that **7**, **8** and **9** did not bind to the androgen receptors since they did not inhibit the binding to labeled mibolerone **10** to this receptor.

Furthermore, it should be considered that steroids **7–9** have a short ester chain that could be hydrolyzed *in vivo* during the six day treatment. This reaction could produce a similar molecule to that of dehydroepiandrosterone. On the other hand, **7–9** have a bromine atom at 5, 6 position of the steroid skeleton. As a result of this, a significant antiandrogenic effect in the weight of prostate and seminal vesicles was observed as compared to *in vivo* effect of the dehydroepiandrosterone. This fact could explain the pharmacological activity observed with these steroidal derivatives.

Acknowledgment

This study was supported by a Grant from CONACYT (Project Number 54853).

References

- Jenkins EP, Anderson S, Imperato-McGinley J, Wilson JD, Russell DW. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 alpha-reductase. *J Clin Invest* 1992;89:293–300.
- Marberger M. Drug insight: 5alpha-reductase inhibitors for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Nat Clin Pract Urol* 2006;3:495–503.
- Anderson KM, Liao S. Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei. *Nature* 1968;219:277–9.
- Thomas LN, Lazier CB, Gupta R, Norman RW, Troyer DA, O'Brien SP, Rittmaster RS. Differential alterations in 5alpha-reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. *Prostate* 2005;6:231–9.

- [5] Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 1994;63:25–61.
- [6] Thigpen AE, Cala KM, Russell DW. Characterization of Chinese hamster ovary cell lines expressing human 5- α reductase isozymes. *J Biol Chem* 1993;268:17404–12.
- [7] Bonkhoff H, Stein U, Aumuller G, Remberger K. Differential expression of 5- α reductase isozymes in the human prostate and prostatic carcinomas. *Prostate* 1996;291:261–7.
- [8] Handratta VD, Vasaitis TS, Njar VCO, Gediya LJ, Katria GH, Chopra P, Newman D, Farquar R, Guo Z, Qiu Y, Brodie AMH. Novel C-17-heteroaryl steroidal CYP 17 inhibitors/antiandrogens: synthesis, *in vitro* biological activity, pharmacokinetics, and antitumor activity in LAPC4 human prostate cancer xenograft model. *J Med Chem* 2005;48:2972–84.
- [9] Njar VCO, Brodie AMH. Inhibitors of 17 α -hydroxylase-C17, 20-lyase (CYP17): Potential agents for the treatment of prostate cancer. *Curr Pharm Des* 1999;5:163–80.
- [10] Long BJ, Grigoryev DN, Nnane IP, Liu YZ, Brodie AM. Antiandrogenic effect of novel androgen synthesis inhibitors on hormone-dependent prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60:6630–40.
- [11] Nicolau KC, Pfefferkrn JA, Roecker JA, Cao GQ, Barluenga S, Mitchel HJ. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 1. General principles and solid-phase synthesis of benzopyrans. *J Am Chem Soc* 2000;122:9939–53.
- [12] Marwah P, Marwah A, Lardy HA, Miyamoto H, Chang Ch. C₁₉-Steroids as androgen receptor modulators: design, discovery, and structure–activity relationship of new steroidal androgen receptor antagonists. *Biorgan Med Chem* 2006;14:5933–47.
- [13] Pérez-Ornelas V, Cabeza M, Bratoeff E, Heuze I, Sánchez M, Ramírez E, Naranjo E. New 5 α -reductase inhibitors: *in vitro* and *in vivo* effects. *Steroids* 2005;70:217–24.
- [14] Cabeza M, Gutiérrez E, Miranda R, Heuze Y, Bratoeff E, Flores G, Ramírez E. Androgenic and antiandrogenic effect of progesterone derivatives with different halogen as substituents at C-6 position. *Steroids* 1999;64:413–21.
- [15] Cabeza M, Heuze Y, Quintana H, Bratoeff E. Comparison between two different hamster models used for the determination of testosterone and finasteride activity. *Asian J Anim Vet Adv* 2010;5:202–9.
- [16] Gaubert CM, Trembla RR, Bubé YY. Effect of sodium molybdate on cytosolic androgen receptor in rat prostate. *J Steroid Biochem* 1980;13:931–7.
- [17] Davies P, Thomas P, Griffiths K. Measurement of free and occupied cytoplasmic and nuclear androgen receptor sites in rat prostate ventral prostate gland. *J Endocr* 1977;74:393–404.
- [18] Hendry PWJ, Danzo BJ. Structural conversion of cytosolic steroid receptors by an age-dependent epididymal protease. *J Steroid Biochem* 1985;21:883–93.
- [19] Liang T, Heiss EJ. Inhibition of 5 α -reductase, receptor binding, and nuclear uptake of androgens in the prostate by a 4-methyl-4-aza-steroid. *Biol Chem* 1981;256:7998–8005.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1986;72:248–54.
- [21] Cabeza M, Vilchis F, Lemus A, Díaz de León L, Pérez-Palacios G. Molecular interactions of levonorgestrel and its 5 α -reduced derivative with androgen receptors in hamster flanking organs. *Steroids* 1995;60:630–5.
- [22] Rasmusson GH, Reynolds GF, Steinberg NG, Walton E, Patel GF, Liang T, et al. Azasteroids: structure–activity relationships for inhibition of 5- α reductase and of androgen receptor binding. *J Med Chem* 1986;29:2298–315.
- [23] Hirosumi J, Nakayama O, Fagan T, Sawada K, Chida N, Inami M, et al. FK143, a novel non steroidal inhibition of steroid 5 α -reductase: *in vitro* effects of human and animal prostatic enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;52:357–63.
- [24] Bratoeff E, Cabeza M, Pérez-Ornelas V, Recillas S, Heuze I. *In vivo* and *in vitro* effect of novel 4, 16-pregnadiene-6, 20 dione derivatives, as 5 α -reductase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;111:275–81.
- [25] Bruchovsky N, Wilson JD. The conversion of testosterone to 5- α -androstane-17- β -ol-3-one by rat prostate *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* 1968;243:2012–22.

RESEARCH ARTICLE

In vivo and *in vitro* effect of androstene derivatives as 5 α -reductase type 1 enzyme inhibitors

Eugene Bratoeff¹, Araceli Sánchez², Yazmín Arellano¹, Yvonne Heuze², Juan Soriano³, and Marisa Cabeza²

¹Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry, National University of Mexico City, Mexico, D. F., Mexico,

²Department of Biological Systems and Animal Production Metropolitan University-Xochimilco, Mexico, D. F., Mexico, and ³Department of Pathology of the General Hospital of Mexico (SS), Mexico, D. F., Mexico

Abstract

The aim of these studies was to synthesize twelve ester derivatives of dehydroepiandrosterone with therapeutic potential. The effect of **1–12** was demonstrated in the flank organs of gonadectomized hamsters treated with testosterone and the synthesized steroids. *In vitro* studies were carried out determining the IC₅₀ values for the inhibition of the activity of 5 α -reductase type 1 and 2, which are present in rat liver and human prostate respectively. The binding of **1–12** to the androgen receptors (AR) was determined using rat's prostate cytosol. Steroids **1–12** containing different substituents in the phenyl group of the ester moiety in C-3 reduced the flank organs and inhibited the activity of 5 α -R type 1; however only steroids **1** and **2** inhibited 5 α -R type 2. **1–12** did not bind to the AR. The modification of one atom of the substituents in the phenyl group of the ester moiety in C-3 changed their biological potency (IC₅₀).

Keywords: 5 α -reductase, prostate cancer, flank organs, dehydroepiandrosterone derivatives

Introduction

The 5 α -reductase enzyme (EC 1.3.99.5) converts Δ^4 -3-ketosteroids to 5 α -3-ketosteroids in androgen dependent tissues. Two types of 5 α -reductase enzymes (5 α -R) had been identified, 1 and 2, each encoded by a different gene, which have been characterized in several species¹. 5 α -R type 2 plays a major role in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia as it is predominantly expressed in this tissue. However, some evidence indicates that type 1 is expressed in the prostate epithelial cells while the type 2 is mainly located in the stromal compartment². 5 α -R type 1 is also located in the liver and skin and acts in a neutral or basic medium, whereas type 2 is active in acidic pH (1).

Hamster flank organs are two pigmented spots formed by a pilosebaceous complex, located in the dorsal skin surface of hamsters. In female hamsters the diameter of the pigmented spot measures 2 mm, whereas in males it

is 8 mm. These nodules shrink after castration until they resemble the nodules of the female animals. However, it had been previously reported that daily injections or topical applications of testosterone (T) or 2 (DHT) restore their original size³. These glands can metabolize T to DHT in both intact and gonadectomized hamster since the 5 α -R is present in this tissue⁴. Hamster flank organs also have an androgen receptor⁵. These glands had been used as a model to test antiandrogenic drugs as well as 5 α -inhibitory compounds as finasteride and others⁶.

Some dehydroepiandrosterone derivatives had previously been reported as inhibitors of 5 α -R enzyme and antagonists of the AR⁷ which produced a decrease of prostate cancer tumors⁸ and antagonized the effects of DHT as well as androst-5-ene-3 β -17 α -diol (Adiol) on the growth of culture LNCaP cells⁹.

Previously, our group had reported⁷ that the ester moiety in C-3 of the dehydroepiandrosterone esters

Address for Correspondence: Marisa Cabeza, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100, México, D.F., C.P. 04960, México, Tel: [011-52-55] 5483-72-60, Fax: [011-52-55] 5483-72-60, E-mail: marisa@correo.xoc.uam.mx.

(Received 11 July 2012; revised 07 September 2012; accepted 11 September 2012)



increases the 5 α -R inhibitor activity as well as the antiandrogenic effect. These compounds contain an aliphatic ester moiety (propionyloxy, butyroyloxy and valeroxyloxy) at C-3 position of the steroidal skeleton. In view of the fact that the aliphatic ester derivatives showed a high pharmacological activity, in this study we decided to synthesize similar compounds having an aromatic ester (benzoic and *p*-substituted benzoic acids) and compare the activity of the aromatic ester derivatives with that of the previously publicized aliphatic esters. In this paper we report the synthesis and the biological evaluation of the following compounds: 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-benzoate **1**; 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-fluorobenzoate **2**; 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-chlorobenzoate **3**; 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-bromobenzoate **4**; 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-iodobenzoate **5**; 17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-*p*-methylbenzoate **6**; 17-chloro-16-formylandrost-5,16-diene-3 β -yl-benzoate **7**; 17-chloro-16-formylandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-fluorobenzoate **8**; 17-chloro-16-formylandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-chlorobenzoate **9**; 17-chloro-16-formylandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-bromobenzoate **10**; 17-chloro-16-formylandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-iodobenzoate **11**; 17-chloro-16-formylandrost-5,16-diene-3 β -yl-*p*-methylbenzoate **12** with therapeutic potential as antiandrogens.

Material and methods

Chemical and radioactive materials

Solvents were laboratory grade or better. Melting points were determined on a Fisher-Johns melting point apparatus and are uncorrected. ¹H-NMR and ¹³C-NMR were taken on Varian Gemini 200 and VRX-300, respectively. Chemical shifts are given in ppm relative to that of Me₄Si ($\delta = 0$) in CDCl₃ (the abbreviations of signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet, t, triplet, m, multiplet). Mass spectra were obtained with a HP5985-B spectrometer. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 200s spectrometer.

(1, 2, 6, 7-³H) Testosterone [³H] T specific activity: 95 Ci/mmol and Mibolerone (17 α -methyl-³H) [³H] MIB specific activity 70–87 Ci/mmol were provided by Perkin Elmer Life and Analytical Sciences. (Boston, MA). Radioinert T, 5 α -dihydrotestosterone and MIB were supplied by Steraloids (Wilton, NH, USA). Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo) provided NADPH and Lubrol PX. Finasteride was obtained by extraction from Proscar (Merck, Sharp & Dohme). The tablets were crushed, extracted with chloroform and the solvent was eliminated in vacuum; the crude product was purified by silica gel column chromatography. The melting point of the isolated finasteride (252–254°C) was identical to that reported in the literature. Bio-gel Hydroxyapatite (HAP) was provided by Bio-Rad Laboratories, (CA, USA).

Synthesis of the steroidal derivatives

General procedure for the preparation of esters

To a solution of 3 β -hydroxyandrost-5-ene-17-one (1000 mg, 3.5 mmol), DCC (2147 mg, 10.5 mmol) and DMAP (848 mg, 7.0 mmol) in chloroform (20 mL) was added the corresponding acid (14 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 2 h. Hexane (15 mL) was added and the precipitated dicyclohexylurea was filtered. The organic phase was washed with 10% aqueous hydrochloric acid, 5% aqueous sodium bicarbonate and water. It was dried over anhydrous sodium sulfate, and the solvent was removed in vacuum. The crude ester was recrystallized from ethyl acetate.

17-oxaandrost-5-ene-3 β -yl-benzoate (1). Yield 82% of pure product, mp 261–262°C. IR (KBr) cm⁻¹: 2960, 1735, 1711, 1253, 1272. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.9 (3H, s, H-19), 1.1 (3H, s, H-18), 4.8 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, d, *J* = 4 Hz, H-6), 7.4 (2H, t, *J* = 8 Hz, H-3' and H-5'), 7.5 (1H, t, *J* = 8 Hz, H-4'), 8.0 (2H, d, *J* = 8 Hz, H-2' and H-6'). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 13.5 (C-18), 19.4 (C-19), 74.3 (C-3), 121.9 (C-6), 128.6 (C-3' and C-5'), 129.5 (C-2' and C-6'), 130.7 (C-1'), 132.7 (C-4'), 139.9 (C-5), 168.1 (ester carbonyl), 221 (C-17). HRMS calc for C₂₆H₃₂O₃ 392.3287 found 392.5436. The spectral data for compounds 2–6 are given in the Info File.

General procedure for the preparation of 17-chloro-16-formylandrost-5,16-dien-3 β -yl benzoates

A solution of the corresponding ester (500 mg, 1–1.3 mmol) in chloroform (5 mL) was added dropwise to a cold and stirred solution of phosphorus oxychloride (4.2 mL, 45.3 mmol) dissolved in dimethylformamide (4.2 mL, 55 mmol). The mixture was allowed to reflux under N₂ for 5 h at 40°C. It was combined with 100 mL of a saturated cold solution of sodium bicarbonate and extracted with chloroform (3 \times 125 mL); it was dried over anhydrous sodium sulfate and the solvent was removed in vacuum. The yellow crude product was purified by flash column chromatography [FCC, silica gel 60 hexane:ethyl acetate 98:2].

17-chloro-16-formylandrost-5,16-dien-3 β -yl benzoate (7). Yield 43% of pure product, mp 188–190°C. IR (KBr) cm⁻¹: 2860, 1708, 1711, 1664, 1272, 1253. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.0 (3H, s, H-18), 1.1 (3H, s, H-19), 4.9 (1H, m, H-3), 5.4 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, H-6), 7.4 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-3' and H-5'), 7.5 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-4'), 8.0 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-2' and H-6'), 9.9 (1H, s, formyl group). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 15.3 (C-19), 19.4 (C-18), 74.4 (C-3), 122.1 (C-6), 128.4 (C-3' and C-5'), 129.7 (C-2' and C-6'), 130.8 (C-1'), 132.9 (C-4'), 136.6 (C-16), 140.1 (C-5), 162.5 (C-17), 166.1 (ester carbonyl), 188.3 (formyl group). HRMS calc for C₂₇H₃₁ClO₃ 438.2452 found 438.7835. The spectral data for compounds 8–12 are given in the Info file.

Biological activity of the steroidal compounds

The human prostate of a man 53 years old, who died from diabetes and renal insufficiency was introduced

to a solution of NaCl 150 mM and stored at -70°C . This gland was obtained from the Department of Pathology, The General Hospital (SS) in Mexico City. Frozen human prostate was thawed on ice and minced with scissors. Unless specified, the following procedures were carried out at 4°C .

Human prostate tissue was homogenized in two volumes of buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 6.5 containing 0.32 M sucrose, 0.1 mM dithiothreitol Sigma-Aldrich Inc.) with a tissue homogenizer Ultra-Turrax IKA, T18 basic. (Wilmington, NC). Homogenates were centrifuged at 1500g for 60 min in a SW 60 Ti rotor (Beckman instruments, Palo Alto, CA). The pellets were separated, suspended in medium A and kept at -70°C . The suspension, 5 mg of protein/mL for human prostates, determined by the Bradford method¹⁰ was used as source of 5α -R type 2 isozyme.

Animals and tissues

For the *in vivo* experiments, adult male golden hamsters 2.5 month old (150–200 g) were obtained from the Metropolitan University Xochimilco, Mexico. Hamster's gonadectomies were performed under pentobarbital anesthesia and the castrated hamsters were kept in a room with controlled temperature (22°C) and light-dark periods of 12h. Food and water were provided *ad libitum*. After 36 days maintaining these conditions, the hamsters were sacrificed with CO_2 . This protocol was approved by the Institutional Care and Use Committee of the Metropolitan University of Mexico (UAM). The experiment with the gonadectomized animals was carried out on 8 groups of 4 animals/experiment.

With the aim to prepare microsomes as source of 5α -R type 1 isozyme, two livers from male adult rats, 8 months old were extirpated. The rats were fasted overnight to decrease glycogen levels before the removal of the livers.

Rat livers were minced (15–30 g) in one volume of buffer A using a tissue mill IKA A11 basic. Unless specified, the following procedures were carried out at 4°C . The tissue was homogenized and the suspension centrifuged at 10,000g for 30 min (Beckman L70K ultracentrifuge); the pellet was discarded. The supernatant liquid was filtered through a strainer and centrifuged at 100,000g for 60 min. The microsomal pellet was washed by resuspension in five volumes of buffer A with a homogenizer and the proteins were determined by the Bradford method¹⁰. The suspension was centrifuged at 100,000g and the pellet suspended in buffer A to a concentration of 10–20 mg of protein/mL; the microsomal solution was stored at -80°C prior to the preparation of the solubilized steroid 5α -R type 1. The solubilization of 5α -R type 1 isozyme from rat liver microsomes was carried out according to Levy et al.¹¹.

In order to determine the binding of steroids **1–12** to the AR, the prostate of adult rats 8 months old weighing 500 g was extirpated¹². In this study we used also rats because the prostate gland is bigger and there is no difference in the binding activity between rats and hamsters cytosol.

The prostate of the rats was blotted, weighed and soaked in cold TEMD (40 mM tris-HCl, 3 mM EDTA and 20 mM sodium molybdate, dithiothreitol 0.5 mM, 10% glycerol at pH 8) prior to their use. Unless specified, all procedures were carried out in an ice bath. Tissues were homogenized with a tissue homogenizer.

Tissues were homogenized in one volume of buffer TEMD plus protease inhibitors in an ice bath with a tissue homogenizer. Homogenates were centrifuged¹³ in a SW 60 Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA).

The cytosolic fraction obtained from the supernatant liquid of the rat prostate homogenate described above, was stored at -70°C . Prostatic cytosol proteins (6 mg of protein in 200 μL) were determined by the Bradford method¹⁰.

In vitro experiments

Characterization of 5α -R type 1

Determination of protein concentration-dependent

5α -R type 1 activities

In order to determine the optimum concentration of protein to obtain the maximum activity of 5α -R enzyme type 1, different concentrations of solubilized microsomes (30, 60 and 90 μg of protein) were used as a source of this enzyme. A mixture containing a final volume of 1 mL, 1 mM DTT sodium phosphate buffer 20 mM, at pH 6.5, 2 nM of [1,2,6,7 ^3H] T, and 2 mM NADPH¹¹ was prepared. The reaction in duplicate was started when the enzymatic fraction was added to the mixture and this was incubated at 37°C for 60 min. The reaction was stopped by mixing with 1 mL of dichloromethane. Incubation without tissue was used as a control.

Determination of pH dependence of 5α -R activity

To measure the pH dependent 5α -R type 1 activities, the assays were carried out in a similar way that we described above but using 20 mM potassium phosphate buffers ranging from pH 6–8 and different concentrations of unlabeled T.

Determination of 5α -R type 1 activity

The activity of the 5α -R type 1 isozyme was determined by following the conversion of T to DHT at pH 7.5. 2 nM of [1,2,6,7 ^3H] T, and different concentrations of unlabeled T (5×10^{-7} – 6.3×10^{-6} M) or DHT (5×10^{-7} – 2.7×10^{-5} M) and 2 mM NADPH¹¹ was prepared. The reaction in duplicate was started when 5α -R type 1 isozyme fraction (60 μg protein in a volume of 7.5 μL) was added to the mixture and incubated at 37°C for 60 min.

Determination of 5α -R type 2 activity

The activity of the isozyme 5α -R type 2 was assayed as previously described^{14,15}.

The radioactive zone that had identical chromatographic behavior as the standard T (R_f value of 0.56) corresponds to 70% of the accounted radioactivity in the plate. The radioactivity contained in the zone corresponding



to DHT standard (R_f value of 0.67) of the experimental chromatogram was identified as the transformed DHT and corresponds to 20–27% of the total radioactivity accounted in the plate. This result was considered to be 100% of the activity of 5 α -R (types 1 or 2) for the development of inhibition plots. Unmodified [^3H]T was identified (R_f value of 0.56) from control incubations which did not contain tissue and had identical chromatographic behavior as the non labeled standard (identified by UV lamp, 254 nm). The radioactivity contained in the zone corresponding to DHT standard (R_f value of 0.67) of the control chromatogram was 1% of the total radioactivity accounted in the plate and was considered as an error; it was subtracted from the experimental chromatograms.

The 5 α -R type 1 activity was calculated from the percentage of the labeled DHT, formed, taking into consideration the recovery, blank values, specific activity of [^3H] T and ratio of added [^3H] T to unlabeled T or DHT. The 5 α -R type 2 activity was calculated taking into consideration the recovery, blank values and the specific activity of [^3H] T.

K_m and V_{max} values were derived from Lineweaver-Burk plots, in which the regression lines were computed by the least square method. The statistical significance of the means was determined by Student's *t* test in all experiments.

The efficiency of T 5 α -R type 1 was estimated according to Weisser and Krieg report¹⁶.

Determination of 50% of the inhibitory concentration of steroids 1–12 in 5 α -R type 1 and 2 activities

In order to calculate the IC_{50} values (the concentration of steroids 1–12 or finasteride required to inhibit 50% of the activity 5 α -R types 1 and 2 enzyme, six series of tubes containing increasing concentrations of these steroids (10^{-11} – 10^{-3} M solubilized in DMSO) were incubated in duplicate: For type 2 isozyme assay, pH of 6.5; 2 mM [1,2,6,7- ^3H]T, 2 mM NADPH and 500 μg of protein from the enzymatic fraction obtained from human prostate were used^{14,15}. For 5 α -R type 1 assay, we used a pH of 7.5; 2 mM NADPH, 2 nM [1,2,6,7- ^3H]T and 6.31 μM of non labeled T. The reaction was started by adding 60 μg of soluble 5 α -R type 1 isozyme.

The concentration of finasteride and compounds 1–12 required for inhibiting 5 α -R type 1 and 2 activities by 50% (IC_{50}) were determined from the inhibition plots using SigmaPlot Software.

Androgen receptor competitive binding assay

For AR competitive binding studies, tubes containing 1 nM of [^3H] MIB plus a range of increasing concentrations (1×10^{-10} – 4×10^{-7} M) of unlabeled MIB or steroids 1–12 in ethanol or acetone, or in the absence of competitor were prepared. The [^3H] MIB-AR complex was separated by the hydroxyapatite (HAP) method¹⁷.

The IC_{50} value of each compound was calculated according to the plots of concentration versus percentage of binding using SigmaPlot Software.

In vivo experiments

For the daily subcutaneous injections, 2 mg/kg of the steroids 1–12 were dissolved in 200 μL of sesame oil and administered for 6 days to gonadectomized hamsters, together with 1 mg/kg of testosterone. Three groups of gonadectomized hamsters were kept as control; one was injected with 200 μL of sesame oil, the second with 1 mg/kg of testosterone and the third with T plus 1 mg/kg of finasteride for 6 days. After the treatment, the animals were sacrificed with CO_2 . The flank organs diameter size of each hamster was measured using a vernier. Two separate experiments were performed for each group of steroid treated animals. The results were analyzed using one-way analysis of variance and Dunnett's Method to compare means, with JMP IN 5.1 software.

Results

Synthesis of the steroidal derivatives 1–12

The steroidal derivatives 1–12 were synthesized using dehydroepiandrosterone as the starting material. This compound was esterified with the corresponding acid in the presence of dicyclohexylcarbodiimide and dimethylaminopyridine. The resulting esters 1–6 were treated with phosphorus pentachloride in dimethylformamide (Vilsmeier-Haack reaction) to form the final compounds, the esters of 17-chloro-16-formylandrost-5,16-diene moiety 7–12.

In vitro experiments

Protein concentration-dependent 5 α -R type 1 activities

When different concentrations of protein obtained from solubilized microsomes of rat's liver were used, 5 α -R enzyme type 1 shows different activity. The optimum concentration of protein was of 60 μg .

pH Dependent 5 α -R type 1 activities

5 α -R type 1 present in the solubilized microsomes from rat's liver, showed the conversion of T to DHT in the presence of NADPH. Furthermore, the pH profile of this enzyme was observed by using different concentrations of T. In the presence of 6.31 μM of T, 5 α -R type 1 shows maximal conversion to DHT at pH 7.5. When smaller or higher concentrations of T were used, a lower activity of 5 α -R type 1 at pH 7.5 was observed. The kinetic parameters were also calculated and these data are shown in Table 1. The higher V_{max} value was determined at pH 7.5; however, this enzyme shows major affinity for T at pH 6.5 (lower value of $K_m = 2.97$) see Table 1.

In addition, the efficiency of 5 α -R type 1 for the conversion of T to DHT was calculated. This efficiency value (V_{max}/K_m)¹⁶ was obtained from the rate between maximal velocities of production of DHT (V_{max}), using different pHs and the Michaelis constants (K_m).

V_{max}/K_m rate values showed that 5 α -R type 1 was effective at pHs of 6.5, 7.5 and 8. However this efficiency was higher at pH 7.5 (40.16 value) as compared to that at pH 6.5 and 8 (37.03 and 18.78 values, respectively).

Table 1. Effect of the testosterone concentration on 5 α -reductase type 1 activity at different pHs. Solubilized microsomes from rat liver were used as source of 5 α -reductase type 1.

	Concentration nM								5 α -Reductase type 1 efficiency	V_{\max} pmol/mL/h	K_m [μ M]
T	38.2	96.4	196	500	1250	1670	2300	4000			
pH 6.5% of Conversion to DHT	1.87	2.37	2.44	2.86	2.28	2.91	1.53	1.33			
pmol/mL/h	0.71	2.29	4.68	14.3	28.5	48.59	33.19	53.2	37.03	100	2.97
T	500	1250	1670	2300	4000	5180	6100	6308			
pH 7.5% of Conversion to DHT	4.01	3.32	3.88	4.1	3.5	3.66	3.75	3.48			
pmol/mL/h	20.05	41.5	64.79	94.3	140	189.5	200	219.5	40.16	1111.1	27.6
pH 8% of Conversion to DHT	0.667	2.33	1.17	2.04	1.94	1.83	1.89	2.80			
pmol/mL/h	3.33	29.13	19.53	46.92	77.6	94.79	125.2	176.62	18.78	526	28

On the other hand, labeled T in the presence of increasing concentrations of unlabeled T showed a higher conversion to labeled DHT (higher 5 α -R activity) $V_{\max} = 111.1$ pmol/mg of protein/h ($K_m = 27.6$) as compared to that of the experiment where increasing concentrations of DHT and labeled T were used ($V_{\max} = 0.597$ pmol/mg of protein/h and $K_m 1.17$); as a result of this, the efficiency of the enzyme 5 α -R was higher in the absence of DHT.

However, the 5 α -R type 1 showed a higher affinity (minor $K_m = 0.39$ and $V_{\max} = 169.49$) when labeled T, unlabeled T [1μ M] and an increasing concentrations of DHT were present in the incubating medium. In this case, the efficiency value of 5 α -R indicated by the rate of V_{\max}/K_m was higher as compared to that of the experiment where T in minor concentration or T (in minor concentration) +DHT were present in the incubating medium. The affinity of the 5 α -R type 1 was also evaluated in the presence of labeled T, unlabeled T [1.5μ M] and an increasing concentration of DHT; in this test, higher values of $K_m = 0.79 \mu$ M and $V_{\max} = 188.67$ were observed. This trial showed that the efficiency rate value was lower than that found for 1μ M of T.

The data from this experiment indicated very clearly that the affinity of 5 α -R enzyme type 1 with DHT increases in the presence of 1μ M of T, (small K_m value of 0.39) as compared to that using 1.5μ M of T giving a larger K_m value (0.79) thus showing a reduced affinity. Nevertheless the presence of the product (DHT) did not inhibit the efficiency of the conversion of T to DHT at these concentrations (1 and 1.5μ M).

Biological activity of the novel compounds

Determination of the 50% inhibitory concentration of the synthesized compounds in human prostate

The concentration of finasteride and compounds **1–12** required for inhibiting 5 α -R type 1 and 2 activities by 50% (IC_{50}) were determined from the inhibition plots, using different concentrations of the tested steroids; the results \pm standard deviations are shown in Figure 1. Finasteride

inhibited 5 α -R type 2 with a low value of IC_{50} (0.0085μ M), whereas this value was higher for type 1 isozyme (0.63μ M). Steroids **1** and **2** were the only one from the synthesized compounds that inhibited the enzyme 5 α -R type 2, with IC_{50} values of 100 and 0.00358μ M, respectively (Figure 1).

Steroids **1–12** inhibited the enzyme 5 α -R type 1 activity; however, compounds **3** and **6** showed a higher IC_{50} value (0.9 and 5μ M, respectively; lower activity) as compared to that of the remaining steroids. On the other hand compound **11** and Finasteride showed a lower IC_{50} value (0.55 ± 0.02 and $0.63 \pm 0.005 \mu$ M, respectively; a higher inhibitory activity).

Binding of the synthesized compounds to the androgen receptor

The binding of steroids **1–12** to the AR was determined from the IC_{50} and the relative binding affinity (RBA) values for each compound. The IC_{50} value was calculated according to the plots of concentration of the non labeled MIB or the synthesized compounds versus percentage of binding to MIB (Figure 1). As can be seen in Figure 1, none of the studied compounds bound to the AR.

In vivo experiments

Flank organ test

After castration, the diameter of the pigmented spot of the male hamster flank organs decreased ($p < 0.005$) as compared to that of the normal glands. Treatment with vehicle alone did not change this condition, whereas s.c. injections of 1mg/kg of T for 6 days significantly increased ($p < 0.005$) the diameter of the pigmented spot in castrated male hamsters flank organs (Figure 2). The diameter of the pigmented spot significantly decreased ($p < 0.005$) when testosterone (T) and finasteride (1mg/kg) or steroids **1–12** (2mg/kg) were injected together, as compared to that of testosterone-treated animals (Figure 1). Compound **12** showed the highest pharmacological activity (small diameter of the pigmented spot 1.0mm).



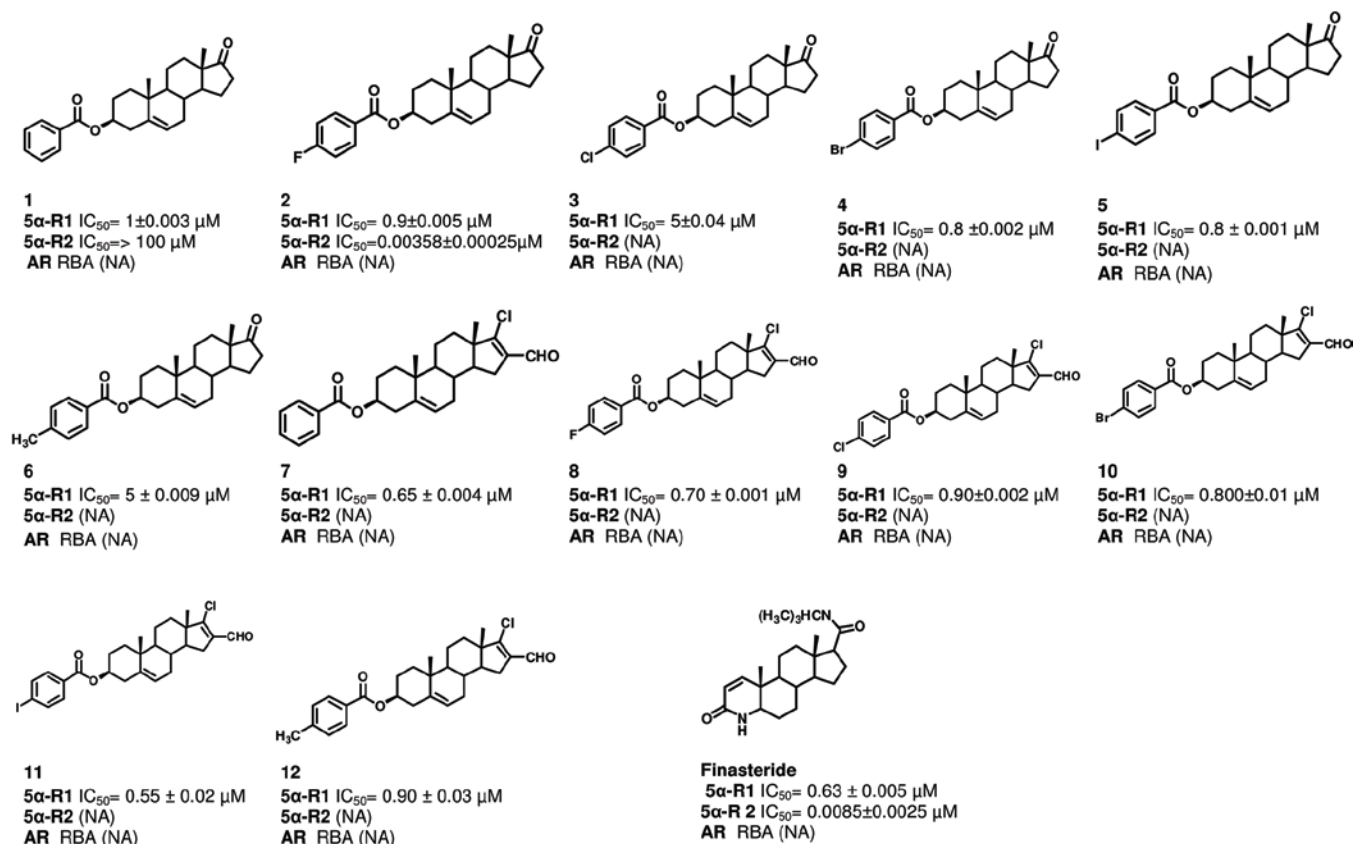


Figure 1. Steroidal structures and effect of different dehydroepiandrosterone derivatives on the activity of 5 α -R enzyme type 1 and 2 (5 α -R): 1–12. The IC₅₀ values indicate the required concentration of the novel steroids for the inhibition of 50% of the activity of 5 α -R1 and 5 α -R2. This figure shows also the relative binding affinity (RBA) of these derivatives to the androgen receptor (AR). The following abbreviations were used: NA, non active compound. (See colour version of this figure online at www.informahealthcare.com/enz)

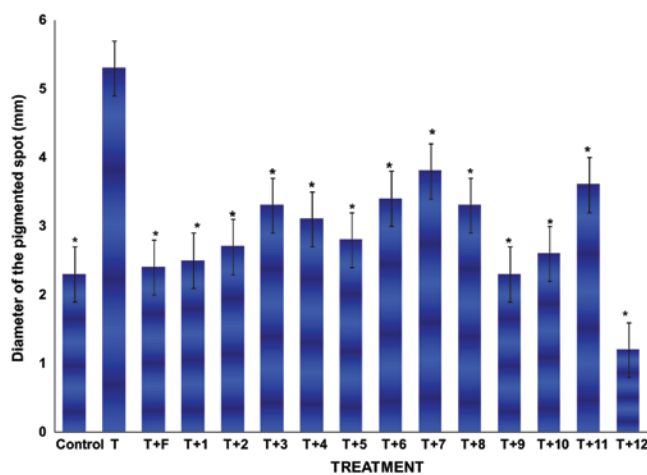


Figure 2. Diameter size \pm standard deviations of the pigmented spot from gonadectomized hamster's flank organs receiving different treatments with T plus the novel steroids for 6 days. Control gonadectomized hamsters were treated with vehicle only. The following abbreviations were used: Testosterone (T), Finasteride (F). *Significant differences with the T-treatment were observed. (See colour version of this figure online at www.informahealthcare.com/enz)

Discussion

Since the optimal concentration of the protein obtained from the solubilized microsomes of rat's liver as 5 α -R

type 1 source was of 60 μ g, thus at this protein concentration the active sites of the enzyme were saturated by the substrate and coenzyme.

The kinetic data for 5 α -R type 1 enzyme indicated that V_{\max} was of 1.1 nmol/mL/h at pH 7.5. This result correlates well with the previously reported data for this enzyme¹⁸ and is corroborated by the efficiency rate value of the reaction at this pH. On the other hand, it had been previously demonstrated¹⁹ that a different activity of the enzymes is observed when a range of pHs are used. This fact had been explained on the ground that some electrostatic changes were effected in the molecules involved in the reaction¹⁹. This could be in agreement with the variation in the activity of the 5 α -R type 1 observed in this study.

The kinetic results obtained in this experiment indicated also that when DHT was added to the incubated medium, the conversion of T to DHT was not inhibited at concentrations of 1 and 1.5 μ M of T. On the contrary, the presence of 1 μ M of T induced an increase of the affinity of 5 α -R type 1 for its product, DHT (lower K_m value) and an increase in V_{\max} was observed. On the other hand, the efficiency rate value for this enzyme was higher when 1 μ M of T plus increasing concentrations of DHT were used, as compared to the experiment containing 1.5 μ M of T plus increasing concentrations of DHT. The result of

these experiments is similar to that previously reported by our group for 5 α -R type 2²⁰.

The overall data suggested that the decrease of T observed in elderly man could produce higher affinity of 5 α -R for its product DHT. As a consequence of this, an increase of the affinity for both isozymes²¹ could produce a higher synthesis of DHT in the target organs. This metabolic imbalance could induce a pathological illness such as prostate cancer, where an increase of 5 α -R type 1 activity had been noticed²¹.

On the other hand, it is important to consider that high levels of intracellular DHT result in cellular proliferation and delay cellular differentiation²². In this context previously it had been reported²³ that in advanced prostatic cancer the 5 α -R type 1 enzyme is expressed to a higher degree than the type 2. Furthermore, these authors demonstrated also that in the tissue located around cancer cells, the gene expression of 5 α -R type 1 is increased as compared with that found in benign prostatic hypertrophy²³.

On the ground of the findings given above, the effect of steroids **1–12** described in this study as inhibitors of 5 α -R type 1 could have a therapeutic potential for prostate cancer, since they are specific for the inhibition of 5 α -R type 1 enzyme, with the exception of **1** and **2** that also inhibited type 2 isozyme. These compounds have also the advantage that they did not bind to the AR and this phenomenon decreases the adverse effects and improves also their therapeutic potential. However one of the important goals is to decrease the IC₅₀ value of the 5 α -R types 1 and 2 inhibitors; these studies demonstrated that the change of the nature of the substituent in phenyl group of the ester moiety in C-3 of dehydroepiandrosterone skeleton is sufficient to change the inhibitory potency of synthesized compounds for the 5 α -R enzymes.

In this respect, the results of these experiments showed also that steroid **2** having a fluorine atom attached to the phenyl ring in the ester moiety, exhibited higher inhibitory activity for 5 α -R type 2 enzyme than steroid **1** which lacks the halogen atom. It appears that the higher electronegativity of compound **2** increases its binding affinity for this enzyme.

In vivo experiments showed also that finasteride and the synthesized steroids decreased the hamster's flank organs diameter size, thus indicating the presence of 5 α -R type 1 in this tissue. The result obtained for finasteride of the flank organ test in this study is similar to the previously reported by Chen et al.⁶ On the other hand the effect of steroids **1–12** in the flank organs correlated very well with the results obtained *in vitro*, since a decrease in the diameter of the flank organ spot produced by **1–12**, corresponds to an inhibition of 5 α -R type 1 in the *in vitro* experiments.

It is interesting to note that the aliphatic ester derivatives of dehydroepiandrosterone exhibited a higher 5 α -R type 2 enzyme inhibitory activity⁷ as compared to their aromatic counterparts. On the other hand, the aromatic

derivatives described in this paper showed an opposite phenomenon (the aromatic steroids exhibited a higher 5 α -R type 1 enzyme inhibitory activity as compared to their aliphatic homologues).

Furthermore, these studies demonstrated also that the treatment with steroids **1–12** applied to the hamsters for 6 days in the dose used did not produce any toxicological effect.

Future studies are planned in order to test the effect of these compounds in PC-3 line cells that exhibit some 5 α -R activity.

Declaration of interest

We thank CONACYT for its support for the project No 165049. This research did not have any real or perceived conflicts of interest and disclosure arising from intellectual, personal or financial circumstances of the research.

References

- Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 1994;63:25–61.
- Bonkhoff H, Stein U, Aumüller G, Remberger K. Differential expression of 5 alpha-reductase isoenzymes in the human prostate and prostatic carcinomas. *Prostate* 1996;29:261–267.
- Cabeza M, Heuze Y, Quintana H, Bratoeff E. Comparison between two different hamster models used for the determination of testosterone and finasteride activity. *Asian Journal Animal and Veterinary Advances* 2010;5:202–209.
- Takayasu S, Adachi K. The *in vivo* and *in vitro* conversion of testosterone to 17 -hydroxy-5 -adrosen-3-one (dihydrotestosterone) by the sebaceous gland of hamsters. *Endocrinology* 1972;90:73–80.
- Shiba K, Hamaguchi T, Kataoka K, Yamaguchi Y, Handa H, Adachi K. Cloning of the hamster androgen receptor gene. *J Dermatol Sci* 2001;26:163–168.
- Chen C, Puy LA, Simard J, Li X, Singh SM, Labrie F. Local and systemic reduction by topical finasteride or flutamide of hamster flank organ size and enzyme activity. *J Invest Dermatol* 1995;105:678–682.
- Arellano Y, Bratoeff E, Garrido M, Soriano J, Heuze Y, Cabeza M. New ester derivatives of dehydroepiandrosterone as 5 α -reductase inhibitors. *Steroids* 2011;76:1241–1246.
- Long BJ, Grigoryev DN, Nnane IP, Liu Y, Ling YZ, Brodie AM. Antiandrogenic effects of novel androgen synthesis inhibitors on hormone-dependent prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60:6630–6640.
- Marwah P, Marwah A, Lardy HA, Miyamoto H, Chang C. C19-steroids as androgen receptor modulators: design, discovery, and structure-activity relationship of new steroidal androgen receptor antagonists. *Bioorg Med Chem* 2006;14:5933–5947.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
- Levy MA, Brandt M, Greway AT. Mechanistic studies with solubilized rat liver steroid 5 alpha-reductase: elucidation of the kinetic mechanism. *Biochemistry* 1990;29:2808–2815.
- Davies P, Thomas P, Griffiths K. Measurement of free and occupied cytoplasmic and nuclear androgen receptor sites in rat ventral prostate gland. *J Endocrinol* 1977;74:393–404.
- Cabeza M, Vilchis F, Lemus AE, Díaz de León L, Pérez-Palacios G. Molecular interactions of levonorgestrel and its 5 alpha-reduced



- derivative with androgen receptors in hamster flanking organs. *Steroids* 1995;60:630-635.
14. Hirosumi J, Nakayama O, Fagan T, Sawada K, Chida N, Inami M et al. FK143, a novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5 alpha-reductase: (1) *In vitro* effects on human and animal prostatic enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;52:357-363.
 15. Bratoeff E, Sainz T, Cabeza M, Heuze I, Recillas S, Pérez V et al. Steroids with a carbamate function at C-17, a novel class of inhibitors for human and hamster steroid 5alpha-reductase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;107:48-56.
 16. Weisser H, Krieg M. Kinetic analysis of androstenedione 5 alpha-reductase in epithelium and stroma of human prostate. *Steroids* 1997;62:589-594.
 17. Hechter O, Mechaber D, Zwick A, Campfield LA, Eychenne B, Baulieu EE et al. Optimal radioligand exchange conditions for measurement of occupied androgen receptor sites in rat ventral prostate. *Arch Biochem Biophys* 1983;224:49-68.
 18. Normington K, Russell DW. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. *J Biol Chem* 1992;267:19548-19554.
 19. Segel IH. Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993.
 20. Cabeza M, Trejo KV, González C, García P, Soriano J, Heuze Y et al. Steroidal 5a-reductase inhibitors using 4-androstenedione as substrate. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2011;26:712-719.
 21. Thomas LN, Douglas RC, Rittmaster RS, Too CK. Overexpression of 5 alpha-reductase type 1 increases sensitivity of prostate cancer cells to low concentrations of testosterone. *Prostate* 2009;69:595-602.
 22. Dadras SS, Cai X, Abasolo I, Wang Z. Inhibition of 5alpha-reductase in rat prostate reveals differential regulation of androgen-response gene expression by testosterone and dihydrotestosterone. *Gene Expr* 2001;9:183-194.
 23. Goldenberg L, So A, Fleshner N, Rendon R, Drachenberg D, Elhilali M. The role of 5-alpha reductase inhibitors in prostate pathophysiology: Is there an additional advantage to inhibition of type 1 isoenzyme? *Can Urol Assoc J* 2009;3:S109-S114.

