

106860

106860

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRIA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LINEA DE INVESTIGACIÓN:
INVESTIGACIÓN BIOFARMACÉUTICA

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIANDROGÉNICA DE
ESTEROIDES DE NUEVA SÍNTESIS”

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS.

PRESENTA
SERGIO RECILLAS MORALES
MATRÍCULA 205382514

COMITÉ TUTORAL
Tutor: Dra. MARISA CABEZA SALINAS
Asesor: Dra. YVONNE M. HEUZE DE ICAZA
Asesor: Dr. EUGENE BRATOEFF TITEFF
Octubre, 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN BIOFARMACÉUTICA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIANDROGÉNICA DE ESTEROIDES
DE NUEVA SÍNTESIS”**

**COMUNICACIÓN IDONEA DE RESULTADOS QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**PRESENTA
SERGIO RECILLAS MORALES
MATRÍCULA 205382514**

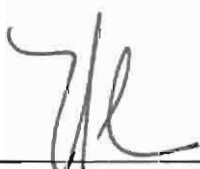
**COMITÉ TUTORAL
Tutor: Dra. MARISA CABEZA SALINAS
Asesor: Dra. YVONNE M. HEUZE DE ICAZA
Asesor: Dr. EUGENE BRATOEFF TITEFF**

Octubre 2008

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIANDROGÉNICA DE ESTEROIDES
DE NUEVA SÍNTESIS”



Vo.Bo. Tutor: Dra. MARISA CABEZA SALINAS



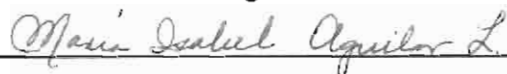
Vo.Bo. Asesor: Dra. YVONNE M. HEUZE DE ICAZA



SERGIO RECILLAS MORALES, 205382514

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIANDROGÉNICA DE ESTEROIDES
DE NUEVA SÍNTESIS”**

Dra. María Isabel Aguilar Laurents



Presidente



Dra. Gilda Flores Rosales

Vocal



Dra. Marisa Cabeza Salinas

Secretario

RESUMEN

Las enfermedades prostáticas, principalmente la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata son enfermedades andrógeno dependientes que tienen una gran importancia en la salud del hombre que alcanza una edad madura; el tratamiento para el cáncer de próstata suele ser drástico como la orquiectomía bilateral y aunque en ocasiones es una solución definitiva, para muchos individuos es inaceptable, por la gran variedad de alteraciones físicas y psíquicas que este tratamiento desencadena, por lo que hoy, en la lucha por brindar al enfermo una mejor alternativa terapéutica se está trabajando con antagonistas sintéticos del receptor de andrógenos, así como con inhibidores de la enzima 5 α -reductasa, con la finalidad de brindar una mejor calidad de vida al paciente que padece estas enfermedades.

Los compuestos antiandrogénicos y los inhibidores de la 5 α -reductasa, son pocos en el mercado y tienen diferentes mecanismos de acción. Algunos muestran efectos secundarios muy severos, así como altos costos que reducen su utilidad clínica. Entre los efectos nocivos se encuentran: La pérdida de la libido, la impotencia, anormalidades en el semen y la atrofia celular.

En este estudio se demostró la actividad antiandrogénica de 15 esteroides de nueva síntesis, ordenados en diferentes series de acuerdo a la naturaleza de su estructura. Estos fueron estudiados *in vitro* e *in vivo* como inhibidores de la actividad de la enzima 5 α -reductasa y como inhibidores competitivos del receptor de andrógenos, también fueron probados en modelos biológicos como antiandrógenos.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Marisa Cabeza, por su gran dedicación y compromiso profesional, ha sido un apoyo invaluable, por el amor a la puntualidad, su apego a la disciplina, su carácter estricto pero leal, honesto y dinámico.

Al Doctor Bratoeff y su comprometido grupo de colaboradores, por el gran respeto que infunde, por su trabajo siempre cumplido a filo de la honestidad de la cortesía y del buen trato en todo lo disciplinario.

A la Doctora Ivonne Heuze y a todos los compañeros del bioterio, por darme toda la participación y confianza para llevar a efecto tan valiosas prácticas porque sin su aporte definitivamente este trabajo no hubiera llegado a buen puerto.

A CONACYT por el apoyo financiero gracias al programa de apoyo a becarios de posgrados de calidad con número de convenio 70662.

Al Doctor Abisail Alcántara y sus colaboradores, por proveernos tan gentilmente el material biológico para las pruebas de conversión de la enzima 5 α -reductasa.

A Jesús por dejarme concluir satisfactoriamente con este proyecto.

A mi familia por ser el remanso de mis tempestades, por aceptarme tal cual soy y por apoyar cada uno de mis pasos. Los amo intensamente.

A mis amigos por nunca retirarme su confianza y su cariño a pesar de mis inconsistencias.

Índice

INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	11
<i>Función biológica y mecanismo de acción de los andrógenos</i>	11
<i>Funciones de la testosterona</i>	14
<i>Dihidrotestosterona y 5α- reductasa</i>	15
<i>El receptor de andrógenos</i>	18
<i>Efecto de andrógenos en los tejidos</i>	22
<i>Órganos del flanco del hámster</i>	22
<i>Próstata</i>	23
<i>Vesículas seminales</i>	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODO	28
<i>Reactivos químicos</i>	28
<i>Material químico</i>	28
<i>Material biológico</i>	28
<i>Determinación in vitro de la actividad de la 5α-reductasa</i>	31
<i>Determinación in vitro de la concentración de los nuevos esteroides que inhiben el 50% de la actividad de 5α-reductasa (IC₅₀)</i>	32
<i>Determinación in vitro de la actividad relativa de unión (ARU) de los compuestos de nueva síntesis al receptor de andrógenos</i>	32
<i>Análisis de competencia in vitro del receptor de andrógenos</i>	33
<i>Determinación del Log P</i>	34

RESULTADOS	35
<i>Experimentos in vivo</i>	35
<i>Prueba del órgano del flanco</i>	35
<i>Peso de la próstata</i>	35
<i>Peso de las vesículas seminales</i>	35
<i>Experimentos in vitro</i>	40
<i>Actividad de 5α-reductasa</i>	40
<i>Concentración de los nuevos esteroides que inhiben el 50% de la actividad de 5α-reductasa</i>	40
<i>Curva de saturación del receptor de andrógenos presentes en el citosol de próstata de ratas</i>	45
<i>Afinidad relativa de unión de los compuestos de nueva síntesis por los receptores de andrógenos</i>	46
<i>Valores de Log P</i>	46
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	62

INTRODUCCIÓN

La testosterona y otros andrógenos, además de las acciones durante el desarrollo fetal ejercen un efecto inhibitor sobre la secreción de la hormona luteinizante (LH), desarrollan y conservan los caracteres sexuales secundarios masculinos, ejercen un efecto importante proteínico-anabólico promotor del crecimiento y, junto con la hormona folículo estimulante (FSH), estimulan la espermatogénesis (Ganong, 2002).

Las propiedades farmacológicas de los andrógenos están profundamente influidas por dos aspectos de su metabolismo, en primer lugar, la testosterona, la hormona secretada por los testículos, se metaboliza hasta generar otros esteroides con actividad hormonal en los tejidos periféricos, como la 5α -dihidrotestosterona, y metabolitos estrogénicos. En segundo lugar la testosterona (T) y la dihidrotestosterona (DHT) actúan por medio de un receptor común, en tanto que los metabolitos estrogénicos lo hacen mediante el receptor de estrógenos (Harman, 1996).

Los receptores androgénicos juegan un papel preponderante en el desarrollo sexual y fisiología a través de señales hormonales (Summerfield, 1995). Existe bastante evidencia de que las células que responden a las hormonas androgénicas contienen proteínas receptoras capaces de unirse indistintamente a testosterona o su metabolito 5α -reducido, la dihidrotestosterona (Wilson, 1976).

Los receptores de andrógenos se encuentran presentes en las células de la próstata y una vez que se unen al andrógeno, el complejo hormona-receptor se transporta al núcleo en donde se une a los elementos de respuesta hormonal presentes en el DNA y en esta forma se traduce el mensaje contenido en los genes (Steinspair, 1991). Los antagonistas de andrógenos ofrecen una alternativa potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades andrógeno dependientes como son el cáncer de próstata, la hiperplasia prostática benigna, el síndrome de

ovarios poliquísticos, el hirsutismo en mujeres, el acné, la seborrea, la alopecia androgénica y la pubertad precoz (Cabeza, 2006; Bratoeff, 2004).

ANTECEDENTES

Función biológica y mecanismo de acción de los andrógenos

Las funciones reproductoras del varón pueden dividirse en tres eventos principales: primero la espermatogénesis, segundo, la realización del acto sexual masculino y tercero, el efecto de las hormonas sexuales sobre el organismo (Guyton, 1997).

Los testículos secretan varias hormonas sexuales masculinas, que reciben el nombre de andrógenos y que son la testosterona (T) **1**, la dihidrotestosterona (DHT) **2**, Figura 1, la androstenediona y la androstandiona. La concentración de testosterona en el plasma es superior a la de las otras hormonas que se producen en el testículo por lo que es la hormona testicular más importante (Raynaud, 2002); la mayoría, de la testosterona es convertida en dihidrotestosterona (DHT), en los tejidos diana (Armory y Bremner, 2003)

La testosterona (T) se forma en las células intersticiales de Leydig, que se encuentran situadas en los intersticios que quedan entre los túbulos seminíferos y que constituyen aproximadamente el 20 % de masa de los testículos en el adulto (Ahmad y Warren, 1983; Wang y Stocco, 2005).

Existe secreción de andrógenos en otros tejidos diferentes al testículo, por ejemplo, las glándulas suprarrenales, que secretan por lo menos cinco andrógenos diferentes. Dichos andrógenos se secretan en cantidades pequeñas por lo que no tienen una actividad masculinizante importante en el adulto (Hofbauer y Khosla, 1999).

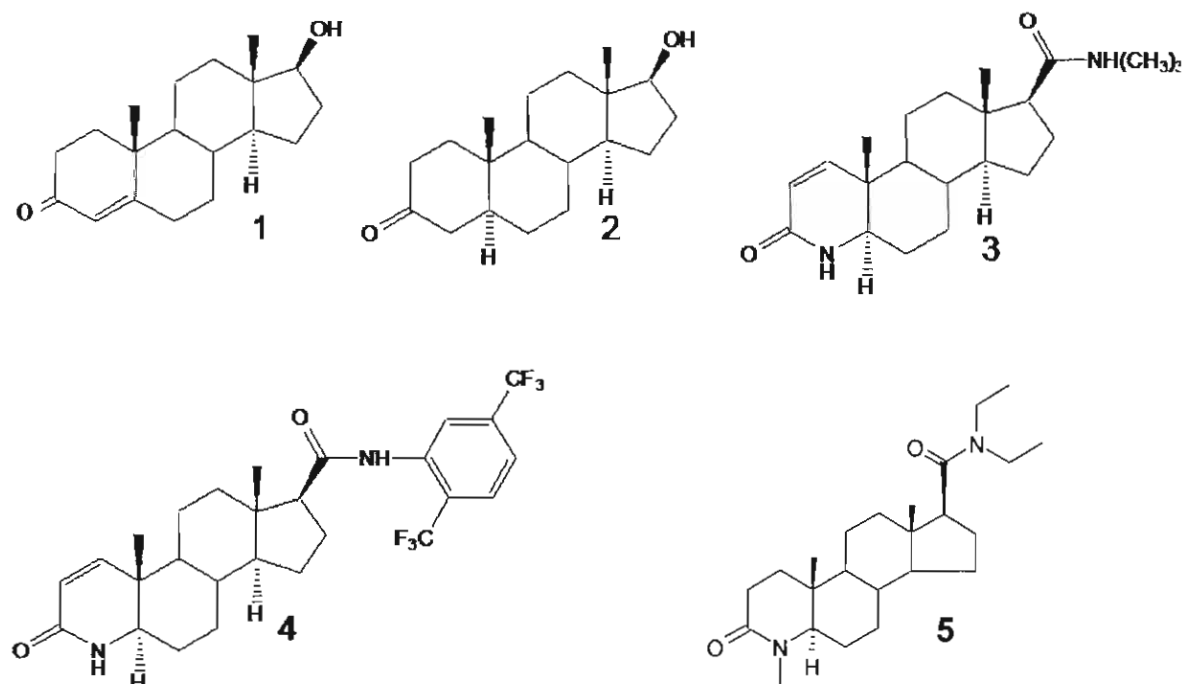


Figura 1. Compuestos inhibidores de la 5α-reductasa: 1 testosterona, 2 dihidrotestosterona, 3 finasterida, 4 dutasterida, 5 4MA (Cabeza, 2004).

Gran parte de la T que se fija a los tejidos se convierte en el interior de las células en DHT, especialmente en ciertos órganos diana como la glándula prostática en el adulto, la piel y los genitales externos en el feto varón. Algunas acciones de la T dependen de esta conversión, mientras otras son independientes de ella (Hirosumi, 1995; Gustafsson, 1974).

La T que no se fija a los tejidos se convierte con rapidez en andrógenos inactivos como la androsterona y la dihidroepiandrosterona, principalmente en el hígado. Estos esteroides son simultáneamente conjugados a glucurónidos o sulfatos y más tarde se excretan por el intestino con la bilis o por la orina a través de los riñones (Ganong, 2002).

Funciones de la testosterona

La T es la hormona responsable de las características distintivas del cuerpo masculino. Incluso durante la vida fetal los testículos son estimulados por la gonadotropina coriónica para producir cantidades moderadas de testosterona. Tras la pubertad, la reanudación de la secreción de testosterona hace que el pene, el escroto, y los testículos aumenten unas ocho veces de tamaño antes de los veinte años de edad. Además, la testosterona provoca que se desarrollen los caracteres sexuales secundarios del varón, comenzando en la pubertad y terminando en la madurez. Estos caracteres sexuales secundarios, distinguen al varón de la mujer de varias maneras: Distribución de vello corporal y del cabello, la voz, la piel, la síntesis de proteínas y desarrollo muscular, el crecimiento óseo y la retención de calcio, el metabolismo basal, la estimulación de la médula ósea como hematopoyético, el equilibrio electrolítico e hídrico y el sistema nervioso (Hajszan T, 2008).

Los andrógenos juegan un papel crucial en el desarrollo, mantenimiento y regulación del fenotipo masculino y fisiología reproductiva. La acción de los andrógenos es mediada por el receptor de andrógenos (RA) (Gobinet, Poujol y

Sultan, 2002) el cual es un miembro de la súper familia de receptores nucleares (RN); esta superfamilia incluye receptores a glucocorticoides, mineralocorticoides, receptores a progesterona, estrógenos y retinoides (Zhu, 2001). Los RN se unen al DNA y activan factores de transcripción que codifican varios mRNA que se traducen en la síntesis de las proteínas necesarias para diferentes procesos biológicos como crecimiento, desarrollo y diferenciación celular (Gobinet, 2002; Lee y Chang, 2003; Steinsapir, 1991).

Las hormonas esteroidales (testosterona, estrógenos, progesterona, cortisol y aldosterona), producidas por la corteza suprarrenal y las gónadas, debido a su naturaleza hidrofóbica no se disuelven fácilmente en la sangre por lo que son transportadas por proteínas específicas, desde el punto de su liberación hasta los tejidos en donde ejercerán su acción (tejidos diana). Estas hormonas atraviesan la membrana plasmática por difusión simple, se metabolizan y se unen a proteínas receptoras específicas presentes en el citoplasma y núcleo. Estas proteínas receptoras, se encuentran en concentraciones entre 10,000 y 100,000 moléculas por célula y se unen a su respectivo esteroide de forma reversible pero con alta afinidad (Steinsapir, 1998).

Dihidrotestosterona y 5 α - reductasa

La DHT es un potente andrógeno que induce la formación de los genitales externos en la etapa fetal del individuo, así como el desarrollo del tejido prostático. Dicho esteroide se forma a partir de la T en los tejidos diana debido a la presencia de la enzima 5 α -reductasa (Summerfield, 1995). La 5 α -reductasa es una enzima NADPH dependiente (Cabeza, 2006) y está constituida de 254 a 260 aminoácidos en su mayoría hidrofóbicos, con un peso molecular de 28,000 a 29,000 y se encuentra localizada en la membrana nuclear (Russell y Wilson, 1994).

Existen dos isoenzimas de 5 α - reductasa, la tipo 1 y la tipo 2, la isoenzima tipo 1 presenta su actividad óptima a un pH de 7 a 8.5, mientras que la isoenzima

de tipo 2 a un pH de 5, esta propiedad *in vitro* ha sido utilizada en estudios de laboratorio para diferenciar la actividad de ambas enzimas en diferentes pH y tejidos (Stuart, 2001; Russell y Wilson, 1994).

Los genes para las dos isoenzimas de 5α -reductasa contienen 5 exones separados por cuatro secuencias invertidas. La posición de los intrones es esencialmente idéntica en los dos genes. Los genes están localizados en dos cromosomas diferentes, el gen que codifica para la isoenzima 1 (*SRD5A1*) se encuentra localizado en la porción distal corta del cromosoma 5 (banda p15), mientras que el gen de la isoenzima 2 (*SRD5A2*) está localizado en la banda p23 del cromosoma 2.

Existen diferencias en los tejidos en donde se encuentran las diferentes isoenzimas, como se puede apreciar en la Tabla 1:

Tabla 1. Tejidos que presentan actividad de 5α -reductasa de tipos 1 y 2 en los humanos

Tejido	Tipo 1	Tipo2	Método de detección
• Próstata, epidídimo, vesículas seminales, escroto.	-	++	mRNA
• Testículo, ovario, adrenales, cerebro, riñón.	-	-	mRNA
• Hígado	+	+	mRNA
• Piel	++	-	mRNA

(Russell D. W. y Wilson J. D. Ann Reviews, 63 (1994) 25-61)

Se ha visto que individuos con deficiencia de 5α -reductasa presentan genitales internos normales (epidídimo, vesículas seminales, vasos deferentes), mientras que los genitales externos se observan semejantes a los de una hembra, además estos sujetos en la vida adulta no presentan calvicie ni acné. El conocimiento de que la DHT induce el crecimiento de la próstata se basa en el hecho de que los individuos con esta deficiencia presentan una próstata pequeña lo que ha estimulado el desarrollo de fármacos con efecto inhibitor de esta enzima para tratar padecimientos andrógeno-dependientes como son: la hipertrofia prostática benigna, el cáncer de próstata, la calvicie y el acné, entre otras por lo que la 5α -reductasa, juega un papel muy importante en el desarrollo masculino, así como en su fisiología y sus padecimientos (Thigpen, 1992; Wilson, 1993).

Los inhibidores de la 5α -reductasa más estudiados son los 4-aza esteroides (Figura 1) como: la finasterida **3**, la dutasterida **4** (Machetti y Guarna, 2002) y el compuesto conocido como 4MA **5** (Liang, 1984). Estos compuestos tienen muy baja afinidad por el receptor de andrógenos por lo que no es de esperarse que presenten efectos no deseados como la impotencia, la disminución de la libido, la disminución del tamaño de los genitales, la debilidad muscular, disminución de la densidad ósea e incremento de tejido adiposo (Levy, 2008). Sin embargo el 4MA Figura 1, es un fármaco que se ha visto que inhibe otros tipos de enzimas que metabolizan esteroides como la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y que además causa hepatotoxicidad, por lo que no ha podido ser utilizado (Brandt y Levy, 1989). Por otra parte, la finasterida que es un fármaco inhibidor irreversible de la 5α -reductasa de tipo 2 junto con la dutasterida que es un inhibidor de las 5α -reductasas tanto tipo 1 como tipo 2 son los únicos fármacos aprobados por la FDA de los Estados Unidos de Norteamérica (Russell y Wilson, 1994). A pesar de que son fármacos muy estudiados, se ha visto que en algunas personas presentan efectos colaterales como la disminución de la libido. En la Figura 3, se presenta el mecanismo de acción de la finasterida.

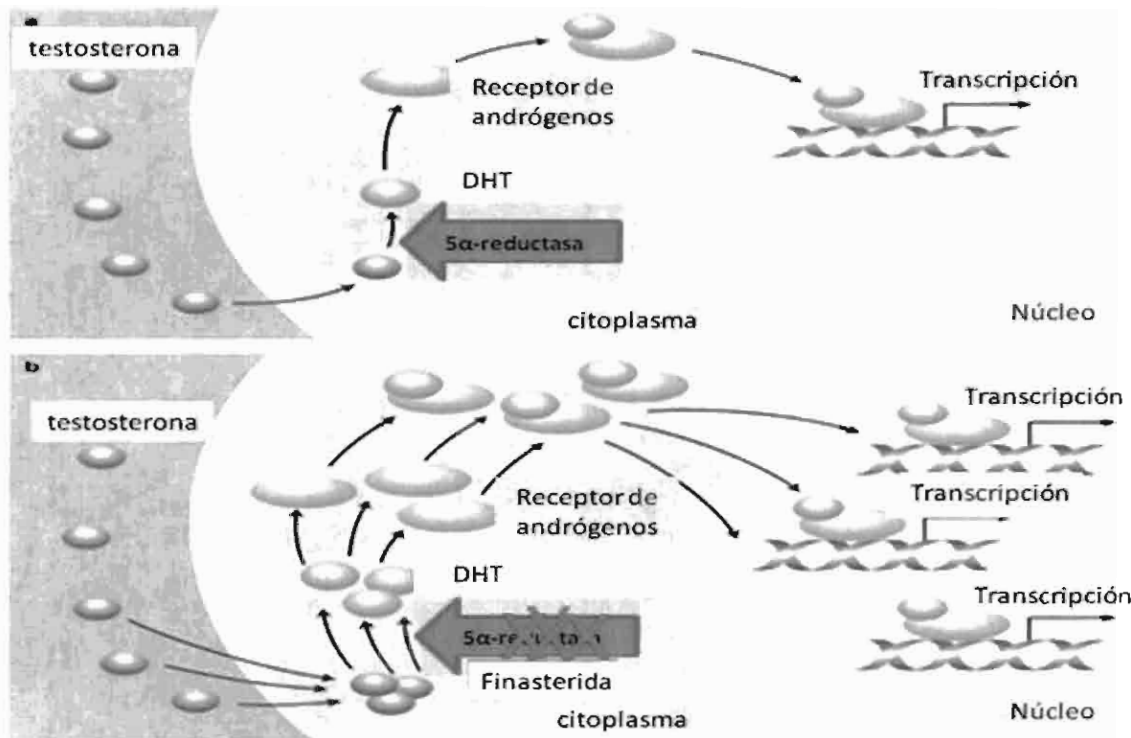


Figura 3. Panel a: Mecanismo de acción de andrógenos. Panel b: efecto de la finasterida. (Modificado de <http://www.urmc.rochester.edu/changartab/images/ARmechanism.JPG>).

El receptor de andrógenos

Existe gran evidencia de que las células responsivas a andrógenos contienen proteínas receptoras capaces de unirse a testosterona o a su metabolito 5α-reducido, la DHT; sin embargo permanece poco claro el hecho del por qué los receptores de andrógenos se unen con mayor afinidad a la DHT que a la testosterona (T) en tejidos como la próstata y el epidídimo, mientras que en otros órganos como el testículo, la T se une con mayor afinidad al receptor que la DHT. Para contestar a esta pregunta se han propuesto dos mecanismos: la afinidad del receptor y la concentración intracelular del andrógeno para unirse al receptor (Wilson y French, 1976).

El RA es codificado por un solo gene que se encuentra en la región 11-12 q del cromosoma X. El RA es una proteína que está constituida de 917 a 919 aminoácidos y sólo existe una isoforma en los mamíferos, como ya se dijo, el RA se encuentra involucrado en una variedad de funciones como el desarrollo y la

maduración sexual. Como todos los receptores que pertenecen a la súper familia de RN, el RA contiene varios dominios, un dominio de unión al DNA, un dominio de unión al ligante, un dominio amino terminal y un dominio carboxi-terminal (Chen, 2004; Shaffer, 2004).

El dominio N-terminal, está implicado en la activación transcripcional y requiere de un coregulador, que puede ser un coactivador o un correpresor. La región que contiene el sitio de activación transcripcional se encuentra constituida por una cadena de 51 a 211 aminoácidos. El dominio de unión al DNA, está constituido por una cadena de 66 aminoácidos y presenta cuatro dedos de zinc los cuales se unen a la cadena de DNA. Este dominio se encuentra conservado en los diferentes receptores a esteroides (Gobinet, 2002; Shaffer, 2004).

Los andrógenos se encuentran libres dentro de las células, la acción de éstos está mediada por el RA el cual, normalmente se une a la T o a la DHT con una alta afinidad (0.1 nM), con una capacidad limitada de unión y se encuentra en el citoplasma. En presencia del andrógeno, el RA experimenta un cambio en su conformación, cuyo resultado es la formación de un homodímero (Jänne y Bardin, 1984). El complejo hormona receptor interactúa entonces con el elemento de respuesta hormonal específico presente en el DNA y activa la transcripción de los genes específicos, Figura 4. Esta interacción resulta en la formación de proteínas y la subsecuente alteración en la función celular (Fix, 2004; Cabeza, 2004).

Estudios recientes en biología molecular, han llevado a la identificación de muchos coreguladores (coactivadores y correpresores), que interactúan con las proteínas receptoras y juegan un papel importante en la activación transcripcional (Heinlein y Chang, 2002). Los coactivadores son proteínas que mejoran la actividad transcripcional, éstos pueden servir como un puente o un adaptador molecular, así como, reclutando proteínas adicionales; existe una lista grande y creciente de coactivadores que se actualiza continuamente. Los correpresores tienen como función una regulación negativa o represiva de la

actividad transcripcional, también existe una lista importante de estos (Dotzlaw, 2003; Ishizuka, 2005).

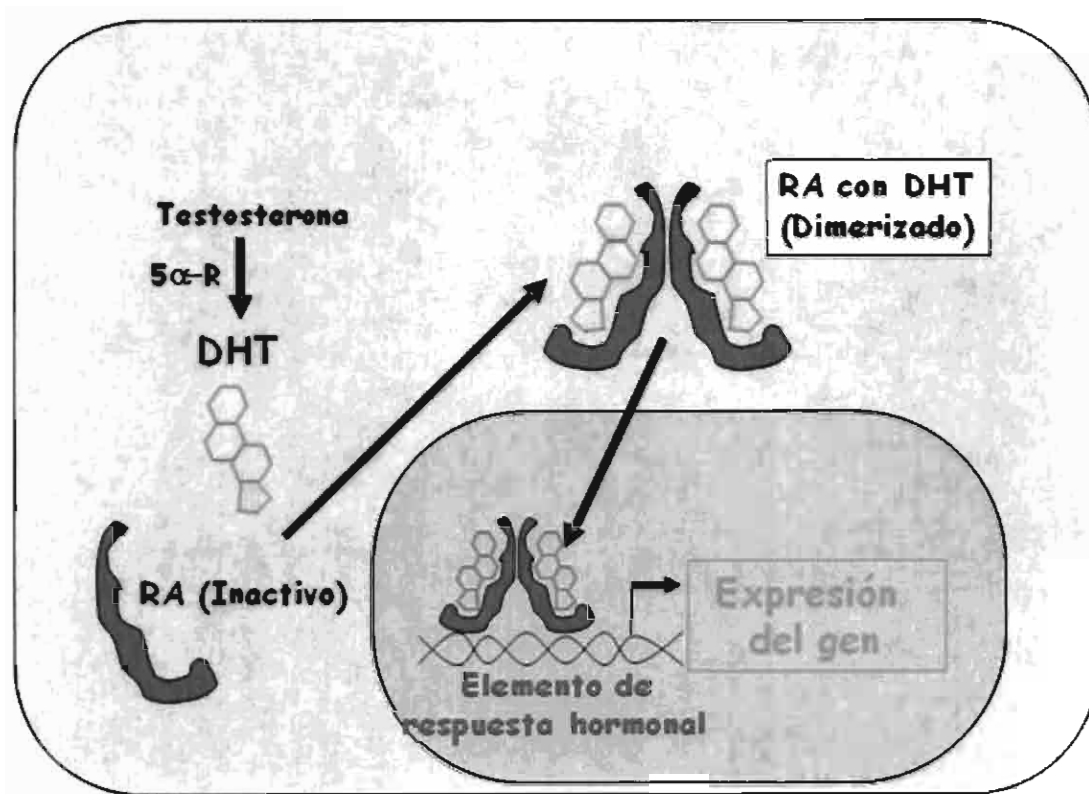


Figura 4. Mecanismo de acción de la DHT en las células blanco.

Muchos receptores nucleares, incluyendo los de esteroides sexuales y adrenocorticoideas, son recuperados de las células como grandes heterocomplejos que contienen proteínas de choque térmico (hsp por sus siglas en inglés) e inmunofilinas (Georget, 2002; Yong, 2007). Algunos de los componentes del heterocomplejo del receptor son proteínas con función de chaperonas (hsp90 y hsp70), la función de estas proteínas es crítica pues facilitan el plegamiento del dominio de unión a la hormona, para producir una conformación de unión al andrógeno de alta afinidad. La disociación de las proteínas receptoras de las chaperonas genera un sitio de unión al ligante y ésta es la forma activa del receptor (William y Toft, 1997).

Tanto la T como la DHT se unen aparentemente con la misma constante de disociación al RA (K_d 0.1-0.3 nM); sin embargo, la DHT es un andrógeno más efectivo que la T, en parte porque se disocia más lentamente del RA. La velocidad de disociación de la DHT es aproximadamente tres veces menor que la de la T, mientras que ambas tienen una afinidad de unión similar y de ahí sus diferencias en la actividad (Robel, 1983).

Una gran variedad de moléculas pueden antagonizar la acción biológica de los andrógenos. Ejemplo de estos compuestos son esteroides como los estrógenos, progestinas y derivados de andrógenos o derivados de compuestos no esteroidales como la flutamida y el compuesto RU 23908. Uno de los mecanismos por los cuales los antiandrógenos pueden ejercer su acción es la interacción directa con el sitio de unión del receptor citosólico. El complejo antagonista-receptor formado durante la interacción es estructuralmente incapaz de mostrar efecto hormonal. Antiandrógenos esteroidales como la ciproterona o la espironolactona, son de hecho, capaces de competir por el sitio de unión de los andrógenos como la testosterona o su metabolito 5α -reducido (Cabeza, 2005; Steinsapir, 1991).

Estudios muy elaborados han demostrado que existe un espacio hidrofóbico en la molécula del receptor de andrógenos que es muy conservado entre los receptores de esteroides y que no es de fácil acceso, es decir las moléculas que pueden entrar en este espacio deben ser hidrofóbicas en el centro para unirse por fuerzas de Van der Waals a la proteína de unión y formar puentes de hidrógeno en los extremos. El contenido de aminoácidos hidrofóbicos de la molécula receptora muestra una clara complementación con las propiedades apolares de los ligantes y los pocos residuos de aminoácidos polares aseguran el anclaje y la selectividad por el ligando en los extremos (Gobinet, 2002).

Efecto de andrógenos en los tejidos

Órganos del flanco del hámster

Los órganos del flanco (Figura 5), son glándulas sebáceas localizadas en la región proximal de la cadera en la parte dorsal del hámster, se ven dos manchas bilaterales pigmentadas color café oscuro. Estas glándulas se encuentran menos desarrolladas en las hembras que en los machos y su función principal es el marcaje de territorio ya que son animales muy territoriales (Heuze, 2007). En los machos maduros son prominentes y manifiestan cambios durante la excitación sexual (Quesenberr y Carpenter, 2004); miden 8 mm de diámetro, mientras que en las hembras miden 2 mm (Cabeza y Miranda, 1997). Su estructura esta formada por complejos pilosebáceos andrógeno-dependientes. Después de la castración en los machos el diámetro de la mancha y su pigmentación disminuye hasta el tamaño que se encuentra en las hembras, mientras que la inyección diaria de T recupera el diámetro de la mancha a su tamaño original en machos castrados con anterioridad, demostrando que son glándulas andrógeno-dependientes. Los órganos del flanco tienen la capacidad de convertir T a DHT y se utilizan para probar la actividad de nuevos compuestos antiandrogénicos (Flores, 2003; Bratoeff, 2005).



Figura 5. Órganos del flanco del hámster.

Los órganos del flanco son altamente sensibles al estímulo de andrógenos, los componentes sensitivos a los andrógenos incluyen a los melanocitos, glándulas sebáceas y folículos pilosos. Por esta razón estos animales han sido utilizados como modelos biológicos en una gran variedad de experimentos para probar la actividad androgénica y antiandrogénica de nuevos compuestos. Otra ventaja de este modelo es que se pueden administrar tratamientos de manera tópica a un solo órgano dejando el de lado contralateral como control (Hsia y Voigt, 1974; Liao, 2001).

Próstata

La próstata es una glándula sexual exocrina, localizada en la base de la vejiga rodeando la uretra, su función es secretar enzimas y compuestos que constituyen aproximadamente 15% del volumen del líquido seminal. El desarrollo y la función de la próstata es estrictamente dependiente de los andrógenos. Una falta de andrógenos o un defecto en su metabolismo durante el desarrollo puede resultar en una falta de desarrollo prostático. En el adulto, la orquiectomía quirúrgica o química resulta en una pérdida de la actividad secretoria y eventualmente una involución de la próstata y pérdida de la masa prostática (Prescott y Tindall, 1998).

Como se ha mencionado con anterioridad existen dos andrógenos naturales muy potentes, T y DHT, estos se encuentran presentes en todos los mamíferos incluyendo al hombre. La T que es la hormona primaria sintetizada y secretada por los testículos tiene cierta preferencia por algunos tejidos incluyendo el prostático, en donde la T es convertida a DHT por la enzima 5α -reductasa.

La próstata es un tejido ductal-acinar cuyo desarrollo y crecimiento inicia en la etapa fetal del individuo y se completa cuando éste alcanza su madurez sexual. El desarrollo de la próstata a las diez semanas de la vida fetal del humano requiere de muchos procesos celulares coordinados e involucra múltiples genes y

acciones hormonales, la DHT juega un papel esencial en el desarrollo y crecimiento de esta glándula (Zhu, 2005).

Vesículas seminales

Los primeros estudios anatómicos de las vesículas seminales indicaron erróneamente que los espermatozoides se almacenan en ellas, de ahí el nombre, sin embargo, estas estructuras son sólo glándulas secretoras, no áreas de almacenamiento.

Cada vesícula seminal es un túbulo tortuoso, lobulado, revestido de un epitelio secretor que secreta un material mucoide rico en fructosa, ácido cítrico y otras sustancias nutritivas, así como grandes cantidades de prostaglandinas y fibrinógeno. Durante el proceso de emisión, cada vesícula seminal vacía su contenido al conducto eyaculador poco tiempo después de que el conducto deferente vacíe los espermatozoides en el momento de la eyaculación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades prostáticas, principalmente hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata son enfermedades andrógeno dependientes que tienen una gran importancia en la salud del hombre que alcanza una edad madura; el tratamiento para el cáncer de próstata suele ser drástico como la orquiectomía bilateral y aunque en ocasiones es una solución definitiva, para muchos individuos es inaceptable, por la gran variedad de alteraciones físicas y psíquicas que este tratamiento desencadena, por lo que hoy, en la lucha por brindar al enfermo una mejor alternativa terapéutica se está trabajando con antagonistas sintéticos del receptor de andrógenos, así como con inhibidores de la 5 α -reductasa, con la finalidad de brindar una mejor calidad de vida al paciente que padece estas enfermedades.

Los compuestos antiandrogénicos y los inhibidores de la 5 α -reductasa, son pocos en el mercado y tienen diferentes mecanismos de acción. Algunos muestran efectos secundarios muy severos, así como altos costos que reducen su utilidad clínica. Entre los efectos nocivos se encuentran anormalidades hormonales tales como: Pérdida de la libido, impotencia, anormalidades en el semen y atrofia celular (Biffignandi, 1987). Por lo que en este trabajo se pretende probar compuestos esteroidales de nueva síntesis para determinar si tienen actividad antiandrogénica.

HIPÓTESIS

Los esteroides de nueva síntesis pueden tener la capacidad de unión con los receptores de andrógenos presentes en la fracción citosólica de la próstata de las ratas y posiblemente inhiban la actividad de la enzima 5α - reductasa, que se encuentra en la fracción membranal de la próstata de cadáveres humanos, quizás también tengan actividad antiandrogénica *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad antiandrogénica de algunos compuestos de nueva síntesis, mediante pruebas *in vitro* e *in vivo* en diferentes modelos biológicos.

Objetivos específicos

Determinar la capacidad de los esteroides de nueva síntesis sintetizados por el grupo del Dr. Eugene Bratoeff en la Facultad de Química de la UNAM, de inhibir la actividad de la enzima 5α -reductasa, presente en la fracción membranal de próstata de cadáveres humanos.

Determinar la unión máxima (B_{max}) y la constante de disociación (K_d) del receptor de andrógenos presente en el citosol, obtenido a partir de próstata de ratas castradas, a la [H^3] mibolerona.

Determinar la afinidad relativa de unión de los esteroides de nueva síntesis con el receptor de andrógenos, que se encuentra en el citosol obtenido a partir de próstatas de ratas castradas.

Determinar el efecto *in vivo* de los nuevos esteroides sobre el peso de la próstata, peso de las vesículas seminales y el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco de hamsters tratados con testosterona o dihidrotestosterona y/o los esteroides de nueva síntesis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos químicos

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico, testosterona [H^3] (T [H^3]) con una actividad específica de 95 Ci/mmol y mibolerona [H^3] (MB[H^3]) con actividad específica de 70-87 Ci/mmol; ambas se obtuvieron de los laboratorios Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA.). La testosterona (T), la dihidrotestosterona (DHT) y mibolerona (Mb) radioinertes de laboratorios Steraloids (Wilton, NH, USA). La finasterida (F) se obtuvo por la extracción de tabletas de Proscar (Merk, Sharp & Dohme). El NADPH, DTT, el carbón activado y el dextrano fueron suministrados por Sigma Chemicals Co. (St. Louis MO.).

Material químico

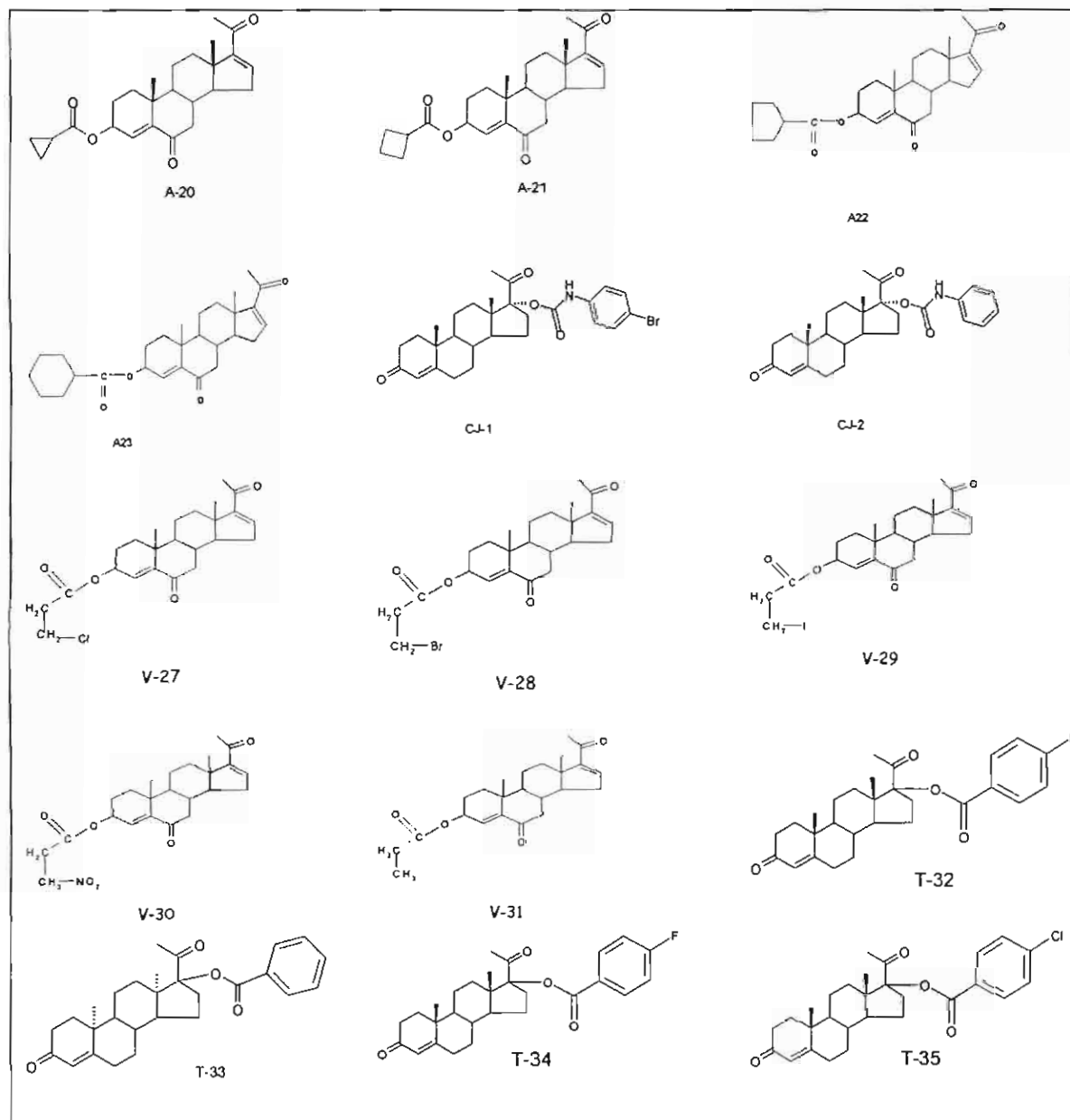
Los nuevos esteroides a probar fueron sintetizados por el grupo del Dr. Eugene Bratoeff en la Facultad de Química de la UNAM y se presentan en la tabla 2.

Material biológico

La actividad de 5α -reductasa, se determinó utilizando próstata de cadáver humano, la cual fue gentilmente donada por el Dr. Avissai Alcántara, Jefe del Depto. de Patología del Hospital General de México (SS) en el DF. La próstata de cadáver humano se conservó en congelación hasta su procesamiento. El tejido se descongeló, se cortó finamente con tijera y se homogeneizó, utilizando un homogeneizador Ultraturrax IKA T-18 Basic (IKA Lbs, Wilmington, CA, USA) en solución amortiguadora de fosfatos, medio A conteniendo sacarosa a una concentración 0.32 M, ditiotritol 0.1 mM y solución amortiguadora de fosfatos 20 mM a un pH de 6.5; el homogeneizado se centrifugó a 1500x g (3,400 rpm)

utilizando un rotor SW 27 y una ultracentrífuga Modelo Optima (Beckman Coutler, USA) para obtener la fracción membranal en donde se encuentra la enzima.

Tabla 2. Compuestos esteroides de nueva síntesis probados.



Para determinar la actividad de unión de los nuevos compuestos (tablas 6-9) al receptor de andrógenos, se utilizaron próstatas de ratas wistar (*Rattus norvegicus*) castradas con 48 horas de anterioridad. El tejido prostático de rata se cortó finamente con tijeras, se transfirieron a tubos de ensaye con amortiguador TEMD (TRIS-HCl a una concentración de 20 mM, EDTA 1.5 mM, molibdato de sodio 20 mM, ditioneitol 0.25 mM y glicerol al 10 % a un pH de 8) además de inhibidores de proteasas antipaína 10mM y fenilmetilsulfonol-fluoruro (PMSF) 0.5 mM, en una relación 1:1 v/v, se homogenizó y el homogenizado se centrifugó a 140,000 g por una hora a 4°C para obtener el sobrenadante (fracción citosólica).

El protocolo fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (CICUAL-UAM-X) y conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-ZOO-062-1999.

Para los experimentos *in vivo*, se utilizó como biomodelo experimental al hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*); los animales se obtuvieron de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio-Bioterio (UPEAL-B), de la UAM-X dichas instalaciones cuentan con la certificación de la SAGARPA (BOO.02.03.02.01.28 1/07).

Se requirió de machos adultos de 150 a 200g gonadectomizados 30 días antes del experimento. El procedimiento quirúrgico se realizó bajo anestesia general con pentobarbital sódico administrado por vía intraperitoneal a dosis de 80 mg/kg de peso vivo (Field K. y Sibold A. 2000) y se vigiló el postoperatorio de los animales, administrando como terapia analgésica 50 mg de dipirone (Anesín, Laboratorios Brovel) por vía intramuscular durante dos días. Como medida antiséptica se administró por vía tópica aluminio micronizado (Aluspray, Laboratorios Vétoquinol), directamente en la herida inmediatamente al finalizar la cirugía.

Los animales se mantuvieron en condiciones micro y macroambientales controladas con: filtros HEPA terminales en el cuarto de investigación,

temperatura de 22 °C +/- 2°C , humedad del 45% al 55 % y un fotoperíodo de 12 luz/12 oscuridad. Estos parámetros son registrados diariamente cada dos horas como se muestra en el anexo 1. Se alojaron en jaulas tipo microaisladores estáticos de polisulfon con encamado de madera, previamente esterilizado. El alimento suministrado fue 5001 de Purina Mills International (PMI) y agua tratada por ozono, ambos se proporcionaron a libre demanda.

Determinación in vitro de la actividad de la 5 α -reductasa

La actividad de la 5 α -reductasa presente en la fracción membranal obtenida se determinó incubando 80 μ L del homogeneizado que contienen 237 μ g de proteína, determinada por el método de Bradford (Bradford, 1986) en presencia de T [H³] 2nM, NADPH 2 mM y ditiotreitól 1 mM en un mL de solución amortiguadora de fosfatos 40 mM a pH de 6.5. La incubación se realizó en baño maría a una temperatura de 37 °C por una hora; transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo con un mL de diclorometano. También se hizo una incubación control en las mismas condiciones descritas, pero sin la presencia de tejido. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Los tubos conteniendo la mezcla de incubación se agitaron con vortex por un minuto y más tarde se extrajo la fase orgánica para separar el material marcado; el procedimiento de extracción se repitió 5 veces y la fase orgánica se evaporó a sequedad.

El extracto se resuspendió en 5 μ l de metanol y se aplicó a una placa cromatográfica de gel de sílice con indicador, en base de aluminio (HPTLC-60F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Alemania). En ambos lados de la placa, en carriles diferentes a los de la muestra, se aplicaron 10 μ g de T y DHT radioinertes, como estándares de referencia. La placa se eluyó en cubas cromatográficas, utilizando una mezcla de disolventes de cloroformo-acetona 9:1, a temperatura ambiente hasta el frente

de la placa. El procedimiento se repitió en tres ocasiones diferentes, permitiendo el secado de la placa en cada ocasión. El estándar de T se identificó en la placa con luz ultravioleta a 254 nm, mientras que la DHT, se reveló con ácido fosfomolibdico (Merck) al 8% en metanol.

Determinación in vitro de la concentración de los nuevos esteroides que inhiben el 50% de la actividad de 5 α -reductasa (IC₅₀)

La inhibición de la actividad la 5 α -reductasa, presente en la fracción membranal obtenida a partir de homogeneizados de la próstata de cadáver humano (237 μ g de proteína), por los compuestos de nueva síntesis (tablas 6-9), se determinó incubando el tejido en presencia de T [H^3] 2nM, NADPH 2 mM y ditioneitol 1 mM, así como cantidades crecientes de los esteroides a probar, 1×10^{-4} - 1×10^{-7} M, (tablas 6-9). La incubación se realizó en las mismas condiciones que se mencionaron antes. También se hizo una incubación control en las mismas condiciones descritas, todo se realizó por duplicado.

El extracto se resuspendió en 5 μ L de metanol y se aplicó a placas cromatográficas de gel de sílice con indicador, en base de aluminio por el mismo método. Los resultados obtenidos se graficaron para obtener la concentración del compuesto que inhibe el 50% de la actividad de 5 α -reductasa (IC₅₀).

Determinación in vitro de la actividad relativa de unión (ARU) de los compuestos de nueva síntesis al receptor de andrógenos

Para determinar la concentración de receptores de andrógenos presentes en el citosol, se prepararon una serie de tubos con concentraciones crecientes de mibolerona [H^3] de 0.2 a 1.0 nM. En forma paralela se preparó otra serie de tubos que contenían las mismas concentraciones de Mb[H^3] más un exceso de 200 veces mibolerona radioinerte con la finalidad de obtener la unión no específica.

Los experimentos se realizaron por duplicado. El disolvente se evaporó a sequedad y se agregaron 200 μ L del citosol obtenido que contenían 5mg de proteína. Los tubos se incubaron a 4°C por 18 horas.

Después de la incubación se agregó sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración del 35% en cada tubo y se incubaron de nuevo por 60 minutos a 4°C. Posteriormente los tubos se centrifugaron durante 90 minutos a 3500 rpm y el precipitado obtenido se disolvió en 0.5 ml de solución amortiguadora TEMD. Más tarde a los tubos se les agregaron 0.5 mL de una mezcla de carbón /dextran al 1% y 0.1% en solución amortiguadora TEMD respectivamente y se incubaron por 10 minutos a 4°C. La mezcla se centrifugó nuevamente a 3500 rpm por 5 minutos y se tomaron alícuotas de 0.5 mL del sobrenadante que se agregaron a un vial que contenía 10 mL de líquido de centelleo y se contaron en un contador de centelleo líquido.

Análisis de competencia in vitro del receptor de andrógenos

Para determinar si los compuestos sintetizados compiten por el receptor de andrógenos se prepararon tubos conteniendo 2nM de Mb H³ más concentraciones crecientes de los esteroides a probar (1×10^{-10} - 4×10^{-7} M), se agregó el citosol (5mg de proteína) y se incubó por 18 horas a 4°C. Posteriormente se siguió el mismo procedimiento que se indicó antes para la determinación de concentración de receptores.

La actividad relativa de unión (ARU) se calculó a partir de la siguiente

fórmula. (Cabeza, 2004)
$$ARU = \frac{IC_{50} \text{ de MbH}^3}{IC_{50} \text{ del inhibidor}} \times 100$$
 IC_{50} = concentración del esteroide que inhibe el 50% de unión al receptor

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 4 individuos de la siguiente forma: Tres grupos control, a los que se les administraron inyecciones diarias por vía subcutánea durante 6 días de: Vehículo (aceite de sésamo) al

primer grupo, 200 µg de T al segundo grupo y 200 µg de T + 200 µg de finasterida (F) al tercer grupo. A los grupos experimentales se les administraron 200 µg de T + 400 µL del compuesto de nueva síntesis (tablas 6-9).

Transcurridos los 6 días de tratamiento, los animales se pesaron y se sacrificaron con CO₂, siguiendo el protocolo aprobado por el CICUAL-UAM-X y conforme a la NOM-ZOO-062-1999. Los animales se rasuraron en la parte dorsal para dejar al descubierto los órganos del flanco, los cuales se midieron con regla. La próstata y las vesículas seminales de los mismos hámsters se aislaron y se pesaron.

Los resultados se sometieron a análisis estadístico, utilizando la prueba de ANOVA y comparando los promedios por la prueba de Tukey HDS. Para procesar los datos se utilizó el programa JMP IN versión 5.1.

Determinación del Log P

El cálculo del parámetro del logaritmo de P se obtuvo con el soporte del Programa ACD/LABS versión 9. Este valor se calculó con base en la estructura molecular de los esteroides de nueva síntesis (Tabla 10) y describe la relación entre la lipofilidad del fármaco representado por el log P y la concentración mínima del fármaco (log 1/C) necesaria para producir la actividad biológica. Un valor alto de log P, indica una alta solubilidad del compuesto en las lipoproteínas de la membrana celular con el correspondiente incremento de la actividad biológica. Esta relación es válida hasta valores máximos de log P de 5.

RESULTADOS

Experimentos in vivo

Prueba del órgano del flanco

Después de la castración, el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco de hámsters machos disminuyó en comparación con la de los machos intactos ($p < 0.005$). El tratamiento con el vehículo solo, no cambió esta condición mientras que el tratamiento con la inyección de 1mg/kg de T por 6 días, aumentó significativamente ($p < 0.005$) el diámetro de la mancha pigmentada. Cuando la T y finasterida fueron administradas simultáneamente el diámetro de la mancha pigmentada disminuyó y lo mismo ocurrió cuando se les administró T más los compuestos: **A 20-23**, **CJ1-2** (Tabla 3), **V 27-30** (Tabla 4) **T 32-35** (Tabla 5)

Peso de la próstata

Después de la castración, el peso de la próstata de los hámsters disminuyó de manera significativa ($p < 0.005$) comparada con los animales intactos, el grupo de los animales castrados a los que se les administró únicamente vehículo no cambió esta condición, mientras que para el grupo de animales a los que se les administró T a dosis de 1mg/kg durante 6 días, el tamaño de la próstata aumentó de manera significativa. Cuando T y finasterida fueron administrados de manera concomitante el peso de la próstata de los animales tratados disminuyó y lo mismo ocurrió con los animales a los que se les administró T más los compuestos **A 20-23**, **CJ1-2** (Tabla 3), **V 27-30** (Tabla 4) **T 32-35** (Tabla 5)

Peso de las vesículas seminales

Después de la castración, el peso de las vesículas seminales disminuyó de manera significativa ($p < 0.005$) comparada con los animales intactos, el grupo de

los animales castrados a los que se les administró vehículo no cambió esta condición, mientras que para el grupo de animales a los que se les administró T a dosis de 1mg/kg durante 6 días, el tamaño de las vesículas seminales aumentó de manera significativa. Cuando T y finasterida fueron administrados de manera concomitante el peso de las vesículas seminales de los animales tratados disminuyó y lo mismo ocurrió con los animales a los que se les administró T más los compuestos: **A 20-23**, **CJ1-2** (Tabla 3), **V 27-30** (Tabla 4) **T 32-35** (Tabla 5).

Tabla 3. Diámetro de la mancha pigmentada, pesos de las próstatas y de las vesículas seminales

TRATAMIENTO	Diámetro del órgano del flanco (mm)	Peso de la próstata (mg)	Peso de vesículas seminales (mg)
Control	2.9 ± 0.92	46.3 ± 8.7	119.8 ± 20
T	4.6 ± 0.85	106.3 ± 14	298.88 ± 29
T + F	3 ± 1.6 *	65.8 ± 15 *	230.7 ± 55 *
T + A-20	3.5 ± 1.1 *	74.8 ± 8.5 *	221.5 ± 25 *
T + A-21	3.1 ± 0.59	63.6 ± 16 *	259.6 ± 56
T + A-22	2.8 ± 1.2 *	60.2 ± 7.6 *	160 ± 26 *
T + A-23	3.3 ± 1.3 *	56.27 ± 18 *	156.1 ± 21.4 *
T+ CJ-1	2.8±0.8*	78.50±15.3	215±20
T+ CJ-2	2.8 ± 1.1 *	79.6 ± 6.3	228 ± 28.5

± desviación estándar obtenidas de los hamsters castrados bajo diferentes esquemas de tratamiento.

* valor de $p < 0.005$.

Tabla 4. Diámetro de la mancha pigmentada, pesos de las próstatas y de las vesículas seminales

TRATAMIENTO	Diámetro del órgano del flanco	Peso de la próstata (mg)	Peso de vesículas seminales (mg)
Control	1.75 ± 0.89	41.5 ± 17.6	153.97 ± 24
T	4.0 ± 0.92	100.6 ± 19	246.1 ± 29
T + F	2.0 ± 0.89	73 ± 8.2 *	209.6 ± 17*
T + V-27	2.9 ± 1.4	75.2 ± 19.6 *	213.13 ± 50
T + V-28	2.5 ± 1.3	75.9 ± 21 *	247.1 ± 58.7
T + V-29	2.9 ± 1.6	85.4 ± 7.2	204.1 ± 31
T + V-30	1.9 ± 0.83	71.4 ± 19.2*	214.5 ± 57
T + V-31	3.1±1.6	82.6± 16.7	205.2 ± 35

± desviación estándar obtenidas de los hamsters castrados bajo diferentes esquemas de tratamiento.

* valor de $p < 0.005$.

Tabla 5. Diámetro de la mancha pigmentada, pesos de las próstatas y de las vesículas seminales

TRATAMIENTO	Diámetro del órgano del flanco	Peso de la próstata (mg)	Peso de vesículas seminales (mg)
Control	3.4 ± 0.9	59.9 ± 7.6	105.2 ± 12
T	4.6 ± 5	71.3 ± 13.3	196.9 ± 30
T + F	3.3 ± 0.7 *	39.9 ± 9 *	132.5 ± 17 *
T + T-32	3.4 ± 0.5 *	60 ± 1.5	162.6 ± 28
T + T-33	3 ± 1.7 *	60.5 ± 7.6 *	173.4 ± 61.6
T + T-34	2.9 ± 1.5 *	55.96 ± 4 *	159.9 ± 13
T + T-35	3.25 ± 2 *	66.4 ± 11.5	195.5 ± 25.3

± desviación estándar obtenidas de los hamsters castrados bajo diferentes esquemas de tratamiento.

* valor de $p < 0.005$.

Experimentos in vitro

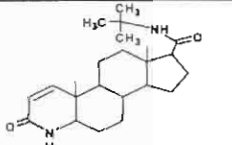
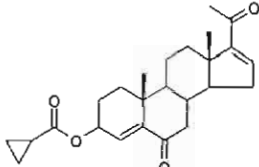
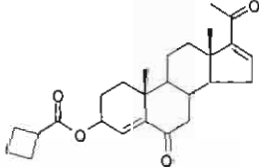
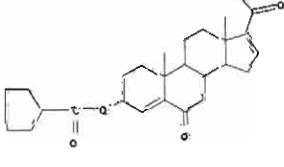
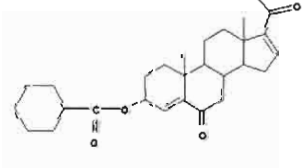
Actividad de 5 α -reductasa

Los extractos de diclorometano sometidos a análisis cromatográfico (TLC) mostraron dos zonas radiactivas con una conducta idéntica a los estándares de T y DHT, utilizados como referencia. El valor del factor de retención (Rf) para T fue de 0.56 y correspondió al 70% de la radiactividad en la placa, mientras que el Rf para DHT fue de 0.67 y correspondió al 27% de la radiactividad total en la placa. Este resultado se consideró como el 100% de la actividad de 5 α -reductasa. De los extractos obtenidos de las incubaciones utilizadas como control, se obtuvo un pico radiactivo a un Rf de 0.56 (correspondiente al estándar de T). La radiactividad correspondiente al estándar de DHT en este mismo cromatograma (Rf 0.67) correspondió al 1% del total de la radiactividad en la placa y fue considerado un error del método, por lo cual se descontó de todos los cromatogramas.

Concentración de los nuevos esteroides que inhiben el 50% de la actividad de 5 α -reductasa

Las concentraciones de los nuevos esteroides que inhiben el 50% de la actividad de la 5 α -reductasa (IC₅₀) se determinaron a partir de las gráficas de inhibición de la actividad de la enzima producida por los diferentes compuestos. Los valores de IC₅₀ obtenidos para cada uno de ellos se muestran en la tablas 6-9. Los compuestos que mostraron actividad de inhibición de la 5 α -reductasa fueron: **A-20 y 22, CJ1 y 2, V27-29, V-31, T-32 y 33** (Tablas 6-9).

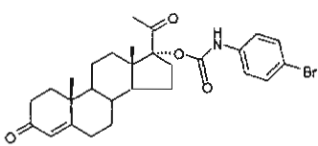
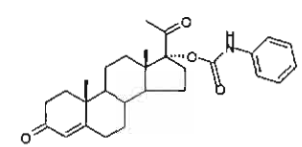
Tabla 6. Actividad de la finasterida y de los compuestos de nueva síntesis de la serie A, como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa presente en homogenados de próstata de cadáver humano.

<i>Estructura</i>	<i>IC₅₀ [M]</i>
 <i>Finasterida</i>	8.5×10^{-9}
 A-20	2.5×10^{-6}
 A-21	NA
 A-22	3.1×10^{-8}
 A-23	NA

Los valores de IC₅₀ indican la concentración de los esteroides de nueva síntesis necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la 5 α -reductasa.

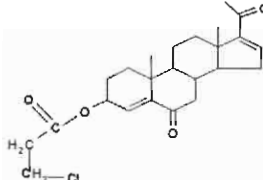
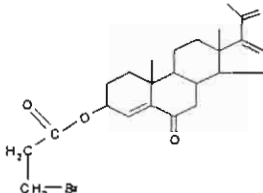
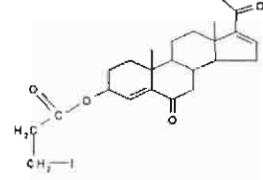
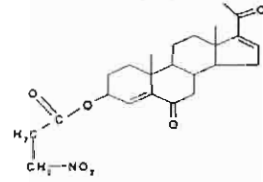
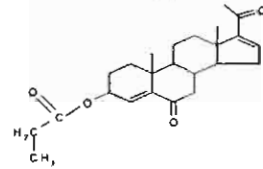
*NA: sin actividad.

Tabla 7. Actividad de los compuestos de nueva síntesis de la serie **CJ**, como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa presente en homogenados de próstata de cadáver humano.

Estructura	IC ₅₀ [M]
 CJ-1	5X10 ⁻⁸
 CJ-2	1X10 ⁻⁸

Los valores de IC₅₀ indican la concentración de los esteroides de nueva síntesis necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la 5 α -reductasa.

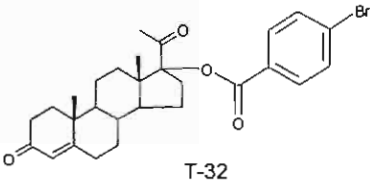
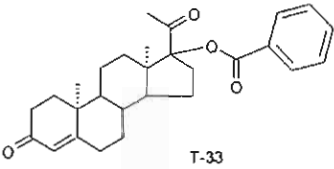
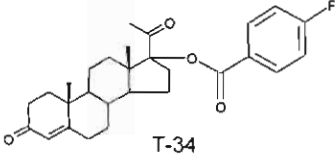
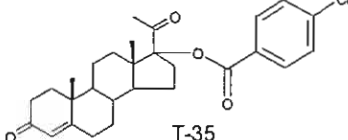
Tabla 8. Actividad de los compuestos de nueva síntesis de la serie **V** como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa presente en homogenados de próstata de cadáver humano.

Estructura	IC ₅₀ [M]
 V-27	1.4X10 ⁻⁷
 V-28	1.75X10 ⁻⁸
 V-29	1X10 ⁻⁷
 V-30	NA
 V-31	4X10 ⁻⁵

Los valores de IC₅₀ indican la concentración de los esteroides de nueva síntesis necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la 5 α -reductasa.

*NA: sin actividad.

Tabla 9. Actividad de los compuestos de nueva síntesis de la serie T, como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa presente en homogenados de próstata de cadáver humano.

Estructura	IC_{50} [M]
 T-32	3.6X10 ⁻⁷
 T-33	3.7X10 ⁻⁷
 T-34	NA
 T-35	NA

Los valores de IC_{50} indican la concentración de los esteroides de nueva síntesis necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la 5 α -reductasa.

*NA: sin actividad.

Curva de saturación del receptor de andrógenos presentes en el citosol de próstata de ratas

Los resultados de la unión máxima (Bmax) y la constante de disociación (Kd) del receptor de andrógenos, obtenido a partir del citosol de próstatas de rata, se muestran en la Figura 6. Se determinó una Kd de 5.5×10^{-10} M y una Bmax de 75 fm/g de proteína.

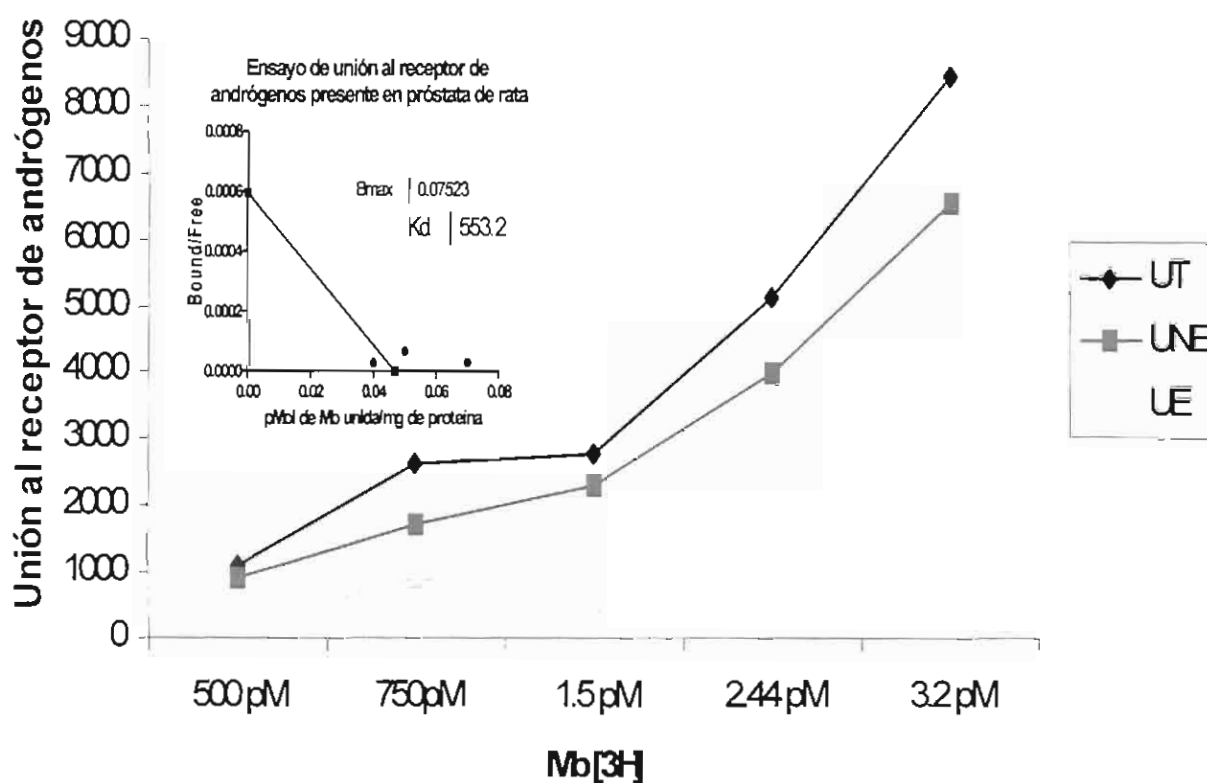


Figura 6. Ensayo de unión de receptores de andrógenos presentes en próstata de rata.

Unión total (UT), específica (UE) y no específica (UNE) de MB[H³] al receptor de andrógenos presente en el citosol obtenido a partir de próstatas de ratas. Los datos también se expresan en la forma de Gráfico de Scatchard.

Afinidad relativa de unión de los compuestos de nueva síntesis por los receptores de andrógenos

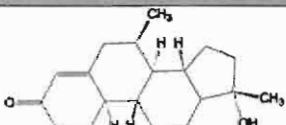
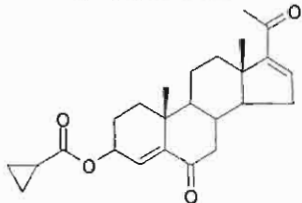
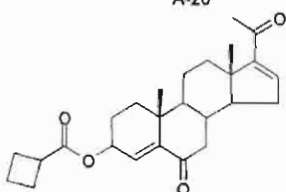
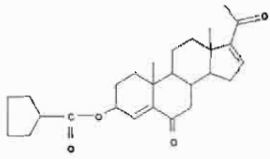
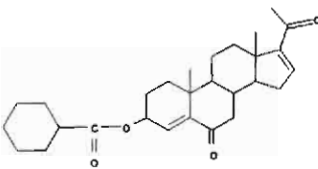
La determinación de la afinidad relativa de unión (ARU) de la mibolerona y de los esteroides de la serie **A** al receptor de andrógenos, se determinó a partir del valor de IC_{50} , obtenido de los gráficos de los análisis por competencia del receptor de los nuevos compuestos sintetizados, los valores se muestran en la tabla 10.

Los compuestos de las series: **CJ**, **V** y **T**, no desplazaron a la mibolerona [H^3] a ninguna de las concentraciones probadas (2×10^{-9} - $2 \times 10^{-6}M$) por lo que no se unen al receptor de andrógenos.

Valores de Log P

Los valores de Log P determinados como se muestran en la Tabla 10. Los valores de ARU, tienen una clara correlación con los valores de log P, así por ejemplo, el compuesto **A-20** con un valor de Log P de 2.92 (baja lipofilicidad) muestra un valor bajo de ARU así como una actividad farmacológica también baja (Tablas 3 y 10); mientras que **A-23** que presenta un valor de log P de 4.17 (alta lipofilicidad), está asociado con un valor de ARU alto y una mayor actividad antiandrogénica.

Tabla 10. Afinidad relativa de unión al receptor de andrógenos.

ESTRUCTURA	IC₅₀ [nM]	ARU %	Log P de los esteroides
 Mibolerona	1	100	3.09
 A-20	35	2.85	2.92
 A-21	1.6	61.5	3.33
 A-22	0.54	>100	3.75
 A-23	0.60	>100	4.17

Afinidad relativa de unión (ARU) de la mibolerona y de los esteroides de nueva síntesis de la serie A, al receptor de andrógenos presente en el citosol de las próstatas de ratas castradas. El valor del IC₅₀ indica la concentración necesaria de los esteroides de nueva síntesis para bloquear el 50% de la unión de la mibolerona (MB) con el receptor de andrógenos.

$$ARU = \frac{IC_{50} \text{ Mb} [H^3]}{IC_{50} \text{ de los nuevos compuestos}}$$

DISCUSIÓN

En este estudio se demostró la presencia de receptores de andrógenos en el citosol de la próstata de ratas castradas. Los resultados indican que el valor de la unión máxima y la constante de disociación son de 75 fm/g de proteína y de 5.5×10^{-10} M respectivamente datos que coinciden con los informados por Abdulmage y colaboradores en 1986.

Por otro lado, se comprobó la presencia de la enzima 5α -reductasa en la fracción membranal de la próstata humana, como ya ha sido informado previamente por Hirosumi y colaboradores en 1995.

Los esteroides **A-20** y **A-22** inhibieron la actividad de la 5α -reductasa muy débilmente (demostrado por sus valores de IC_{50}) mientras que los compuestos **A-21** y **23**, no tuvieron efecto sobre la enzima.

Los 4 compuestos de la serie **A** se unieron al receptor de andrógenos presente en citosol de la próstata de rata, ya que desplazaron a la mibolerona marcada radiactivamente.

Estos resultados indicaron que existe una correlación muy alta entre el carácter lipofílico de los esteroides de la serie **A**, medido por su valor de log P y su actividad biológica. Esta correlación se basa en el concepto desarrollado por Fujita y colaboradores en 1964, el cual asume que existe una relación entre la energía libre de un compuesto, su lipofilicidad y su actividad biológica; así por ejemplo, el esteroide **A-20** con un valor de Log P de 2.92 mostró un porcentaje de unión al receptor muy bajo (2.85), mientras que cuando el valor de Log P de los esteroides de nueva síntesis aumentó, la unión al receptor de andrógenos se incrementó. El compuesto **A-23** con un Log P de 4.17 mostró una ARU > 100%.

La relación entre el Log P y la ARU se puede explicar considerando la existencia de un espacio hidrofóbico de unión al ligante dentro de la molécula receptora, al cual es muy difícil penetrar (Gobinet, 2002). Se ha demostrado que el contenido hidrofóbico de este espacio tiene una clara complementación con las propiedades no polares de los ligantes, mientras que muy pocos de los residuos hidrofílicos se unen selectivamente a éste (Gobinet, 2002).

Los resultados *in vivo* muestran claramente que los esteroides **A20-A23** son antagonistas del receptor de andrógenos presente en los tejidos utilizados como modelos biológicos, ya que disminuyen el diámetro del órgano del flanco, el peso de la próstata y el de las vesículas seminales, por lo que estos compuestos podrían ser de gran utilidad en el tratamiento de enfermedades andrógeno dependientes como la hiperplasia prostática benigna, el acné y el cáncer de la próstata.

Los compuestos de la serie **CJ (1 y 2)**, son derivados de la familia de los 17α -carbamatos. El esteroide **CJ-1** tiene un átomo de bromo en su molécula, mientras que el compuesto **CJ-2** no contiene un grupo halógeno. Aparentemente la presencia del bromo en **CJ-1** disminuye su actividad inhibitoria sobre la enzima 5α -reductasa en comparación con el compuesto **CJ-2**. Sin embargo, la actividad *in vivo* de ambos esteroides fue similar, los dos mostraron una tendencia a disminuir los pesos de la próstata aunque este parámetro no fue estadísticamente significativo. Esta actividad se debe exclusivamente a la capacidad de estos compuestos de inhibir a la 5α -reductasa pues se demostró que no se unen a los receptores de andrógenos presentes en el citosol de la próstata de las ratas.

Por otra parte, el crecimiento de la mancha pigmentada del órgano del flanco del hámster depende de la DHT y por lo tanto de la conversión de T en DHT, proceso que es mediado por la 5α -reductasa presente en este tejido (Takayasu y Adachi, 1970); este hecho explica la disminución de la mancha pigmentada en los hamsters tratados con **CJ1**, **CJ2** y finasterida puesto que

dichos compuestos inhibieron la actividad de la 5 α -reductasa presente en este tejido.

Es bien sabido el hecho de que los carbamatos tienen una vida media larga y que son hidrolizados lentamente por el hígado (Lednicer, 1998). Estas propiedades pueden incrementar su actividad farmacológica en comparación con los ésteres convencionales, por lo que estos compuestos son de gran interés en el campo de la farmacia. Los inhibidores de la 5 α -reductasa presentan menores efectos colaterales que los compuestos que se unen al receptor, ya que permiten la unión de la T no transformada en DHT al receptor y aunque la unión es más débil, hay ligera actividad androgénica.

Los compuestos de la serie **V (27-31)**, con excepción del compuesto **V-30**, mostraron actividad como inhibidores de la enzima 5 α - reductasa en los experimentos realizados, pero no se unieron a los receptores de andrógenos presentes en el citosol obtenido a partir de próstata de rata. Sin embargo, los experimentos *in vivo* mostraron que los compuestos de la serie **V** disminuyeron de modo significativo el peso de las glándulas de los animales castrados y tratados con T.

Por otra parte el compuesto **V-30** disminuyó significativamente el diámetro del órgano del flanco, lo cual podría estar correlacionado con el hecho de que este órgano responde a la DHT y posee receptores de andrógenos (Adachi, 1974). Sin embargo este compuesto no tuvo actividad como inhibidor de la 5 α - reductasa y tampoco se unió al receptor de andrógenos *in vitro*, por lo que la actividad antiandrogénica *in vivo* observada, podría explicarse con base en que el compuesto podría metabolizarse rápidamente y producir un metabolito activo que disminuiría el peso de la próstata y el diámetro de la mancha pigmentada.

Los compuestos de la serie **T-32-33**, mostraron actividad como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa presente en homogenizados de próstata de cadáver

humano a pH 6; sin embargo no se unieron a los receptores de andrógenos. Su actividad antiandrogénica quedó demostrada en los experimentos *in vivo* al verse disminuido el diámetro del órgano del flanco en los animales tratados con T y los diferentes compuestos de la serie T, además de que los compuestos mencionados también mostraron actividad antiandrogénica en la próstata de los animales tratados, ya que disminuyeron el peso de la próstata.

Por otra parte es notable el hecho de que los compuestos **T-34** y **T-35** que careciendo de actividad de inhibición de 5α -reductasa y actividad de unión al receptor, sí mostraron una clara actividad en los estudios *in vivo*, esta actividad quizás pueda explicarse por un metabolismo rápido de los compuestos con la subsecuente formación de un metabolito con actividad antiandrogénica.

CONCLUSIONES

En este estudio se demostró la actividad antiandrogénica de 15 esteroides de nueva síntesis, ordenados en diferentes series de acuerdo a la naturaleza de su estructura.

Los esteroides **A-20** y **A-22** inhibieron muy débilmente la actividad de la 5α -reductasa, presente en la próstata de cadáveres, mientras que los compuestos **A-21** y **A-23**, no tuvieron efecto sobre la enzima. Los 4 compuestos de la serie **A** se unieron al receptor de andrógenos presente en el citosol de la próstata de rata y disminuyeron el diámetro del órgano del flanco, el peso de la próstata y el de las vesículas seminales, por lo que estos compuestos podrían ser de gran utilidad en el tratamiento de enfermedades andrógeno dependientes como la hiperplasia prostática benigna, el acné y el cáncer de la próstata.

Los carbamatos de la serie **CJ** (**1** y **2**), inhibieron *in vitro* la actividad de la enzima 5α -reductasa e *in vivo*, disminuyeron los pesos de la próstata así como el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco de los hamsters castrados y tratados con T. Esta actividad se debe exclusivamente a la capacidad de estos compuestos de inhibir a la 5α -reductasa, ya que se demostró que no se unen a los receptores de andrógenos presentes en el citosol de la próstata de las ratas.

Los compuestos de la serie **V** (**27-31**), con excepción del compuesto **V-30**, mostraron actividad como inhibidores de la enzima 5α -reductasa en los experimentos realizados; pero no se unieron a los receptores de andrógenos presentes en el citosol obtenido a partir de próstata de rata. Sin embargo, los experimentos *in vivo* mostraron que los compuestos de la serie **V** disminuyeron el peso de las próstatas de los animales castrados y tratados con T. Estos datos indican que el efecto *in vivo* observado se debe a la acción de los compuestos estudiados sobre la 5α -reductasa.

Los compuestos de la serie **T 32-33**, mostraron actividad como inhibidores de la enzima 5α -reductasa presente en homogenizados de próstata de cadáver humano a pH 6. Sin embargo no se unieron a los receptores de andrógenos. Estos compuestos disminuyeron el diámetro del órgano del flanco y el peso de la próstata de los animales castrados y tratados con T y los diferentes compuestos de la serie T, por lo que podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades andrógeno dependientes.

Los compuestos A-20, A-22, CJ-1, CJ-2, V-27, V-28, V-29, V-31, T-32 y T-33 inhibieron la actividad de la 5α -reductasa. Por otra parte los esteroides A-20, A-21, A-22 y A-23 se unieron al receptor de andrógenos habiéndose demostrado que existe una clara correlación entre la afinidad relativa de unión de los compuestos y su valor de Log P.

A-20, A-22, A-23, CJ-2, T-32, T-33, T-34 Y T-35 tuvieron efecto antiandrogénico sobre el diámetro de la mancha pigmentada de los hámsters macho tratados, A-20, A-21, A-22, A-23, V-27, V-28, V-30, T-33 y T-34 disminuyeron el peso de la próstata de los animales tratados y A-20, A-22 y A-23 disminuyeron el peso de las vesículas seminales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulmaged, M., Müller, E. y Wotiz, H. 1986. Binding of 7 α -dimetil-19-nortestosterone (mibolerone) to androgen and progesterone receptors in animal tissues. *Journal of Endocrinology* **118**: 1327-1333.
- Adachi, K. 1974. Receptor proteins for androgens in hamster sebaceous glands. *J. Invest. Dermatol.* **62**: 217-223.
- Ahmad, N. y Warren, D. 1983. Testosterone metabolism by testicular tissue. *Journal of Andrology* **4**: 83-87.
- Amory, J. y Bremner, W. 2003. Regulation of testicular function in men: implications for male hormonal contraceptive development. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **85**: 357–361.
- Biffignandi, P., Mollinatti, G. 1987. Antiandrogens and hirsutism. *Hormone Res.* **28**: 242-249.
- Bradford, M. 1986 A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brandt, M. y Levy, A. 1989. 3 β -hydroxy-delta 5-steroid dehydrogenase-3-keto-delta 5-steroid isomerase from bovine adrenals: mechanism of inhibition by 3-oxo-4-aza steroids and kinetic mechanism of the dehydrogenase. *Biochemistry* **28**: 140-148.
- Bratoeff, E., Cabeza, M., Ramírez, E., Heuze, I., Flores, E. 2005. Recent advances in the chemistry and pharmacological activity of new steroidal antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* **12**: 927-943.

- Bratoeff, E., Ramirez, E., Flores, E., Sánchez, M., Heuze, Y. y Cabeza, M. 2004. New aromatic esters of progesterone as antiandrogens. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **19**: 99–105.
- Cabeza, M. y Miranda, R. 1997. Stimulatory effect of progesterone and 5 α -progesterone on lipid synthesis in hamster flank organs. *Steroids* **62**: 782-788.
- Cabeza, M., Bratoeff, E., Heuze, Y., Rojas, A., Terán, N., Ochoa, M., Ramírez, M., Ramírez, E., Pérez, V. y García, I. 2006. New progesterone derivatives as inhibitors of 5 α -reductase enzyme and prostate cancer cell growth. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **21**: 371-378.
- Cabeza, M., Bratoeff, E., Ramírez, E. y Flores, E. 2004. Mecanismo de acción de antiandrógenos esteroidales. Serie académicos. UAM.
- Cabeza, M., Heuze, Y., Sanchez, M., Bratoeff, E., Ramirez, E., Rojas, A., Orozco, A., Mungia, A., Agustin, G., Cuatepotzo, L., Gonzalez, C., Palma, S., Padilla, D., Perez, V. y Jimenez, G. 2005. Relative binding affinity of novel steroids to androgen receptors in hamster prostate. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **20**: 357-364.
- Chen, F., Knecht, K., Leu, C., Rutledge, S., Scafonas, A., Gambone, C., Vogel, R., Zhang, H., Kasparcova, V., Bai, C., Harada, S., Schmidt, A., Reszka, A., Freeman, L. 2004. Partial agonist/antagonist properties of androstenedione and 4-androsten-3 β ,17 β -diol. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **91**: 247–257.
- Comité interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio. 2006. Manual de organización de procedimientos. UAM-X. México, D.F.

Dotzlaw, H., Papaioannou, M., Moehren, U., Claessens, F., Baniahmad, A. 2003. Agonist-antagonist induced coactivator and corepressor interplay on the human androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol.* **213**: 79-85.

Fix, C., Jordan, C., Cano, P., Walker, W. 2004. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *PNAS.* **101**: 10919-10924.

Flores, E., Bratoeff, E., Cabeza, M., Ramírez, E., Quiroz, A., Heuze, I. 2003. Steroid 5 α -reductase inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **3**: 225-237.

Fujita, T., Iwassa, J., Hansch, C. 1964. Substituent constant, Π , derived from partition coefficients. *Journal Am. Chem. Soc.* **86**: 5175-5179

Ganong, F. 2002. "Fisiología médica". Decimo octava edición, editorial El Manual Moderno. México, D. F.

Georget, V., Térouanne, B., Nicolas, J., Sultan, C. 2002. Mechanism of Antiandrogen Action: Key Role of Hsp90 in Conformational Change and Transcriptional Activity of the Androgen Receptor. *Biochemistry* **41**: 11824-11831.

Gobinet, J., Poujol, N., Sultan, Ch. 2002. Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol.* **198**: 15-24.

Gustafsson, J. y Pousette, A. 1974. Different mechanism of regulation on reduced Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent 3-oxo Steroid 5 α -reductase activity in rat liver, kidney and prostate. *Biochem. J.* **142**: 273-277.

Guyton, A. y Hall, J. 1997. "Tratado de fisiología médica". Novena edición, editorial Interamericana, McGraw-Hill. México, D.F.

Hajszan, T., MacLusky, N. y Leranth, C. 2008. Role of androgens and the androgen receptor in remodeling of spine synapses in limbic brain areas. *Hormones and Behavior* **53**: 638-646.

Hardman, G., Limbird, L. 1996. "Goodman y Gilman", Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Vol. II. Novena edición, editorial McGraw-Hill interamericana, México. D.F.

Heinlein, C. y Chang, C. 2002. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrine Reviews* **23**: 175-200.

Heuze, Y. 2007. "Biología básica y manejo del hámster. Memorias de Actualización del Manejo y Reproducción de los Animales de Laboratorio". SSA. México.

Hirosumi, J., Nakayama, O., Fagan, T., Sawada, K., Chida, N., Inami, M., Takahashi, S., Kojo, H., Notsu, Y., Okuhara, M. 1995. FK143, A novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5 α -reductase: (1) *in vitro* effects on human and animal prostatic enzymes. *Steroid Biochem. Molec. Biol.* **52**: 357-363.

Hofbauer, L. y Khosla, S. 1999. Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. *European Journal of Endocrinology* **140**: 271–286.

Hsia, S. L. y Voigt, W. 1974. Inhibition of dihydrotestosterone formation: an effective means of blocking androgen action in hamster sebaceous gland. *J Invest Dermatol.* **62**: 224-227.

<http://www.urmc.rochester.edu/changarlab/images/ARmechanism.JPG>

Ishizuka, M., Kawate, H., Takatanagi, R., Ohshima, H., Tao, R., Hagiwara, H. 2005. A zinc finger protein TZF is a novel corepressor of androgen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**: 1025–1031.

Field, K. y Sibold, A. 2000. "The laboratory hamster and gerbil". Editorial CRC. USA.

Jänne, O., Bardin, C. 1984. Androgen and antiandrogen receptor binding. *Ann. Rev. Physiol.* **46**: 107-118.

Lednicher, D. 1998. "Strategies for organic drug synthesis and design". Editorial John Wiley. New York, USA.

Lee, J. y Chang, C. 2003. Recent advances in androgen receptor action. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 1613-1622.

Levedhal B. and Samuels L. Metabolism of testosterone and 17-methyl-testosterone by liver tissue. *Journal of Biological Chemistry*, March (1950) 857-861.

Levy, M., Perera, S., Van, Londen, G., Nelson, J., Clay, C., Greenspan, S. 2008. Physical Function Changes in Prostate Cancer Patients on Androgen Deprivation Therapy: A 2-Year Prospective Study. *Urology* **71**: 735-739.

Liao, S., Lin, J., Dang, M., Zhang, H., Kao, Y., Fukuchi, J., Hiipakka, R. 2001. Growth suppression of hamster flank organs by topical applications of catechins, alizarin, curcumin and myrostoleic acid. *Arch. Dermatol. Res.* **293**: 200-205.

Luu-The, V., Pelletier, G., Labrie, F. 2005. Quantitative appreciation of steroidogenic gene expression in mouse tissues: new roles for type 2 5 α -

reductase, 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase and estrogen sulfotransferase. Steroid Biochem. Mol. Biol. **93**: 269-276.

Machetti, F. y Guarna, A. 2002. Novel inhibitors of 5 α -reductase, Exp. Opin. Ther. Pats. **12**: 201-215.

NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Otzlaw, H., Papaioannou, M., Moehren, U., Claessens, F., Baniahmad, A. 2003. Agonist-antagonist induced coactivator and corepressor interplay on the human androgen receptor. Molecular and Cellular Endocrinology **213**: 79-85.

Prescott, L. y Tindall, J. 1998. Clathrin Gene expression Is androgen regulated in the prostate. Endocrinology **139**: 2111-2119.

Quesenberry, K. y Carpenter, J. 2004. "Ferrets, rabbits, and rodents clinical medicine and surgery". Segunda edición, editorial Saunders. USA.

Raynaud, J., Cousse, H., Martin, P. 2002. Inhibition of type 1 and type 2 5 α -reductase activity by free fatty acids, active ingredients of Permixon®. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology **82**: 233-239.

Robel, P., Eychenne, B., Blondeau, J., Jung-Testas, I., Groyer, M. Bodard, C., Hechter, O., Roux, C. 1983. Androgen receptors in rat and human prostate. Hormone Res. **18**: 28-36.

Rusell, W. y Wilson, D. 1994. Steroid 5 α - reductase: two genes / two enzymes. Annu. Rev. Biochem. **63**: 25-61.

Shaffer, L., Jivan, D., Dollins, E., Claessens, F., Gewirth, T. 2004. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *PNAS* **101**: 4758-4763.

Steinsapir, J., Bryhan, M., Muldon, G. 1998. Relative binding properties of microsomal and cytosolic androgen receptor species of the ventral prostate. *Endocrinology* **125**: 2297-2311.

Steinsapir, J., Mora, G., Muldon, T. 1991. Effects of steroidal and non-steroidal antiandrogens on the androgen binding properties of the rat ventral prostate androgen receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* **109**: 103-112.

Stuart, D., Lee, W., Simpson, D., Kadwell, S., Overto, K. 2001. Pharmacokinetic parameters and mechanisms of inhibition of rat type 1 and 2 steroid 5 α - reductase: determinants for different in vivo activities of G198745 and finasteride in the rat. *Biochemical Pharmacology* **62**: 933-942.

Summerfield, A., Diaz, P., Dolenga, M., Smith, E. 1995. Tissue-specific pharmacology of testosterone and 5 α - dihydrotestosterone analogues: Characterization of a non canine liver androgen-binding protein. *Molecular Pharmacology* **47**: 1080-1088.

Liang, T., Heiss, E., Cheung, H., Reynolds, F., Rasmusson, H. 1984. 4-Azasteroidal 5 α -reductase inhibitors without affinity for the androgen receptor. *J. Biol. Chem.* **259**: 734-739.

Takayasu, S. y Adachi, K. 1970. Hormonal control of metabolism in hamster costovertebral glands. *J. Invest. Dermatol.* **55**: 13-19.

Thigpen, A., Davis, L., Milatovich, A., Memdonca, B., Mc Ginley, J. 1992. Molecular genetics of steroid 5 α - reductase 2 deficiency. The American Society for Clinical Investigation **90**: 799-809.

Wang, X. y Stocco, D. 2005. The decline in testosterone biosynthesis during male aging: A consequence of multiple alterations. Molecular and Cellular Endocrinology **238**: 1–7.

William, B. y Toft, P. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. Endocrine Reviews **18**: 306-360.

Wilson, D., James, E., Russell, W. 1993. Steroid 5 α - reductase 2 deficiency. Endocrine Reviews **14**: 577-593.

Wilson, E. y Frank, F. 1976. Binding properties of androgen receptors. Journal of Biol. Chem. **225**: 5620-5629.

Yong, W., Yang, Z., Periyazamy, S., Chen, H., Yucel, S., Li, W., Lin, L., Wolf, I., Cohn, M. 2007. Essential role for co-chaperone FKBP52 but not FKBP51 in androgen receptor-mediated signaling physiology. Journal of Biol. Chem. **282**: 5026-5036.

Zhu, Z., Becklin, R., Desiderio, D., Dalton, J. 2001. Mass spectrometric characterization of the human androgen receptor ligand-binding domain expressed in *Escherichia coli*. Biochemistry **40**: 10756-10763.

ANEXOS

Anexo 1. Registro de las condiciones ambientales para los animales utilizados.

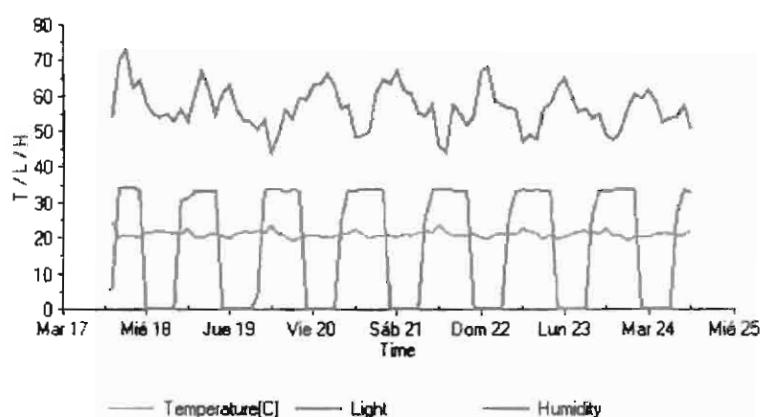
Data Logger - Points Report

Report Generation: 23/06/2008 At 12:32 p.m.

Logging Interval: 2 hr.

Start Date: 17/07/2007 01:56 p.m.

End Date: 24/07/2007 11:56 a.m.



Data Point	Time	Temperature [C]	Light []	Humidity [%]
1	17/07/2007 01:56 p.m.	24.72	4.97	53.91
2	17/07/2007 03:56 p.m.	20.53	34.11	69.94
3	17/07/2007 05:56 p.m.	20.65	34.32	72.82
4	17/07/2007 07:56 p.m.	20.61	34.26	62.34
5	17/07/2007 09:56 p.m.	20.49	33.53	64.26
6	17/07/2007 11:56 p.m.	21.59	0.05	57.92
7	18/07/2007 01:56 a.m.	21.92	0.05	54.83
8	18/07/2007 03:56 a.m.	22.22	0.05	53.91
9	18/07/2007 05:56 a.m.	21.66	0.05	54.96
10	18/07/2007 07:56 a.m.	21.83	0.05	53.03
11	18/07/2007 09:56 a.m.	21.42	30.60	56.24
12	18/07/2007 11:56 a.m.	22.77	31.37	53.15
13	18/07/2007 01:56 p.m.	20.48	33.22	59.77
14	18/07/2007 03:56 p.m.	20.13	33.39	66.72
15	18/07/2007 05:56 p.m.	21.13	33.34	62.18
16	18/07/2007 07:56 p.m.	21.29	33.41	54.83
17	18/07/2007 09:56 p.m.	20.65	0.05	60.45
18	18/07/2007 11:56 p.m.	19.96	0.05	63.10
19	19/07/2007 01:56 a.m.	21.36	0.05	56.52
20	19/07/2007 03:56 a.m.	22.04	0.05	53.03
21	19/07/2007 05:56 a.m.	21.77	0.05	52.79
22	19/07/2007 07:56 a.m.	22.11	3.80	50.42
23	19/07/2007 09:56 a.m.	21.69	33.53	53.15
24	19/07/2007 11:56 a.m.	23.57	33.82	44.08
25	19/07/2007 01:56 p.m.	21.48	33.76	49.02
26	19/07/2007 03:56 p.m.	20.53	33.22	56.08
27	19/07/2007 05:56 p.m.	19.38	33.64	53.63

<u>Data Point</u>	<u>Time</u>	<u>Temperature [C]</u>	<u>Light [l]</u>	<u>Humidity [%]</u>
29	19/07/2007 09:56 p.m.	20.72	0.05	58.89
30	19/07/2007 11:56 p.m.	20.72	0.05	62.98
31	20/07/2007 01:56 a.m.	20.56	0.05	63.30
32	20/07/2007 03:56 a.m.	20.21	0.05	65.98
33	20/07/2007 05:56 a.m.	20.61	0.05	63.10
34	20/07/2007 07:56 a.m.	20.97	25.35	56.52
35	20/07/2007 09:56 a.m.	21.52	33.53	57.36
36	20/07/2007 11:56 a.m.	22.56	33.41	48.38
37	20/07/2007 01:56 p.m.	21.45	33.93	48.82
38	20/07/2007 03:56 p.m.	20.03	33.62	49.94
39	20/07/2007 05:56 p.m.	20.72	33.64	60.89
40	20/07/2007 07:56 p.m.	20.89	33.53	64.47
41	20/07/2007 09:56 p.m.	20.77	0.05	63.50
42	20/07/2007 11:56 p.m.	20.33	0.05	67.03
43	21/07/2007 01:56 a.m.	21.22	0.05	61.45
44	21/07/2007 03:56 a.m.	20.83	0.05	60.53
45	21/07/2007 05:56 a.m.	21.65	0.05	55.40
46	21/07/2007 07:56 a.m.	22.04	25.62	54.15
47	21/07/2007 09:56 a.m.	21.77	33.53	57.36
48	21/07/2007 11:56 a.m.	23.57	33.64	46.09
49	21/07/2007 01:56 p.m.	21.92	33.62	44.08
50	21/07/2007 03:56 p.m.	20.68	33.53	57.44
51	21/07/2007 05:56 p.m.	21.03	33.51	54.96
52	21/07/2007 07:56 p.m.	20.61	33.34	51.75
53	21/07/2007 09:56 p.m.	21.22	0.05	54.47
54	21/07/2007 11:56 p.m.	20.21	0.05	66.72
55	22/07/2007 01:56 a.m.	19.85	0.05	68.09
56	22/07/2007 03:56 a.m.	21.03	0.05	58.45
57	22/07/2007 05:56 a.m.	21.12	0.05	57.44
58	22/07/2007 07:56 a.m.	21.42	25.71	56.44
59	22/07/2007 09:56 a.m.	21.22	33.22	56.24
60	22/07/2007 11:56 a.m.	22.70	33.62	47.09
61	22/07/2007 01:56 p.m.	21.95	33.28	49.18
62	22/07/2007 03:56 p.m.	21.45	33.64	47.57
63	22/07/2007 05:56 p.m.	19.69	33.28	56.44
64	22/07/2007 07:56 p.m.	20.89	33.41	57.80
65	22/07/2007 09:56 p.m.	19.85	0.05	62.54
66	22/07/2007 11:56 p.m.	20.29	0.05	64.98
67	23/07/2007 01:56 a.m.	21.20	0.05	59.97
68	23/07/2007 03:56 a.m.	21.88	0.05	55.40
69	23/07/2007 05:56 a.m.	21.95	0.05	56.44
70	23/07/2007 07:56 a.m.	21.77	26.58	53.63
71	23/07/2007 09:56 a.m.	21.27	33.39	54.83
72	23/07/2007 11:56 a.m.	22.79	33.22	48.82
73	23/07/2007 01:56 p.m.	20.79	33.53	47.57
74	23/07/2007 03:56 p.m.	20.83	33.87	49.94
75	23/07/2007 05:56 p.m.	19.31	33.64	56.08
76	23/07/2007 07:56 p.m.	20.38	33.64	60.45
77	23/07/2007 09:56 p.m.	20.33	0.05	59.25
78	23/07/2007 11:56 p.m.	20.20	0.05	61.54
79	24/07/2007 01:56 a.m.	21.20	0.05	58.45
80	24/07/2007 03:56 a.m.	21.48	0.05	52.71
81	24/07/2007 05:56 a.m.	21.42	0.05	53.63
82	24/07/2007 07:56 a.m.	20.98	26.97	54.03
83	24/07/2007 09:56 a.m.	20.97	33.64	57.16
84	24/07/2007 11:56 a.m.	22.27	32.87	50.50

Anexo 2.



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 107 (2007) 48–56

The Journal of
Steroid Biochemistry
&
Molecular Biology

www.elsevier.com/locate/jsmb

Steroids with a carbamate function at C-17, a novel class of inhibitors for human and hamster steroid 5 α -reductase

Eugene Bratoeff^a, Teresita Sainz^b, Marisa Cabeza^{b,*}, Ivonne Heuze^b, Sergio Recillas^b,
Victor Pérez^a, César Rodríguez^b, Tania Segura^a, Juan Gonzáles^a, Elena Ramírez^a

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

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

Received 15 December 2006; accepted 1 March 2007

Abstract

In order to study the biological activity of the two novel steroidal carbamates derivatives: 8a and 8b, we determined the concentration of both compounds that inhibit the 50% of the activity of human prostate 5 α -reductase enzyme, as well as the *in vivo* effect of these compounds in the weight of hamster prostate and flank organs diameter size. We determined also, the capacity of these steroids to bind to the androgen receptors present in the rat prostate cytosol. Furthermore the activity of these compounds on the mRNA expression of glycerol 3-phosphate acyl transferase (GPAT) in flank organs was analyzed by RT-PCR. This enzyme induces the triglycerides synthesis, which is increased by T in flank organs.

The results from this study indicated that steroids 8a and 8b inhibited the human 5 α -reductase activity. Compound 8b, which contains a bromine atom in the molecule, decreased the inhibitory effect of the human 5 α -reductase activity, whereas steroid 8a, which lacks a halogen atom did not show any decrease in the activity of this enzyme. The competition studies demonstrated that 8a and 8b did not inhibit mibolerone binding to the androgen receptor present in the rat prostate cytosol. However, the *in vivo* activity of both steroids was similar; steroids 8a and 8b had a tendency to decrease the weight of the hamster prostate although this parameter was not statistically significant. These compounds also significantly reduced the diameter of the pigmented spot of hamster flank organs, which are androgen dependent skin's pilosebaceous structures.

Steroids 8a and 8b, decreased the transcription of mRNA encoding for GPAT in intact hamster's flank organs topically treated in a similar way as in gonadectomized non-treated animals. These results suggest that mRNA encoding for GPAT is induced by DHT in this tissue.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Human prostate 5 α -reductase; Hamster prostate; Hamster flank organs; Androgen receptor; 17-Carbamate steroids; Glycerol 3-phosphate acyl transferase; Triglycerides synthesis

Anexo 3.

STEROIDS 73 (2008) 838–843



available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/steroids



Biological activity of novel progesterone derivatives having a bulky ester side chains at C-3

Marisa Cabeza^{a,*}, Eugene Bratoeff^b, Elena Ramírez^b, Ivonne Heuze^a, Sergio Recillas^a,
Hilda Berrios^a, Angel Cruz^b, Olmo Cabrera^b, Victor Perez^b

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

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

ARTICLE INFO

Article history

Received 27 February 2007

Received in revised form

17 December 2007

Accepted 20 March 2008

Published on line 4 April 2008

Keywords:

Hamster prostate

Androgen receptor

Bulky ester side chains steroids

Mibolerone

ABSTRACT

Antiandrogens are widely used agents for the treatment of androgen dependent diseases as inhibitors of androgen receptors (AR) action. Although the precise mechanism of antiandrogen action is not yet elucidated, recent studies indicate the involvement of the structure of the ligand in relation with the nuclear co-repressors. In the present study, we investigated the relationship between log P (the partition coefficient) of four pregnane derivatives 9a–9d and their biological activity. For this purpose, we determined the relative binding affinity (RBA) of steroids 9a–9d to androgen receptor (AR) obtained from rat prostate cytosol, using labeled mibolerone (MIB) as ligand. The IC_{50} value of each compound was calculated according to the plots of concentration versus percentage of binding. The *in vivo* effect of 9a–9d was determined on the weight of the prostate and seminal vesicles from castrated hamsters treated with dihydrotestosterone.

The four compounds bind to the androgen receptor with different relative binding affinity (RBA). Compound 9d having a log P of 4.17 showed the highest RBA > 100% as compared to compound 9a having a log P of 2.92 which exhibited a RBA of only 2.85%. These data show a very good correlation between the lipophilicity of these compounds represented by log P and the percentage of RBA.

The *in vivo* experiments showed that all new compound 9a–9d reduced the weight of the prostate gland as well as the seminal vesicles. Steroids 9c and 9d having a log P of 3.75 and 4.17, respectively, showed the highest antiandrogenic effect.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Anexo 4.

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology xxx (2008) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb



In vivo and *in vitro* effect of novel 4,16-pregnadiene-6,20-dione derivatives, as 5 α -reductase inhibitors

Eugene Bratoeff^a, Marisa Cabeza^{b,*}, Victor Pérez-Ornelas^a, Sergio Recillas^b, Ivonne Heuze^a

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2008

Received in revised form 20 June 2008

Accepted 25 June 2008

Keywords:

Human prostate

Hamster prostate

5 α -Reductase

Androgen receptor

Novel 3-substituted

pregna-4,16-diene-6,20-dione derivatives

ABSTRACT

In this study, we report the synthesis and biological evaluation of several new 3-substituted prena-4,16-diene-6,20-dione derivatives (11a–11d). These compounds were prepared from the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate.

The biological effect of these steroids was demonstrated *in vivo* and *in vitro* experiments. In the *in vivo* experiments, we measured the activity of the 11a–11d on the weight of the prostate gland of gonadectomized hamsters treated with testosterone plus finasteride or with the new steroids. For the studies *in vitro*, we determined the IC₅₀ values by measuring the steroid concentration that inhibits 50% of the activity of 5 α -reductase present in human prostate. In order to study the mechanism of action of 11a–11d, we also determined the capacity of these steroids to bind to the androgen receptor (AR) present in the rat prostate cytosol using labeled mibolerone as a tracer.

The results from this work indicated that compounds 11a–11d significantly decreased the weight of the prostate as compared to testosterone treated animals and this reduction of the weight of the prostate was comparable to that produced by the finasteride.

On the other hand 11a–11d exhibited a high inhibitory activity for the human 5 α -reductase enzyme with IC₅₀ values of 1.4×10^{-8} , 1.8×10^{-9} , 1.0×10^{-8} and 4×10^{-9} respectively. However the IC₅₀ value of 11a (1.8×10^{-9}) was the only one lower than that of finasteride (8.5×10^{-9}). Nevertheless this compound did not show a higher potency *in vivo* as compared to that of compounds 11b–11d.

The competition analysis for the androgen receptor indicated that the IC₅₀ value of non-labeled mibolerone used in this experiment was 1 nM, whereas steroids 10, 11a–11d did not inhibit the labeled mibolerone binding to the androgen receptor. On the other hand, steroid 10 did not show any activities *in vitro* or *in vivo*, and for this reason these steroidal derivatives (11a–11d) cannot be considered as prodrugs of compound 10.

In conclusion, the compounds containing chlorine 11a, bromine 11b, iodine 11c atoms, and 11d (without any substituent in the ester moiety) at C-3 produce a significant decrease of the prostate weight in castrated animals treated with T and inhibits the activity of the 5 α -reductase. Apparently the presence of the halogen atoms in compounds 11a–11c enhances the inhibitory activity for the 5 α -reductase enzyme.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Anexo 5.

Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2008; 00(0): 1–8

informa
healthcare

Aromatic esters of progesterone as 5 α -reductase and prostate growth inhibitors

EUGENE BRATOEFF¹, TANIA SEGURA¹, SERGIO RECILLAS², ERIC CARRIZALES²,
ANAY PALACIOS², IVONNE HEUZE², & MARISA CABEZA²

¹Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry, National University of Mexico City, Mexico D.F., Mexico, and ²Department of Biological Systems and Animal Production, Metropolitan University-Xochimilco, Mexico D.F., Mexico

(Received 26 February 2008; accepted 19 May 2008)

Abstract

The aim of this study was to determine the biological activity of 4 steroidal derivatives (9a, 9b and 10a, 10b) prepared from the commercially available 17 α acetoxypregesterone, where 9a, 9b, have the Δ^4 -3-oxo structure and 10a and 10b an epoxy group at C-4 and C-5.

These steroids were tested as inhibitors of 5 α -reductase enzyme, which is present in androgen-dependent tissues and converts testosterone to its more active reduced metabolite dihydrotestosterone.

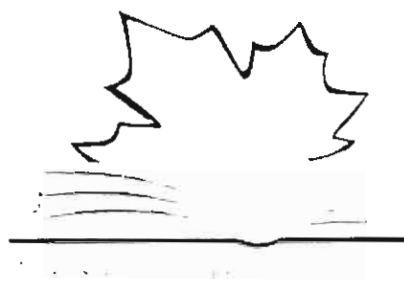
The pharmacological effect of these steroids was demonstrated by the significant decrease of the weight of the prostate gland of gonadectomized hamsters treated with testosterone plus finasteride or with steroids 10a and 10b. For the studies *in vitro* the IC₅₀ values were determined by measuring the steroid concentration that inhibits 50% of the activity of 5 α -reductase. In this study we also determined the capacity of these steroids to bind to the androgen receptor present in the rat prostate cytosol.

The results from this work indicated that compounds 9a, 9b, 10a, and 10b inhibited the 5 α reductase activity with IC₅₀ values of 360, 370, 13 and 4.9 nM respectively. However these steroids did not bind to the androgen receptors since none competed with labeled mibolerone. Steroid 10b, an epoxy steroidal derivative containing bromine atom in the ester moiety, was the most active inhibitor of 5 α -reductase enzyme, present in human prostate homogenates with an IC₅₀ value of 4.9 nM and also showed *in vivo* pharmacological activity since it decreased the weight of the prostate from hamsters treated with testosterone in a similar way as finasteride.

Keywords: Human prostate, aromatic progesterone esters, androgen receptor, 5 α -reductase inhibitors, 5 α -reductase, inhibition

Anexo 6.

CSPS



10th Canadian Society for Pharmaceutical Sciences (CSPS) Annual Meeting

64th Association of Faculties of Pharmacy of Canada (AFPC) Annual Meeting

18th Pharmaceutical & Biomedical Analysis (PBA) Annual Meeting

FROM BENCH TO
MARKET



May 30 – June 2, 2007 The Queen Elizabeth Hotel Montréal, Québec, Canada

lication of placebo buccal films. C_{max} was observed to be 87.56 mIU/L and 52.11 mIU/L for Insulin s.c. Injection and buccal films respectively. A prolonged T_{max} of 4 hours was observed for buccal films as compared to 1 hour for insulin s.c. Injection. Relative bioavailability was calculated to be 26.02 % for buccal film as compared to s.c. Injection. The buccal films were successful in delivering glucose responsive doses ($>15-50$ mIU/L) throughout the period of study, as compared to S.C administration, where the serum insulin levels were observed to fall below 5 mIU/L, (basal serum insulin levels essential for therapeutic effect) after 5 hrs. **Conclusions:** Buccoadhesive films were successfully prepared and characterized *in vivo*. The results indicated that the buccal films were able to deliver glucose responsive doses of insulin over a prolonged period of time as compared to the insulin subcutaneous Injection.

Pharmaceutical Chemistry

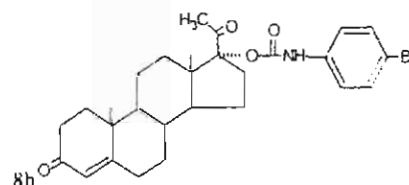
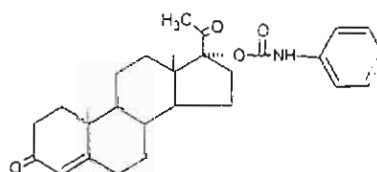
Steroids with a carbamate function at C-17, a novel class of inhibitors for human and hamster steroid 5 α -reductase.

Marisa Cabeza^a, Eugene Bratoeff^b, Teresita Sainz^a, Ivonne Heuze^a, Sergio Recillas^a, Victor Pérez^a, César Rodríguez^a, Tania Segura^b, Juan González^b and Elena Ramírez^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

Purpose: The aim of this study is to determine the effect of the two novel steroidal carbamates derivatives: 8a and 8b as inhibitors of 5 α -reductase enzyme and the capacity of these steroids to bind androgen receptor, as well as the *in vivo* effect of these compounds in the weight of hamster prostate and flank organs diameter size. We determined also, the topical activity of these compounds on the mRNA expression of glycerol 3-phosphate acyl transferase (GPAT) in flank organs. **Methods:** In order to study the biological activity of the two novel steroids, we determined the concentration of both compounds that inhibit the 50% of the activity of human prostate 5 α -reductase enzyme, as well as the *in vivo* effect of these compounds in the weight of hamster prostate and flank organs diameter size. We determined also, the capacity of these steroids to bind to the androgen receptor present in the rat prostate cytosol using labeled mibolerone as tracer. Furthermore the topical activity of these compounds on the mRNA expression of GPAT in flank organs from intact and gonadectomized hamsters was analyzed by RT-PCR. This enzyme induces the triglycerides synthesis, which is increased by testosterone (T) in flank organs. **Results:** Results from this study indicated that steroids 8a and 8b inhibited the activity of human 5 α -reductase with an IC_{50} of 1×10^{-3} M and 5×10^{-6} M respectively. The competition studies demonstrated that 8a and 8b did not bind to the

androgen receptor present in the rat prostate cytosol. However, the *in vivo* activity of both steroids was similar: steroids 8a and 8b had a tendency to decrease the weight of the hamster prostate although this parameter was not statistically significant. These compounds also significantly reduced the diameter of the pigmented spot of hamster flank organs, which are androgen dependent skin's pilosebaceous structures. Topical treatment for 15 days with 8a and 8b to intact hamster's flank organs significantly decreased the mRNA expression of GPAT, to similar levels of the gonadectomized control with respect to those animals that were vehicle treated (intact). **Conclusion:** Steroids 8a and 8b which are inhibitors of 5 α -reductase in the human prostate and hamster's flank organs decreased the transcription of mRNA encoding for GPAT in intact hamster's flank organs topically treated in a similar way as in gonadectomized non treated animals. These results suggest that mRNA encoding for GPAT is induced by DHT in this tissue.

Figure1. Structure of the steroids studied
8a

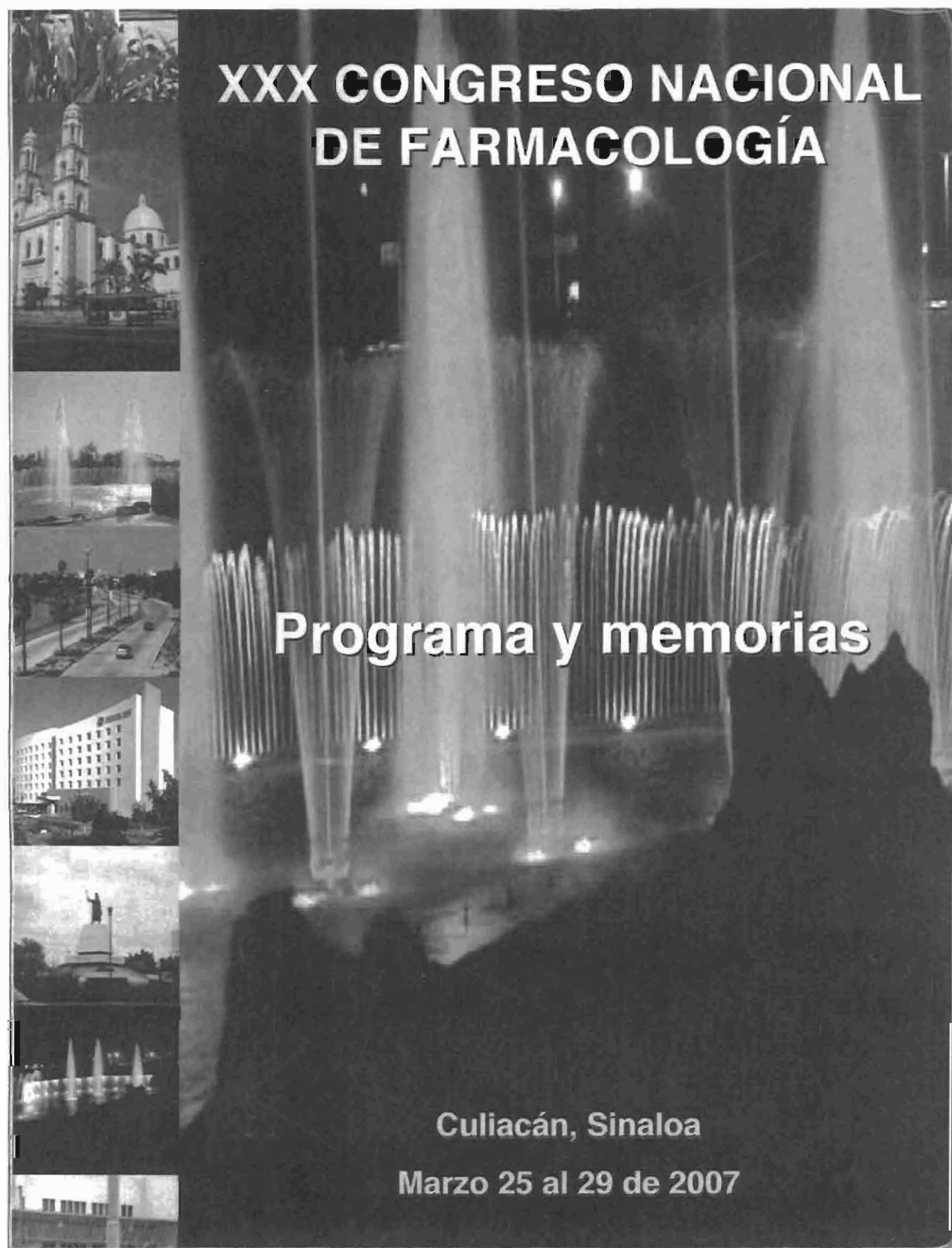


36. 3,5-Bis-arylmethylene-4-piperidone derivatives: A novel class of potent anticancer agents

Chandrani Mukherjee, Erik DeClercq,¹ James P. Stables,² and Amitabh Jha*. Department of Chemistry, Acadia University, Wolfville, NS, Canada. ¹Rega Institute of Medical Research, Leuven, Belgium. ²National Institute of Neurological Disorder and Stroke, Bethesda, MD, USA

PURPOSE: The efficacy of an anticancer drug relies on its ability to select between malignant and normal cells. A number of α,β -unsaturated ketones were designed as thiol alkylators with little or no affinity for hydroxy and amino groups found in nucleic acids. Inhibition of tumour growth is the result of the $O=C-C=CH$ system alkylating sulfhydryl-rich key enzymes (e.g. topoisomerase II α) in cancer cells by rapid and selective Michael addition. Hence, development of α,β -unsaturated ketones as

Anexo 7.

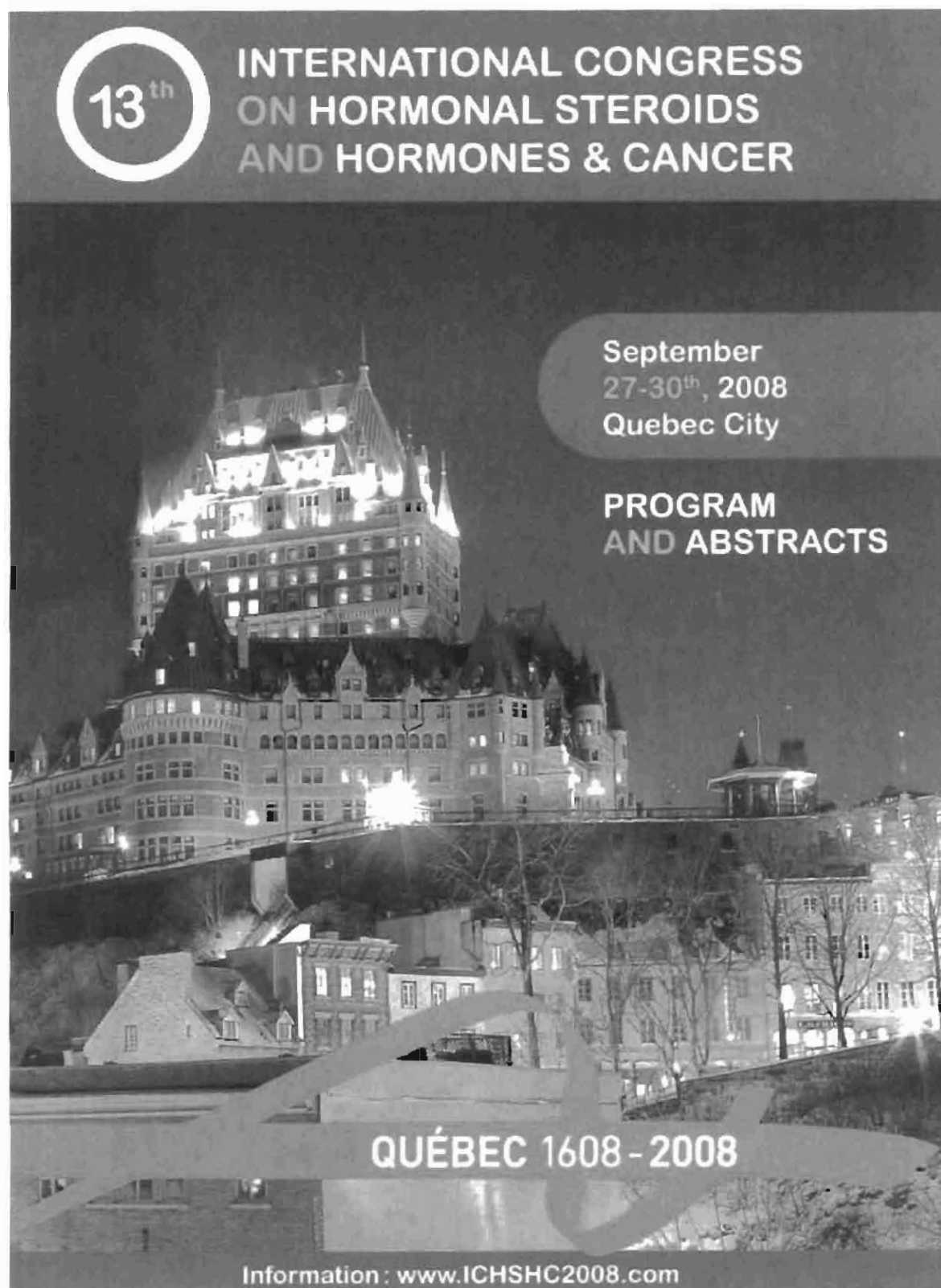


Ma-20

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIANDROGÉNICA DE ESTEROIDES DE NUEVA SÍNTESIS. Recillas Morales S¹, Heuze de Icaza Y¹, Bratoeff Titef E², Ramírez López E², Cabrera Contreras O², Cruz Hernández A², Cabeza Salinas M¹. ¹Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, ²Universidad Nacional Autónoma de México.

Se determinó la actividad antiandrogénica *in vivo* e *in vitro*, de los compuestos de nueva síntesis 9a-9d. Para los estudios *in vivo*, se utilizaron hámsteres machos castrados; los animales se inyectaron con dihidrotestosterona (DHT) más cada uno de los esteroides a probar. Después del tratamiento, los animales fueron sacrificados y las próstatas y las vesículas seminales pesadas. Se midió también el diámetro de los órganos del flanco. Para los estudios *in vitro* se utilizó el citosol obtenido de próstatas de ratas castradas, como fuente del receptor de andrógenos (RA). El IC₅₀, se obtuvo a partir de las curvas de inhibición graficadas a partir la concentración contra el porcentaje de unión al RA. Los experimentos *in vivo* indicaron que los compuestos 9a-9d inyectados conjuntamente con la DHT, disminuyeron de una manera estadísticamente significativa el peso de las próstatas y de las vesículas seminales de los hámsteres tratados en comparación con el control tratado únicamente con DHT. Los compuestos 9b-9d también disminuyeron el diámetro de los órganos del flanco. Los experimentos *in vitro* mostraron que los compuestos 9a-9d se unieron a los receptores de andrógenos con una afinidad relativa de unión (RBA) del 2.85%, 61.5%, >100% y >100%, respectivamente.

Anexo 8.



In vivo and in vitro effect of novel 4, 16-pregnadiene-6, 20-dione derivatives, as 5- α reductase inhibitors

Marisa Caboza¹, Eugene Bratoeff², Victor Pérez-Ornelas², Sergio Recillas¹, Ivonne Heuze¹.

¹ Department of Biological Systems and Animal Production Metropolitan University-Xochimilco, Mexico D. F., Mexico.

² Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry, National University of Mexico City, Mexico D. F., Mexico.

marisa@correo.xoc.uam.mx

In this study, we report the synthesis and biological evaluation of several new 3-substituted pregna-4, 16-diene-6, 20-dione derivatives (11a-11d). These compounds were prepared from the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate. The biological effect of these steroids was demonstrated in *in vivo* and *in vitro* experiments. In the *in vivo* experiments, we measured the activity of the 11a-11d on the weight of the prostate gland of gonadectomized hamsters treated with testosterone plus finasteride or with the new steroids. For the studies *in vitro*, we determined the IC_{50} values by measuring the steroid concentration that inhibits 50% of the activity of 5 α -reductase present in prostate from human cadaver. In order to study the mechanism of action of 11a-11d, we also determined the capacity of these steroids to bind to the androgen receptor. The results from this work indicated that compounds 11a-11d significantly decreased the weight of the prostate as compared to testosterone treated hamsters. On the other hand 11a-11d exhibited a high inhibitory activity for the human 5 α -reductase enzyme. However the IC_{50} value of 11a was the only one lower than that of finasteride. Nevertheless this compound didn't show a higher potency *in vivo* as compared to that of compounds 11b-11d. The competition analysis for the androgen receptor indicated that the IC_{50} value of non labeled mibolerone used in this experiment was 1 nM, whereas steroids 10, 11a-11c did not inhibit the labeled mibolerone binding to the androgen receptor. In conclusion, the compounds containing chlorine 11a, bromine 11b, iodine 11c atoms, and 11d (without any substituent in the ester moiety) at C-3 produce a significant decrease of the prostate weight in castrated animals treated with T and inhibits the activity of the 5 α -reductase. Apparently the presence of the halogen atoms in compounds 11a-11c enhances the inhibitory activity for the 5 α -reductase enzyme.