



**NOVOS ESTERÓIDES INIBIDORES DA  
BIOSSÍNTESE DE ANDROGÉNIOS**

Vânia Maria Antunes Moreira



Faculdade de Farmácia  
Universidade de Coimbra

2008

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Farmácia, na especialidade de Química Farmacêutica, sob orientação científica do Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Trabalho financiado pela *Fundação para a Ciência e a Tecnologia*  
(SFRH/BD/12508/2003 financiada pelo POCI 2010).



Ciência.Inovação  
2010

**Programa Operacional Ciência e Inovação 2010**  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



*“A Ciência é feita de factos, tal como uma casa é feita de tijolos. Contudo, um conjunto de factos é tanto Ciência como uma pilha de tijolos é uma casa.”*

Henri Poincare (1854-1912)

Aos meus pais e irmã; aos meus avós já falecidos.

Aos restantes familiares e aos amigos.

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador, pela sua visão, espírito empreendedor e optimismo que alia a uma enorme capacidade científica e cujo empenho foi imprescindível para o trabalho realizado ao longo destes 4 anos de percurso. Foi para mim um privilégio enorme ser merecedora da sua confiança para a realização deste projecto, aprender e trabalhar com ele. A ele gostaria ainda de agradecer a revisão crítica do presente texto. Uma palavra de agradecimento também à Dr.<sup>a</sup> Rute Salvador, sua esposa, pela amizade com que sempre me recebeu.

À Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo, Directora do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por me ter acolhido no Laboratório que dirige para que pudesse realizar o presente trabalho, e por ter proporcionado as condições necessárias ao seu normal decurso. Agradeço ainda a sua amizade e boa disposição.

*I would like to thank Professor Vincent C. O. Njar (Ph.D.) for welcoming me on his lab and providing all the conditions needed for the work I developed at the Department of Pharmacology & Experimental Therapeutics, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA. I would also like to thank him for his kind assistance in finding me a place to stay and permanent concern about my health and well-being during the amount of time I spent in Baltimore.*

*I thank Sean for his friendship, warm welcoming to the USA, and all the help provided with learning the skills needed to perform the biological evaluation part of this work.*

*I also thank all the people in Professor Vincent Njar's lab and Professor Angela Brodie (Ph.D.) and the people in her lab for their friendship and assistance with some aspects of this work.*

Aos Docentes e Funcionários do Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade de Coimbra agradeço a amizade, simpatia e o apoio prestados.

Aos meus Colegas de Doutoramento e aos já Doutorados pela amizade que nos une, pelo apoio incansável nos momentos mais difíceis e pelo valioso contributo que sempre deram de bom grado para o presente trabalho.

Aos Funcionários da Biblioteca da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela amizade com que me receberam e pelo incansável empenho e profissionalismo que muito ajudaram na obtenção da literatura subjacente a este trabalho.

Ao Professor Doutor Rui de Carvalho, do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, pela disponibilidade e apoio prestados no trabalho de elucidação estrutural deste projecto.

À Doutora Ana Matos Beja Alte da Veiga e à Professora Doutora Manuela Ramos Silva, do CEMDRX, Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, pela disponibilidade e apoio prestados no trabalho de difracção de raios-X deste projecto.

Ao Dr. Carlos Rabaça, Assistente Hospitalar do Serviço de Urologia do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, pela importante discussão de aspectos do presente trabalho que permitiram o correcto enquadramento das opções terapêuticas disponíveis para o tratamento do cancro da próstata na Europa e, mais concretamente, em Portugal.

Ao Professor Doutor João Rui Pita pela sua amizade, amabilidade e simpatia e pela ajuda, apoio e entusiasmo com que sempre acompanhou o meu percurso académico e o presente trabalho.

Aos amigos pelos inigualáveis momentos de partilha e carinho. Tem sido muito bom caminhar e aprender convosco.

À Família pelo apoio incondicional e pelos momentos mais difíceis que ajudaram a superar.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho o meu muito obrigado.

À instituição financiadora deste projecto, Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/12508/2003 financiada pelo POCI 2010).

À Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento pelo patrocínio de deslocações aos EUA que foram importantes para este projecto.



# ÍNDICE GERAL

RESUMO	I
ABSTRACT	V
ABREVIATURAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XVIII
PLANO GERAL DA TESE	XIX

## CAPÍTULO I

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1. O cancro da próstata no mundo. Alguns números	3
2. Androgénios: fisiologia vs patologia	9
2.1 O papel fisiológico dos androgénios	9
2.2 Os androgénios e o cancro da próstata. Biologia molecular da doença	13
3. Diagnóstico, estadiamento e tratamento do cancro da próstata	15
4. O citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase-C <sub>17,20</sub> -liase ou CYP17	20
4.1 Actividades e mecanismo	20
4.2 Propriedades e mecanismos de regulação da sua actividade	23

5. Inibidores da CYP17	27
5.1 Não esteróides	30
5.1.1 Derivados do imidazole	30
5.1.2 Derivados da piridina	40
5.1.3 Outros derivados não esteróides	44
5.2 Esteróides	47
5.2.1 Derivados da série androstano	47
5.2.2 Derivados da série pregnano	58
5.2.3 Outros derivados esteróides	63
6. Referências	65
7. OBJECTIVOS GERAIS DO TRABALHO	94

## **CAPÍTULO II**

<b>SÍNTESE QUÍMICA E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS NOVOS COMPOSTOS SINTETIZADOS</b>	97
1. Síntese de derivados do indazole	99
1.1 Estratégia de Síntese	99
1.1.1 Reacção do reagente de Vilsmeier com cetonas	99
1.1.2 Introdução do grupo indazolilo em C17 ( <i>séries 1 e 2</i> )	104
1.1.3 Desformilação	109
1.1.4 Hidrólise alcalina	112

1.1.5 Reacção de Oppenauer	112
1.2 Resultados	115
1.2.1 Aplicação da estratégia de síntese	115
1.2.2 Aspectos seleccionados da elucidação estrutural dos derivados do indazole	118
2. C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole	132
2.1 Estratégia de Síntese	132
2.1.1 Reacção dos álcoois com compostos do tipo <i>N,N'</i> -carbonildiimidazole	132
2.2 Resultados	134
2.2.1 Aplicação da estratégia de síntese	134
2.2.2 Aspectos seleccionados da elucidação estrutural dos C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole	138
3. Conclusões	148
4. Referências	149

### **CAPÍTULO III**

<b>AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS NOVOS COMPOSTOS SINTETIZADOS</b>	155
1. Inibição da CYP17	157
1.1 O “ <i>Acetic Acid Releasing Assay</i> ” ou AARA	157

1.2 Resultados	161
1.2.1 Derivados do indazole	161
1.2.2 C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole	163
2. Ligação ao receptor de androgénio	164
2.1 Ensaio de ligação competitiva ao receptor de androgénio	164
2.2 Resultados	168
2.2.1 Derivados do indazole	168
2.2.1.1 Células LAPC4	168
2.2.1.2 Células LNCaP	169
2.2.2 C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole	170
2.2.2.1 Células LAPC4	170
2.2.2.2 Células LNCaP	173
3. Transcrição mediada pelo receptor de androgénio mutado	176
3.1 O ensaio da luciferase	176
3.2 Resultados	180
3.2.1 Derivados do indazole	180
3.2.2 C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole	181
4. Ensaio de proliferação celular	184
4.1 Os sais de formazana	184
4.2 Resultados	186
4.2.1 Derivados do indazole	186
4.2.1.1 Células LAPC4	186
4.2.1.2 Células LNCaP	188
4.2.1.3 Células PC-3	190

4.2.2 C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole	192
4.2.2.1 Células PC-3	192
5. Conclusões	197
6. Referências	201

## CAPÍTULO IV

<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	215
1. Síntese química	217
1.1 Derivados do indazole	218
1.1.1 Síntese do acetato de 17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo <b>187</b> e do acetato de 17-cloroandrosta-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo <b>188</b>	218
1.1.2 Síntese do acetato de 16-formil-17-(1 <i>H</i> -indazol-1-il)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo <b>189</b> e do acetato de 16-formil-17-(2 <i>H</i> -indazol-2-il)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo <b>190</b>	219
1.1.3 Síntese do acetato de 17-(1 <i>H</i> -indazol-1-il)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo <b>191</b>	221
1.1.4 Síntese do 17-(1 <i>H</i> -indazol-1-il)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ol <b>192</b>	222
1.1.5 Síntese do 17-(1 <i>H</i> -indazol-1-il)androsta-4,16-dien-3-ona <b>193</b>	223
1.1.6 Síntese do acetato de 17-(2 <i>H</i> -indazol-2-il)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo <b>194</b>	224
1.1.7 Síntese do 17-(2 <i>H</i> -indazol-2-il)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ol <b>195</b>	225
1.1.8 Síntese do 17-(2 <i>H</i> -indazol-2-il)androsta-4,16-dien-3-ona <b>196</b>	226

1.2 C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole	227
1.2.1 Síntese do (2'-metil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxoandrost-4-en-17β-ilo <b>202</b>	227
1.2.2 Síntese do (2'-metil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxoandrosta-1,4,6-trien-17β-ilo <b>203</b>	228
1.2.3 Síntese do (2'-metil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxoandrosta-4,6-dien-17β-ilo <b>204</b>	229
1.2.4 Síntese do (2'-metil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxo-5α-androst-17β-ilo <b>205</b>	230
1.2.5 Síntese do (2'-metil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxoandrosta-1,4-dien-17β-ilo <b>206</b>	230
1.2.6 Síntese do (2'-metil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxo-5α-androst-1-en-17β-ilo <b>207</b>	231
1.2.7 Síntese do acetato de 17β-hidroxiandrost-5-en-3β-ilo <b>208</b>	232
1.2.8 Síntese do (2'-metil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)carboxilato de 3β-acetoxiandrost-5-en-17β-ilo <b>209</b>	233
1.2.9 Síntese do 5α-androstan-17β-ol <b>210</b>	233
1.2.10 Síntese do (2'-metil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)carboxilato de 5α-androst-17β-ilo <b>211</b>	234
1.2.11 Síntese do 3β-[[ <i>(t</i> -butil)dimetilsilil]oxi]androst-5-en-17-ona <b>212</b>	235
1.2.12 Síntese do 3β-[[ <i>(t</i> -butil)dimetilsilil]oxi]androst-5-en-17β-ol <b>213</b>	236
1.2.13 Síntese do (2'-metil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)carboxilato de 3β-[[ <i>(t</i> -butil)dimetilsilil]oxi]androst-5-en-17β-ilo <b>214</b>	236
1.2.14 Síntese do (2'-metil-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)carboxilato de 3β-hidroxiandrost-5-en-17β-ilo <b>215</b>	237

2. Avaliação biológica dos compostos sintetizados	239
2.1 Considerações gerais	240
2.2 Inibição da CYP17 (Componente liase)	240
2.3 Ligação ao receptor de androgénio	242
2.4 Efeito na transcrição mediada pelo receptor de androgénio mutado	242
2.5 Ensaio de proliferação celular	244
3. Referências	245
LISTA DE PUBLICAÇÕES	249

## RESUMO

O cancro da próstata é uma doença multifactorial com grande impacto a nível mundial. O aumento da esperança média de vida das populações e da divulgação e uso de métodos de detecção do cancro da próstata, especialmente o PSA, contribuíram bastante para uma modificação do perfil do doente típico de há 50 anos atrás. Era habitual diagnosticar-se cancro da próstata apenas em estadios avançados devido a doença metastática, representando o diagnóstico geralmente uma sentença de morte em 1-2 anos. É actualmente possível diagnosticar o cancro da próstata num estadio muito precoce e potencialmente curável por intervenção cirúrgica ou uso de radiação. O tratamento do cancro da próstata faz-se em função do estadio da doença, da expectativa do número de anos de vida do paciente, dos efeitos laterais associados à terapêutica e da preferência do paciente. As terapêuticas hormonais disponíveis para o seu tratamento baseiam-se na descoberta de Huggins *et al.*, em 1941, que mostrou que o crescimento e progressão do cancro da próstata dependiam do nível de androgénios do organismo, e lhe valeu o Prémio Nobel da Medicina.

A CYP17 é uma das enzimas envolvidas na biossíntese de androgénios no corpo humano. A inibição da sua actividade tem sido reconhecida historicamente como uma estratégia importante para o tratamento do cancro da próstata, como forma de reduzir o nível de androgénios circulantes e assim impedir o crescimento e progressão da doença. O primeiro inibidor da CYP17 a ser usado em prática clínica foi o cetoconazol, um composto não esteróide com actividade antifúngica, que se descobriu induzir o desenvolvimento de ginecomastia em pacientes do sexo masculino. Após o cetoconazol, foram sintetizados e avaliados uma série de compostos esteróides e não esteróides como inibidores da CYP17, numa tentativa de encontrar moléculas mais potentes e melhorar o perfil de efeitos adversos a ele associado.

No decurso deste trabalho foram sintetizados novos compostos esteróides de núcleo androstano tendo por base as considerações gerais de estrutura-actividade conhecidas para os inibidores da



CYP17, como potenciais agentes úteis no tratamento do cancro da próstata. As duas estratégias de síntese diferentes exploradas permitiram a obtenção de dois grupos de compostos, os quais foram designados genericamente de derivados do indazole e C17 carbamatos derivados do 2'-metilimidazole. A elucidação estrutural dos novos compostos sintetizados foi feita com base em técnicas de IR, espectrometria de massa e  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR 1D e 2D.

Os derivados do indazole sintetizados, à semelhança de outros compostos esteróides que se revelaram bons inibidores da CYP17, possuem além do heterociclo com electrões disponíveis para coordenação com o Fe heme da enzima ligado ao C17, uma dupla ligação em C16. Os C17 carbamatos derivados do 2'-metilimidazole têm a particularidade de a função carbamato funcionar como espaçador e aumentar assim a distância entre o heterociclo e o C17. Quando avaliados para a inibição da CYP17 humana, apenas dois dos C17 carbamatos derivados do 2'-metilimidazole inibiram a enzima, ainda que de forma menos potente que o cetoconazol. Os derivados do indazole não revelaram potencial inibitório da enzima. Foram apresentadas e discutidas razões possíveis para esta observação.

O bloqueio da actividade do receptor de androgénio é também uma estratégia fundamental no contexto do tratamento do cancro da próstata, uma vez que a progressão da doença lhe está intimamente associada. Em particular, o aumento do número destes receptores e o aparecimento de receptores mutados têm sido apontados como mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de resistência a níveis muito baixos de androgénios no organismo, tornando ineficazes as estratégias terapêuticas referidas anteriormente. Foi demonstrado que compostos concebidos como inibidores da CYP17 possuíam propriedades desejáveis do ponto de vista de ligação ao receptor de androgénios e inibição da transcrição por ele mediada, abrindo-se assim um novo capítulo na avaliação pré-clínica deste tipo de compostos. Neste contexto, a afinidade dos derivados do indazole e dos C17 carbamatos derivados do 2'-metilimidazole para o receptor de androgénio original e mutado, usando células de metástases ósseas do cancro da próstata LAPC4 e LNCaP, foi estudada. O efeito destes compostos sobre a transcrição mediada pelo receptor mutado (das células LNCaP) na presença e ausência do ligando natural di-hidrotestosterona, foi avaliado com recurso

ao gene reportador luciferase. Em geral, a função carbamato dos C17 carbamatos derivados do 2'-metilimidazole permitiu uma excelente afinidade para o receptor de androgénio. O efeito promovido por esta classe de compostos sobre a transcrição mediada pelo receptor de androgénio mutado revelou-se dependente da concentração. Os derivados do indazole não mostraram boa afinidade para o receptor de androgénio.

A capacidade de inibição da proliferação celular das linhas celulares do cancro da próstata LAPC4, LNCaP e PC-3 foi também estudada para os novos compostos sintetizados, usando ensaios baseados na redução de sais de formazana. Ambos os grupos de novos compostos sintetizados foram particularmente interessantes do ponto de vista de inibição da proliferação das células PC-3, que não expressam o receptor de androgénio e representam um modelo de estudo do cancro da próstata avançado.



## ABSTRACT

Prostate cancer is a multifactorial disease with worldwide impact. Both the rise in the life expectancy of the general population and the growing public awareness and use of the screening methods available for the disease, particularly PSA, have greatly contributed to changing the typical prostate cancer patient's profile from that of 50 years ago. Prostate cancer was usually diagnosed only at an advanced stage due to metastatic disease and the diagnosis was seen as a death sentence in 1-2 years. Nowadays, the disease can be diagnosed in its early stages and it is potentially curable by surgical or radiological approaches. Prostate cancer management and treatment options are currently considered in face of the stage of the disease, the patient's life expectancy, the adverse effects' profile of the available therapeutic options and patient preference. Hormonal treatments for prostate cancer therapy are based on the Nobel Prize winner discovery by Huggins *et al.*, in 1941, that the growth and progression of prostate cancer cells depends on androgen levels in the body.

CYP17 is one of the enzymes involved in androgen biosynthesis in the human body. Its inhibition has traditionally been recognized as an important strategy for prostate cancer treatment as a way to lower androgen levels and thus stop disease progression. Cetoconazole, a non steroidal antifungal compound which was reported to cause gynecomastia in male patients, was the first to be used clinically for prostate cancer treatment. After cetoconazole, a series of compounds, both steroidal and non steroidal, have been synthesized and evaluated as CYP17 inhibitors in the hope of finding more potent molecules with a better side effects' profile.

The aim of the present work was to synthesize new steroidal compounds bearing the androstane backbone, which correlated well with the known structure-activity dispositions currently accepted for CYP17 inhibitors, and would thus contribute to prostate cancer treatment. Two different synthetic strategies have been exploited which resulted in the preparation of two sets of compounds

generally designated as indazole derivatives and C17 2'-methylimidazole derived carbamates. The structural elucidation of these novel compounds was performed based on IR, mass spectrometry and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR 1D and 2D techniques.

The synthesized indazole derivatives, alike other steroidal compounds which have been found to be good CYP17 inhibitors, possess not only an heterocyclic moiety with available electrons capable of coordination with the heme Fe of the enzyme, but also a C16 double bond. In the synthesized C17 2'-methylimidazole derived carbamates, the carbamate function acts as a spacer group, increasing the distance between the heterocyclic moiety and C17. Only two of the synthesized C17 2'-methylimidazole derived carbamates inhibited the human CYP17 enzyme, however less potently than ketoconazole. The indazole derivatives were found to be non-inhibitory. Possible reasons for this occurrence have been presented.

Blockage of androgen receptor function is also a fundamental strategy for prostate cancer treatment because disease progression is intimately related to it. Both the rise in the number of available receptors and the presence of mutated receptors have been reported as important for the development of resistance to very low androgen levels in the body, thus making the previously mentioned therapeutic strategies ineffective. The fact that compounds which were designed as CYP17 inhibitors have been reported to antagonize the androgen receptor and inhibit androgen receptor mediated transcription, has opened a new chapter in the pre-clinical assessment of this type of compounds. In the face of this new context, the affinity of the indazole derivatives and the C17 2'-methylimidazole derived carbamates, towards both the original and the mutated the androgen receptor, using metastatic prostate cancer cell lines such as LAPC4 and LNCaP, was also studied. The effect of these novel compounds on mutated androgen receptor mediated transcription (on LNCaP cells), both in the presence and absence of the natural ligand dihydrotestosterone, was evaluated using the luciferase reporter assay. In general, the C17 2'-methylimidazole derived carbamates bound to the androgen receptor with excellent affinity. Their effect on mutated androgen receptor mediated transcription was found to be concentration dependent. The indazole derivatives did not display good affinity towards the androgen receptor.

The ability to inhibit prostate cancer cell line proliferation (LAPC4, LNCaP and PC-3 cells) was studied for the new synthesized compounds based on the reduction of formazan salts. Both groups of compounds were particularly effective in inhibiting the proliferation of PC-3 cells which do not express the androgen receptor, and thus represent a model of study for the more advanced stages of prostate cancer.



## ABREVIATURAS

AA	=	Aminoácido
AARA	=	do inglês “ <i>Acetic Acid Releasing Assay</i> ”
Ac	=	Acetilo
ACTH	=	Hormona Adrenocorticotrópica ou Corticotrofina
AD	=	Androstenodiona
AJCC	=	do inglês “ <i>American Joint Committee on Cancer</i> ”
AMP	=	Adenosina Monofosfato
ANOVA	=	Análise de Variância Simples
AR	=	Receptor de Androgénio
ARR	=	do inglês “ <i>Androgen Response Region</i> ”
brs	=	do inglês “ <i>broad singulet</i> ”
CAT	=	Acetiltransferase do Cloranfenicol
CBMI	=	1,1'-Carbonilbis(2-metilimidazole)
CDI	=	1,1'-Carbonildiimidazole
cDNA	=	DNA Complementar
cit. b <sub>5</sub>	=	Citocromo b <sub>5</sub>
COSY	=	do inglês “ <i>Correlation Spectroscopy</i> ”
CP	=	Cancro da Próstata
Cpm	=	do inglês “ <i>Counts per minute</i> ”
CRH	=	Hormona Libertadora da Corticotrofina
CYP17	=	Citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase-C <sub>17,20</sub> -liase
CYP19	=	Citocromo P450 aromatase
CYP <sub>EryF</sub>	=	Citocromo P450 da <i>Saccharopolyspora erythrea</i>
DEPT	=	do inglês “ <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> ”



DES	=	Dietilstilbestrol
DHEA	=	Desidroepiandrosterona
DHT	=	Di-hidrotestosterona
DMAP	=	4-Dimetilaminopiridina
DMF	=	Dimetilformamida
DMSO	=	Dimetilsulfóxido
DNA	=	Ácido Desoxirribonucleico
dppe	=	Difenilfosfinaetano
dppp	=	Difenilfosfinapropano
EA	=	Análise Elemental
EC <sub>50</sub>	=	Valor intermédio entre a resposta máxima e mínima
EDTA	=	Ácido Etilenodiaminotetraacético
EI-MS	=	Espectroscopia de Massa de Impacto Electrónico
eq	=	Equivalentes
Et	=	Etilo
EtOH	=	Etanol
FBS	=	Soro Fetal Bovino
GR	=	Receptor de Glucocorticóides
HMBC	=	do inglês “ <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> ”
HMQC	=	do inglês “ <i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence</i> ”
HMRS	=	Espectroscopia de Massa de Alta Resolução
HPLC	=	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
3β-HSD	=	3β-Hidroxiesteróide desidrogenase
17β-HSD	=	17β-Hidroxiesteróide desidrogenase
HSP	=	Proteínas de Choque Térmico
IC <sub>50</sub>	=	Concentração de composto que inibe a actividade enzimática em 50%

<i>i</i> -Pr	=	<i>Iso</i> -Propilo
IR	=	Infra-vermelho
K <sub>i</sub>	=	Constante de dissociação do complexo enzima-inibidor
K <sub>m</sub>	=	Constante de Michaelis-Menten
LH	=	Hormona Luteinizante
LHRH	=	Hormona Libertadora da Hormona Luteinizante
liase	=	Actividade C <sub>17,20</sub> -liase
m	=	Multiplete
MAB	=	Bloqueio Androgénico Máximo
MCS	=	do inglês “ <i>Multiple Cloning Site</i> ”
MeOH	=	Metanol
mRNA	=	RNA Mensageiro
MTT	=	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	=	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADPH	=	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NCCN	=	do inglês “ <i>National Comprehensive Cancer Network</i> ”
ND	=	Não Determinado
NMP	=	<i>N</i> -Metil-2-pirrolidona
NMR	=	Ressonância Magnética Nuclear
NOESY	=	do inglês “ <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> ”
OHase	=	Actividade 17 $\alpha$ -hidroxilase
OMS	=	Organização Mundial da Saúde
ORTEP	=	do inglês “ <i>Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program</i> ”
P450 <sub>BM-3</sub>	=	Citocromo P450 do <i>Bacillus megaterium</i>
P450 <sub>cam</sub>	=	Citocromo P450 da <i>Pseudomonas putida</i>
PCPT	=	do inglês “ <i>Prostate Cancer Prevention Trial</i> ”
P/E	=	Penicilina/Estreptomicina
P. f.	=	Ponto de Fusão

Ph	=	Fenilo
POR	=	Peroxidoreductase
PPh	=	Fenilfosfina
PPi	=	Fosfato
PR	=	Receptor de Progesterona
PSA	=	Antigénio Específico da Próstata
P450 <sub>scc</sub>	=	Colesterol Desmolase
Rf	=	Factor de Retenção
RLU	=	do inglês “ <i>Relative Light Units</i> ”
RNA	=	Ácido Ribonucleico
RP	=	Potência Relativa
s	=	Singuleto
SDS	=	Dodecilsulfato de Sódio
SEM	=	Erro Padrão da Média
Ser	=	Serina
SHBG	=	do inglês “ <i>Steroid Hormone Binding Globulin</i> ”
SNC	=	Sistema Nervoso Central
$SN_i$	=	Substituição Nucleofílica Intramolecular
SNP	=	Polimorfismo Nucleotídico Simples
TBDMSCI	=	Cloreto de <i>t</i> -Butildimetilsililo
THF	=	Tetra-hidrofurano
Thr	=	Treonina
TLC	=	Cromatografia em Camada Fina
TMSCI	=	Cloreto de Trimetilsililo
TNM	=	Tumor, Nódulos, Metástases
UV	=	Ultra-violeta
XTT	=	2,3-Bis(2-metoxi-4-nitro-5-benzenossulfonato) de tetrazólio-5-carboxanilida e sódio

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Números estimados de novos casos de cancro e de mortes devidas a cancro, para o homem, nos EUA, em 2007.	3
Figura 2	Taxa de mortalidade por CP em 50 países em 2002.	4
Figura 3	Taxas de incidência e de mortalidade por tipo de cancro, no homem, em Portugal, em 2002.	5
Figura 4	Probabilidade de desenvolvimento de CP no homem, em função da idade.	6
Figura 5	Taxas de incidência e de mortalidade por CP, por comunidade.	7
Figura 6	Regulação da biossíntese de androgénios no organismo.	10
Figura 7	Biossíntese dos androgénios.	11
Figura 8	Ação dos androgénios no AR (1); Mecanismos de resistência no CP (2).	12
Figura 9	Etapas da progressão do CP e principais intervenções terapêuticas.	17
Figura 10	Actividade da CYP17.	21
Figura 11	Grupo prostético dos citocromos P450 onde se inclui a CYP17.	22
Figura 12	Características geralmente aceites para que um composto seja um bom inibidor da CYP17.	27
Figura 13	Cetoconazol.	30
Figura 14	Antifúngicos não esteróides derivados do imidazole.	32
Figura 15	Inibidores não esteróides derivados do imidazole.	33
Figura 16	Inibidores não esteróides derivados do imidazole.	38
Figura 17	Inibidores não esteróides derivados da piridina.	40
Figura 18	Outros inibidores não esteróides.	45
Figura 19	Inibidores esteróides derivados do androstano.	48

Figura 20	Mecanismo de acção do composto <b>121</b> .	50
Figura 21	Inibidores esteróides derivados do androstano.	55
Figura 22	Inibidores esteróides derivados do androstano.	56
Figura 23	Inibidores esteróides derivados do pregnano.	60
Figura 24	Outros inibidores esteróides.	63
Figura 25	Preparação do reagente de Vilsmeier a partir da DMF e do $\text{POCl}_3$ .	100
Figura 26	Mecanismo proposto para a reacção do reagente de Vilsmeier com cetonas.	101
Figura 27	Reacção de Vilsmeier em cetonas esteróides saturadas.	102
Figura 28	Reacção de Vilsmeier em cetonas esteróides $\alpha,\beta$ -insaturadas.	103
Figura 29	Reacção de Vilsmeier em cetonas esteróides $\alpha,\beta$ -insaturadas.	103
Figura 30	Reacção de Vilsmeier em cetonas esteróides $\alpha,\beta$ -insaturadas.	104
Figura 31	Primeira etapa de síntese dos derivados do indazole.	104
Figura 32	Activação dos haletos de vinilo por grupos electroactivos.	105
Figura 33	Substituição nucleofílica vinílica (adição-eliminação).	105
Figura 34	Estereoquímica da substituição nucleofílica-vinílica (adição-eliminação).	106
Figura 35	$\alpha,\beta$ -Eliminação-adição.	108
Figura 36	Segunda etapa de síntese dos derivados do indazole.	109
Figura 37	Mecanismo de descarbonilação com o catalisador de Wilkinson.	110
Figura 38	Terceira etapa de síntese dos derivados do indazole.	111
Figura 39	Quarta etapa de síntese dos derivados do indazole.	112
Figura 40	Reacção de Oppenauer.	113
Figura 41	Quinta etapa de síntese dos derivados do indazole.	114
Figura 42	Reacção do reagente de Vilsmeier com o composto <b>186</b> .	115
Figura 43	Síntese dos compostos <b>191-196</b> .	117

Figura 44	Espectro de $^1\text{H}$ NMR do composto <b>189</b> .	118
Figura 45	Espectro de $^{13}\text{C}$ NMR do composto <b>189</b> .	119
Figura 46	Pormenor da zona aromática do composto <b>189</b> no espectro de COSY.	120
Figura 47	Pormenor da zona aromática do composto <b>189</b> no espectro de HMQC.	121
Figura 48	Pormenor da zona aromática do espectro de $^1\text{H}$ NMR do composto <b>190</b> .	125
Figura 49	Pormenor da zona aromática do espectro de HMQC do composto <b>190</b> .	125
Figura 50	Perspectiva ORTEP da estrutura molecular do composto <b>192</b> obtida por difracção de raios-X.	130
Figura 51	Perspectiva ORTEP da estrutura molecular do composto <b>195</b> obtida por difracção de raios-X.	130
Figura 52	Mecanismo da reacção de $17\beta$ -hidroxiesteróides com o CBMI.	133
Figura 53	Síntese dos compostos <b>209</b> , <b>211</b> e <b>215</b> .	137
Figura 54	Espectro IR do composto <b>211</b> .	138
Figura 55	Espectro de $^1\text{H}$ NMR do composto <b>202</b> .	139
Figura 56	Espectro de $^{13}\text{C}$ NMR do composto <b>202</b> .	140
Figura 57	DEPT 135 do composto <b>202</b> .	140
Figura 58	Pormenor do espectro de $^1\text{H}$ NMR do composto <b>206</b> .	143
Figura 59	Pormenor do espectro de $^1\text{H}$ NMR do composto <b>207</b> .	143
Figura 60	Pormenor do espectro de HMBC do composto <b>207</b> .	144
Figura 61	Pormenor do espectro de $^1\text{H}$ NMR do composto <b>203</b> .	145
Figura 62	Perspectiva ORTEP da estrutura molecular do composto <b>204</b> obtida por difracção de raios-X.	146

Figura 63	Perspectiva ORTEP da estrutura molecular do composto <b>205</b> obtida por difracção de raios-X.	146
Figura 64	Reacção fundamental do AARA.	159
Figura 65	Efeitos dos compostos <b>191-193</b> na inibição da CYP17 em células 293T.	161
Figura 66	Efeitos dos compostos <b>194-196</b> na inibição da CYP17 em células 293T.	162
Figura 67	Curvas de IC <sub>50</sub> para os compostos <b>206</b> e <b>215</b> (células 293T-CYP17).	163
Figura 68	Determinação da ligação específica e não específica no ensaio de ligação ao AR.	165
Figura 69	Determinação da ligação não específica no ensaio de ligação ao AR.	166
Figura 70	Ligação ao AR, ensaio de competição entre o composto e o radioligando.	167
Figura 71	Curvas de EC <sub>50</sub> para os compostos <b>193</b> e <b>196</b> (células LAPC4).	168
Figura 72	Ligação dos compostos <b>191-196</b> ao AR das células LNCaP.	169
Figura 73	Curvas de EC <sub>50</sub> para os compostos <b>202-204</b> (células LAPC4).	171
Figura 74	Curvas de EC <sub>50</sub> para os compostos <b>205-207</b> (células LAPC4).	172
Figura 75	Curvas de EC <sub>50</sub> para os compostos <b>209</b> e <b>215</b> (células LAPC4).	173
Figura 76	Curvas de EC <sub>50</sub> para os compostos <b>202</b> , <b>204</b> e <b>205</b> (células LNCaP).	174
Figura 77	Curvas de EC <sub>50</sub> para os compostos <b>206</b> , <b>207</b> e <b>215</b> (células LNCaP).	175
Figura 78	Reacção de bioluminescência catalisada pela luciferase.	178
Figura 79	Fundamento do ensaio da luciferase.	180

Figura 80	Efeito do composto <b>202</b> na transcrição mediada pelo AR nas células LNCaP.	181
Figura 81	Efeito do composto <b>207</b> na transcrição mediada pelo AR nas células LNCaP.	182
Figura 82	Reacções de redução do MTT e do XTT pelas células viáveis.	184
Figura 83	Efeito dos compostos <b>191, 192, 194 e 195</b> na proliferação das células LAPC4.	187
Figura 84	Efeito dos compostos <b>193 e 196</b> na proliferação das células LAPC4.	188
Figura 85	Efeito dos compostos <b>191, 192, 194 e 195</b> na proliferação das células LNCaP.	189
Figura 86	Efeito dos compostos <b>193 e 196</b> na proliferação das células LNCaP.	190
Figura 87	Curva de EC <sub>50</sub> para os compostos <b>194 e 195</b> (células PC-3).	191
Figura 88	Curva de EC <sub>50</sub> para o composto <b>196</b> (células PC-3).	192
Figura 89	Curvas de EC <sub>50</sub> para os compostos <b>203 e 207</b> (células PC-3).	194
Figura 90	Efeito dos compostos <b>202, 204, 206 e 209</b> na proliferação das células PC-3.	195
Figura 91	Efeito dos compostos <b>205, 211, e 215</b> na proliferação das células PC-3.	196



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Métodos usados na detecção, diagnóstico e estadiamento do CP.	15
Tabela 2	Inibição da CYP17 e da 11 $\beta$ -hidroxilase pelos isómeros do cetoconazol <b>11</b> .	31
Tabela 3	Inibição da CYP17 testicular de rato por diversos antifúngicos.	32
Tabela 4	Valores de IC <sub>50</sub> e RP para inibidores não esteróides derivados do imidazole.	35
Tabela 5	Valores de IC <sub>50</sub> e RP para inibidores não esteróides derivados da piridina.	41
Tabela 6	Valores de IC <sub>50</sub> e RP para outros inibidores não esteróides.	46
Tabela 7	Inibição da CYP17 por derivados do androstano.	49
Tabela 8	Valores de IC <sub>50</sub> e RP para derivados do androstano.	53
Tabela 9	Valores de IC <sub>50</sub> e RP para derivados do pregnano.	61
Tabela 10	Inibição da CYP17 de macaco por derivados pregnano.	62
Tabela 11	Principais correlações de HMBC para o composto <b>189</b> .	123
Tabela 12	Principais correlações de HMBC para o composto <b>190</b> .	126
Tabela 13	Principais correlações de HMBC para o composto <b>196</b> .	128
Tabela 14	Reacção de 17 $\beta$ -hidroxiesteróides com o CBMI.	135
Tabela 15	Principais correlações de HMBC para o composto <b>202</b> .	141
Tabela 16	Resumo dos resultados de avaliação biológica dos compostos sintetizados.	198

## PLANO GERAL DA TESE

A presente dissertação é composta por quatro capítulos. O primeiro é uma introdução geral ao tema do cancro da próstata, onde se podem encontrar os conceitos fundamentais para a compreensão do trabalho experimental subsequentemente descrito. Neste capítulo é feito o enquadramento do cancro da próstata enquanto doença e seu impacto a nível mundial, é abordada a importância fundamental dos androgénios para o desenvolvimento e progressão da doença, são apresentadas as opções terapêuticas actualmente disponíveis para o seu tratamento e é explicado como é que nelas se insere o uso dos inibidores da CYP17. Na última parte é feita uma descrição detalhada dos inibidores da CYP17 sintetizados e avaliados ao longo das últimas 4 décadas.

No segundo capítulo são descritas as estratégias de síntese escolhidas para a preparação dos novos compostos esteróides de núcleo androstano e funcionalizados em C17. Para os derivados do indazole é feita uma breve introdução a cada uma das reacções usadas na estratégia de síntese. No caso dos C17 carbamatos derivados do 2'-metilimidazole, é dado maior destaque à reacção geral subjacente à sua preparação. São ainda apresentados, neste capítulo, aspectos seleccionados da elucidação estrutural dos compostos preparados com base nas técnicas de IR,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR 1D e 2D, espectrometria de massa e difracção de raios-X.

No terceiro capítulo são reportados os resultados da avaliação biológica dos compostos sintetizados com base em quatro tipos de testes diferentes: inibição da CYP17, ligação ao receptor de androgénios, avaliação do efeito dos compostos sobre a transcrição mediada pelo receptor de androgénio mutado e avaliação do efeito dos compostos na proliferação celular. Para cada um dos ensaios usados são descritos os fundamentos gerais necessários à sua melhor compreensão.

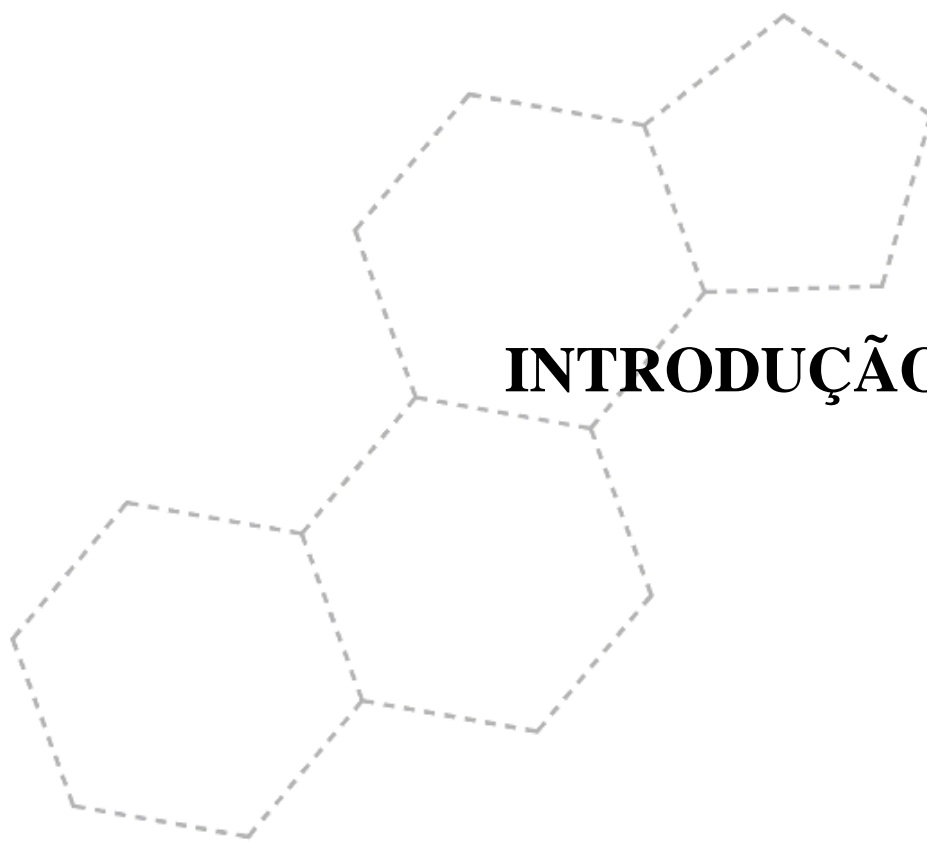
O quarto capítulo é dedicado à descrição dos procedimentos experimentais subjacentes ao presente trabalho, quer da parte da síntese química, quer da parte de avaliação biológica. No final de cada capítulo são apresentadas conclusões e referências bibliográficas relacionadas.

Para atribuição da nomenclatura dos compostos orgânicos da presente dissertação foram seguidas as recomendações gerais descritas em Fernandes, A. C.; Herold, B.; Maia, H.; Rauter, A. P.;

Rodrigues, J. A. R. *Guia IUPAC para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos*, Tradução Portuguesa nas variantes Europeia e Brasileira, Lidel: Lisboa – Porto – Coimbra, **2002**. Contudo, alguns esteróides e outros compostos de conhecimento comum foram designados de forma abreviada ou usando nomes triviais. A indexação das referências seguiu as disposições gerais do *American Chemical Society style guide*.

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

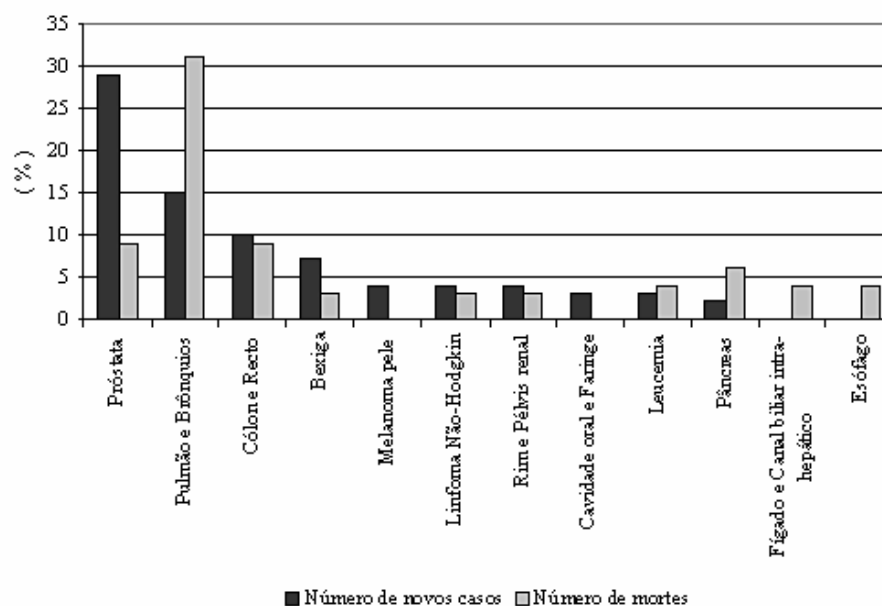


## 1. O cancro da próstata no mundo. Alguns números.

*“Apart from skin cancer, prostate cancer is one of the most common cancers in men, especially in developed countries such as the USA and Australia (most common) and European Union countries (third behind lung and colorectal cancer).”*

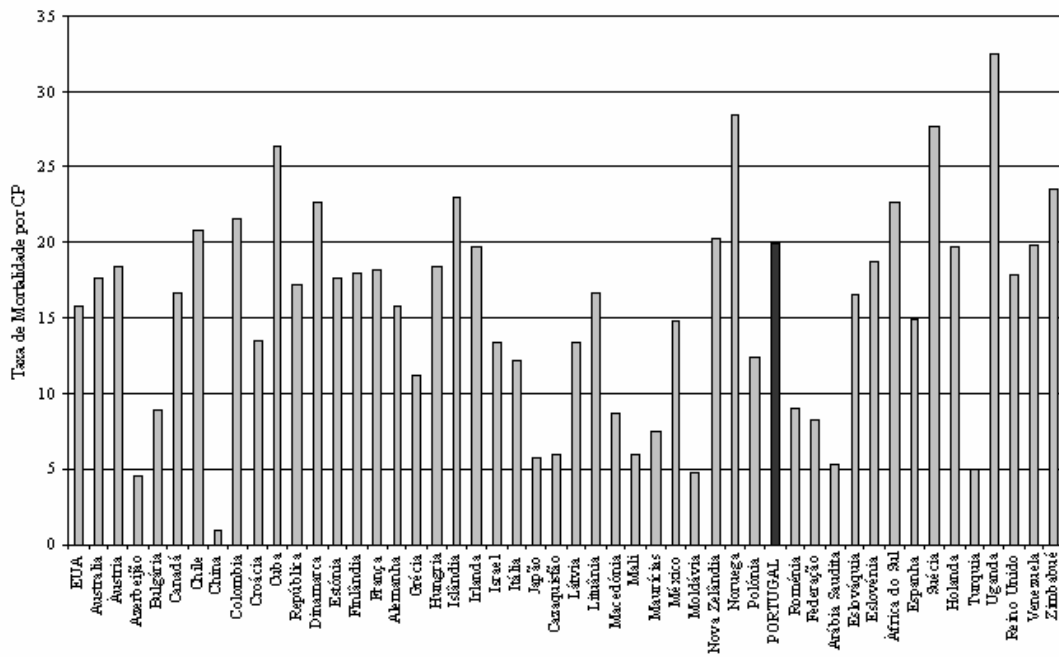
Pekmezovic, T. *et al. Eur. J. Cancer Prev.*, 2006, 15, 51-56.

O cancro da próstata (CP) é uma doença multifactorial com grande impacto a nível mundial. Não considerando o cancro da pele, é um dos tipos de cancro mais comuns no homem, em países desenvolvidos como os EUA e a Austrália (onde é o mais comum) e a União Europeia (terceiro a seguir ao cancro do pulmão e do cólon e recto) (Figura 1). Nos EUA e Austrália é a segunda causa principal de morte por cancro enquanto na Europa é a terceira (a seguir ao cancro do pulmão e cólon e recto).<sup>1-5</sup>

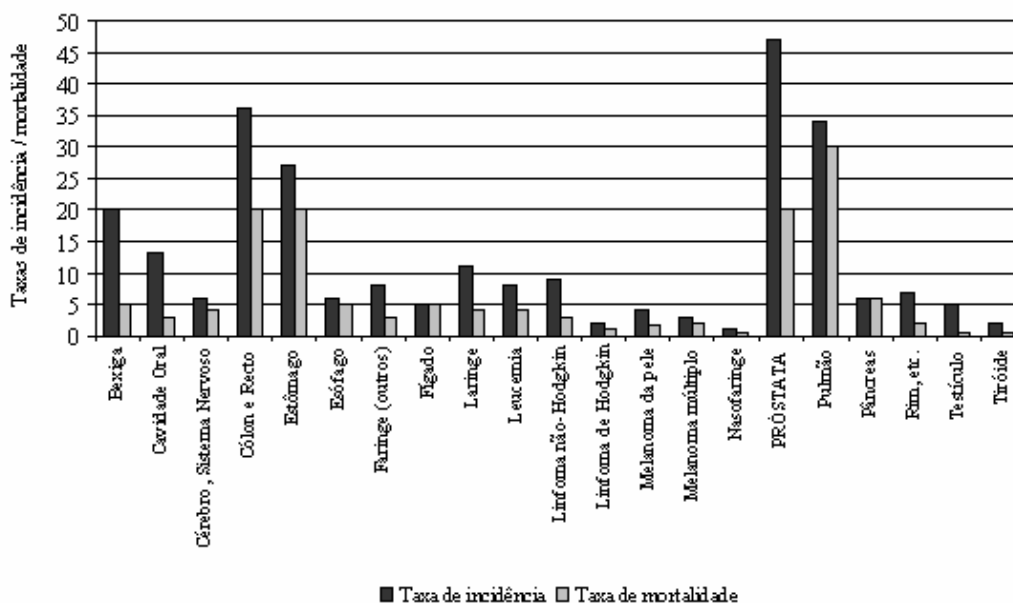


**Figura 1** – Números estimados de novos casos de cancro e de mortes devidas a cancro, para o homem, nos EUA, em 2007. A análise exclui o cancro das células basais e escamosas da pele e os carcinomas *in situ* excepto o da bexiga.

Os países da Europa com maior taxa de mortalidade por CP são os nórdicos: Suécia (27,7 por 100.000 habitantes), Noruega (28,4 por 100.000) e Dinamarca (22,6 por 100.000).<sup>2</sup> A taxa de mortalidade por CP em Portugal é de 20 por 100.000 habitantes, assumindo assim também esta doença um papel de destaque no nosso país (Figura 2).



**Figura 2** – Taxa de mortalidade por CP em 50 países em 2002. As taxas estão calculadas por cada 100.000 habitantes do país e ajustadas à idade com base na população padrão da OMS.

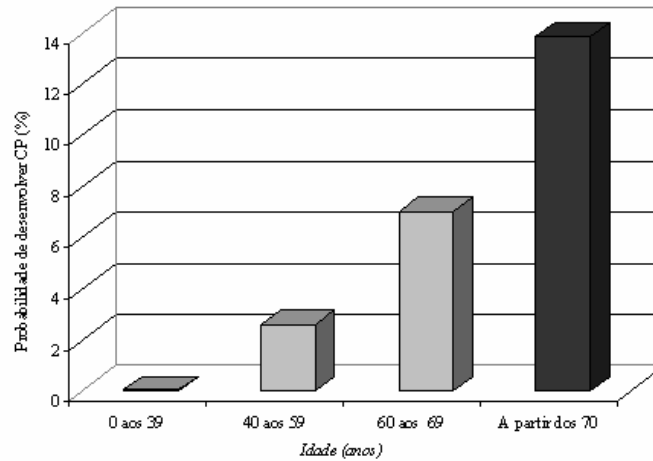


**Figura 3** – Taxas de incidência e de mortalidade por tipo de cancro, no homem, em Portugal, em 2002. As taxas estão calculadas por cada 100.000 homens e ajustadas à idade com base na população padrão da OMS.

Em Portugal, no homem, o CP é o tipo de cancro com maior taxa de incidência, de cerca de 47 por cada 100.000 homens (Figura 3).<sup>6</sup> Contudo, o cancro mais letal é o do pulmão, seguido do CP, cancro do cólon e recto e do estômago, que têm taxas de mortalidade idênticas no homem.

O CP, tal como a maior parte dos cancros, desenvolve-se como resultado de uma mistura de factores genéticos e epigenéticos ambos podendo ser afectados por factores ambientais.<sup>7</sup> Entre os factores já reconhecidos como importantes para o desenvolvimento de CP destacam-se a idade, a história familiar de CP e a etnia.<sup>7,8</sup>

A probabilidade de desenvolver CP aumenta exponencialmente com a idade, chegando a atingir 14% a partir dos 70 anos (Figura 4).



**Figura 4** – Probabilidade de desenvolvimento de CP no homem, em função da idade. Os dados apresentados são relativos aos EUA, no período de 2001 a 2003.

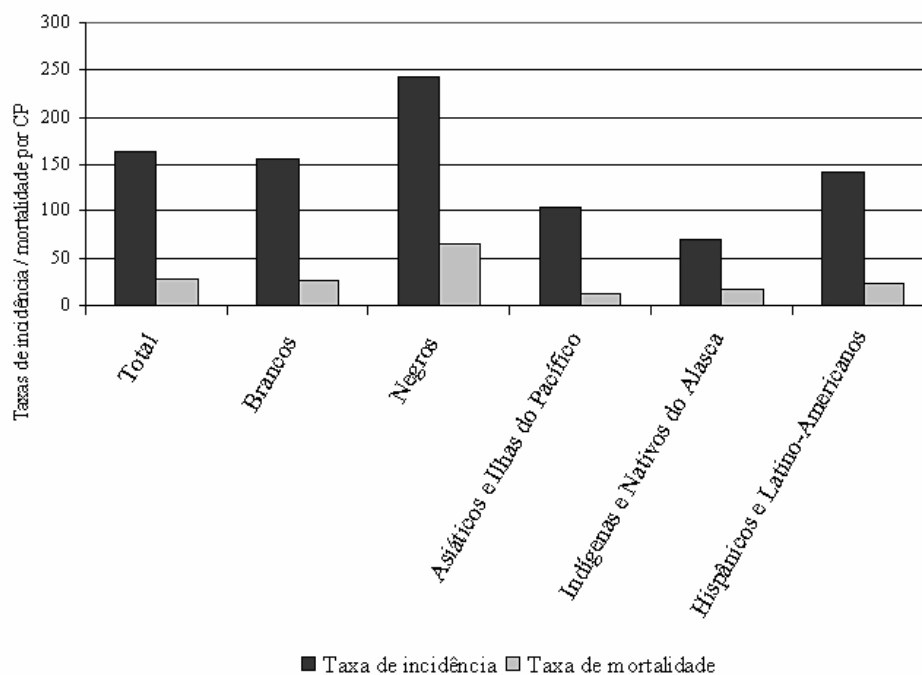
Em estudos efectuados em autópsias de doentes falecidos de toda e qualquer causa, registaram-se incidências de aumento exponencial com a idade, que atingiram cerca de 40% nos septuagenários e 67% nos octogenários.<sup>9</sup> Nem todos estes casos tiveram significado clínico durante a vida dos pacientes, de onde se depreende que parece existir um “CP latente” cuja incidência aumenta exponencialmente com a idade, mas que só se manifesta se houver um conjunto de circunstâncias adicionais, independentes da idade dos pacientes.

Considera-se que o paciente tem uma história familiar de CP quando existem pelo menos 3 familiares directos diagnosticados com CP ou 2 familiares diagnosticados com CP antes dos 55 anos de idade.<sup>7, 8</sup>

A importância da etnia no desenvolvimento de CP é facilmente visível nas taxas de incidência e de mortalidade por CP na população negra que chegam a ser o dobro das da população branca.<sup>1,2</sup> A Figura 5 representa as taxas de incidência e de mortalidade por CP, no homem, nos EUA, por



comunidade, no período de 1999 a 2003. Entre os países do mundo com maiores taxas de mortalidade devidas a CP encontram-se o Uganda (32,5 por 100.000 habitantes), o Zimbabué (23,5 por 100.000) e a África do Sul (22,6 por 100.000) (Figura 2).



**Figura 5** – Taxas de incidência e de mortalidade por CP, por comunidade. Os dados são relativos aos EUA, para o período de 1999-2003.

Em contrapartida, as menores taxas de mortalidade por CP correspondem a países orientais como a China (1 por cada 100.000) e o Japão (5,7 por cada 100.000). Verificou-se que emigrantes oriundos de zonas de baixo risco de desenvolvimento de CP para os EUA, assumem gradualmente as taxas de incidência e de mortalidade da população americana, sendo a causa provavelmente ambiental.<sup>7</sup> Entre os factores ambientais importantes no desenvolvimento de CP destacam-se a dieta rica em gorduras e a exposição a cádmio.

O papel dos polimorfismos no gene do citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase-C<sub>17,20</sub>-liase (CYP17) no CP foi também reportado, embora muitas vezes de forma inconclusiva.<sup>10, 11</sup> No caso concreto da população portuguesa, um estudo identificou que o polimorfismo nucleotídico simples (SNP) C/A-160, no promotor do gene E-caderina, é um factor de risco para o CP, podendo ser um dado adicional para a identificação precoce de indivíduos susceptíveis, facilitando assim uma intervenção atempada.<sup>12</sup>

Actualmente, a *American Cancer Society*, a *American Urological Association* e a *European Urological Association* recomendam o diagnóstico precoce anual a homens a partir dos 50 anos de idade que tenham uma expectativa de vida de pelo menos 10 anos.<sup>13, 14</sup> Homens com risco acrescido devido a história familiar de CP devem iniciar o rastreio mais cedo, por volta dos 40 anos de idade. É desejável que o paciente conheça os potenciais benefícios e limitações associados à detecção precoce da doença para que possa tomar uma decisão consciente quanto à abordagem terapêutica a escolher, conjuntamente com o médico que o orienta.

## 2. Androgénios: fisiologia vs patologia

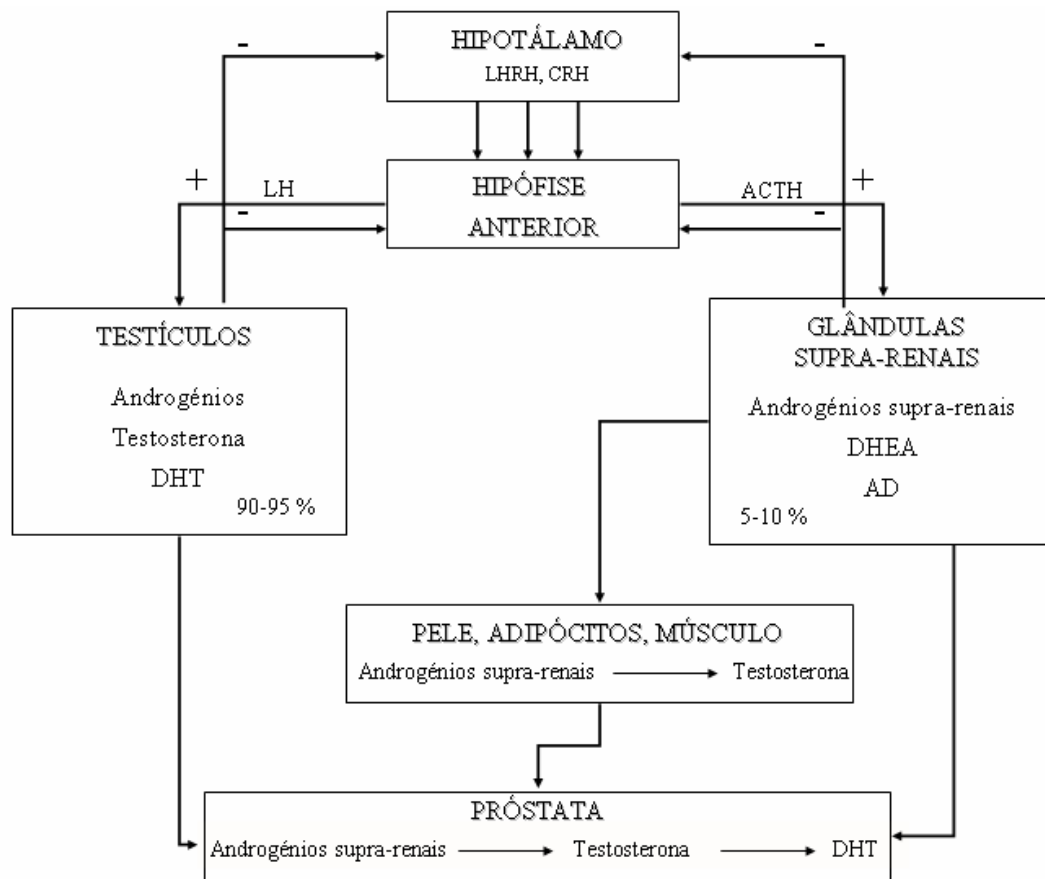
### 2.1 O papel fisiológico dos androgénios

*“Physiologically, functional androgen receptor is responsible for male sexual differentiation in utero and for male pubertal changes. In adult males, androgen is mainly responsible for maintaining libido, spermatogenesis, muscle mass and strength, bone mineral density, and erythropoiesis.”*

Gao, W. *et al. Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 3352-3370.

No homem, a biossíntese dos androgénios, testosterona **6** e di-hidrotestosterona (DHT) **7**, o seu metabolito mais potente, está dependente de um mecanismo complexo e regulável que envolve o hipotálamo, a hipófise anterior, os testículos, as glândulas supra-renais, a próstata, a pele e vários tecidos esteroideogénicos como o muscular e o adiposo (Figuras 6 e 7).

Os androgénios assim produzidos medeiam uma série de respostas fisiológicas e eventos relacionados com o desenvolvimento do homem, sendo particularmente importantes na diferenciação sexual *in utero* e na expressão das características sexuais secundárias na puberdade.<sup>15</sup> Os principais órgãos produtores de androgénios são os testículos (nas células de Leydig) e as glândulas supra-renais (*zona reticularis*). Os primeiros são responsáveis por cerca de 90-95% dos androgénios do organismo, sendo as glândulas supra-renais responsáveis pelos restantes 5-10% na forma de precursores desses androgénios, a desidroepiandrosterona (DHEA) **4** e a androstenodiona (AD) **10** (Figuras 6 e 7).<sup>16</sup> Estes precursores são depois metabolizados em tecidos esteroideogénicos e na próstata para originarem os androgénios. A hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH) hipotalâmica estimula a hipófise anterior a produzir hormona luteinizante (LH) que por sua vez actua nos testículos e estimula a síntese dos androgénios.



**Figura. 6** – Regulação da biossíntese de androgénios no organismo.

A hormona libertadora da corticotrofina (CRH) hipotalâmica induz a produção de corticotrofina (ACTH) hipofisária a qual determina a produção dos precursores dos androgénios nas glândulas supra-renais. Existem mecanismos de retrocontrolo negativo exercidos sobre o hipotálamo e sobre a hipófise nomeadamente pela testosterona 6 testicular e pelo cortisol supra-renal.<sup>17, 18</sup>

A biossíntese dos androgénios inicia-se com o colesterol 1, cuja cadeia lateral é clivada pela colesterol desmolase (P450<sub>sc</sub>) para originar a pregnenolona 2 (Figura 7). Esta, por sua vez, pode ser metabolizada pela CYP17 formando-se a DHEA 4, ou pela 3β-hidroxiesteróide desidrogenase (3β-HSD) e pela Δ<sup>4,5</sup>-isomerase originando a progesterona 8 que é depois metabolizada também pela CYP17 e forma a AD 10. Nos testículos, a DHEA 4 é convertida em testosterona 6 que é reduzida pela 5α-reductase para originar a DHT 7. Da actuação do citocromo P450 aromatase (CYP19) sobre a AD 10 e a testosterona 6 resultam os estrogénios (estrona e estradiol).<sup>17, 18</sup>

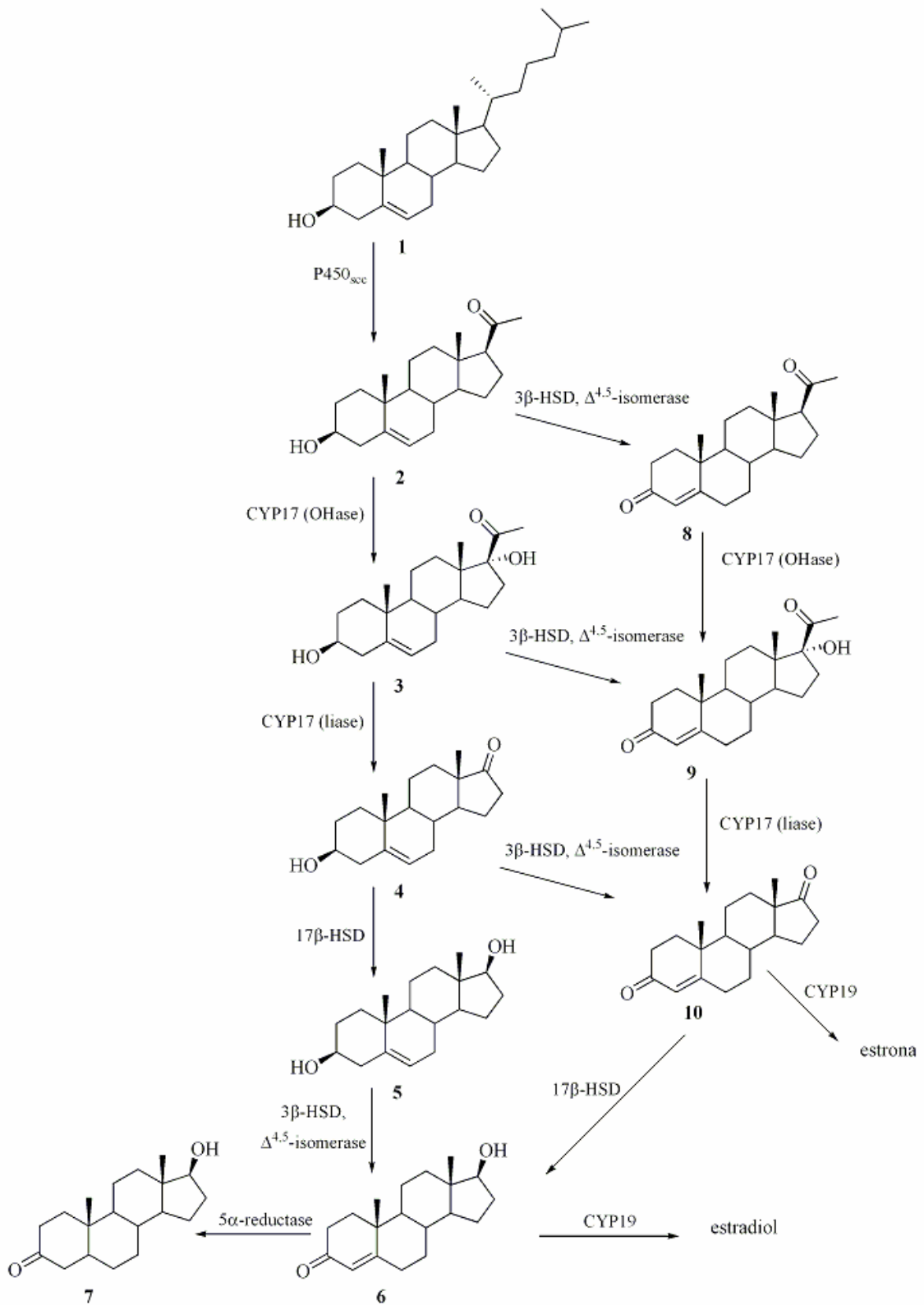
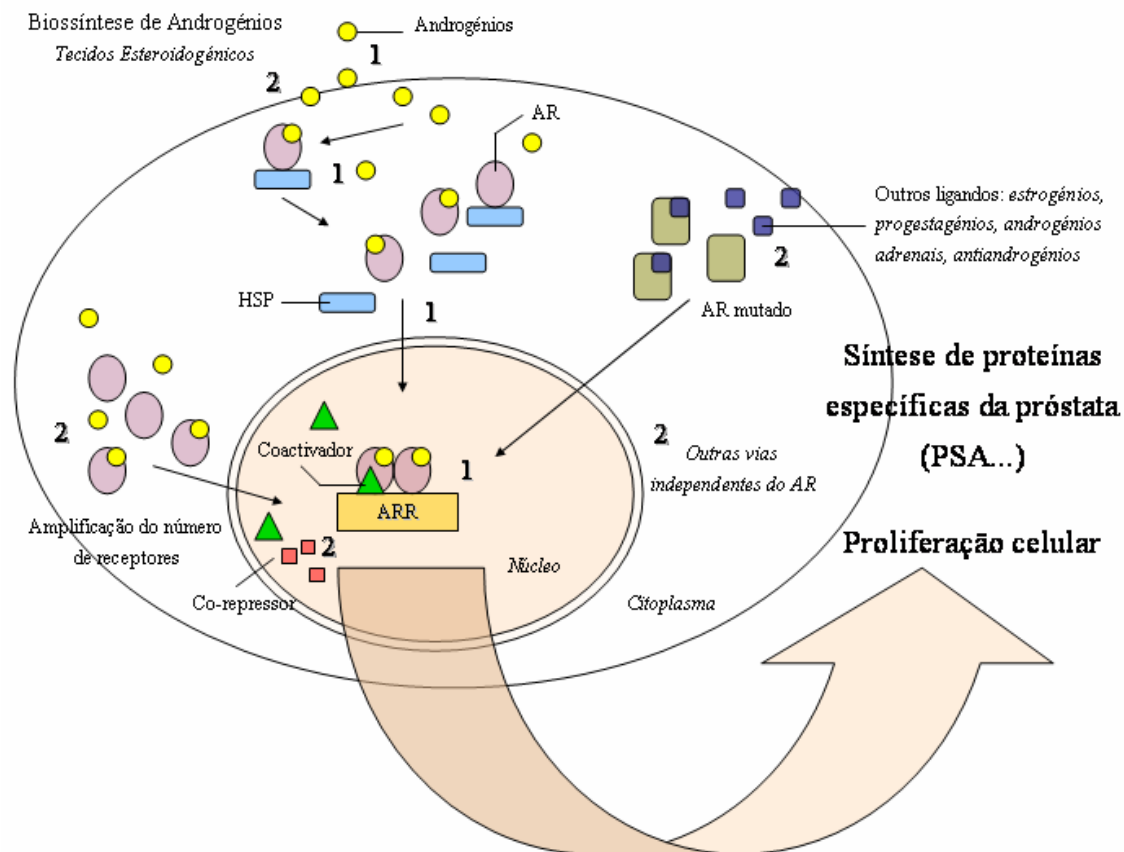


Figura 7 – Biossíntese dos androgénios.

Os efeitos dos androgénios resultam da ligação ao receptor de androgénio (AR), um membro da superfamília de receptores esteróides e nucleares, que funciona como um factor de transcrição dependente de um ligando, e cujos níveis de expressão mais elevados ocorrem na próstata, glândulas supra-renais e epidídimo. O AR também existe no tecido muscular esquelético, no fígado e no Sistema Nervoso Central (SNC). Os androgénios ligam-se ao AR e desencadeiam uma série de eventos que resultam na síntese de proteínas específicas como o antígeno específico da próstata (PSA) e no despoletar da proliferação celular (Figura 8, I).<sup>19, 20</sup> A ligação dos androgénios ao receptor induz a sua dissociação das proteínas de choque térmico (HSP). De seguida o AR dimeriza, é fosforilado e translocado para o núcleo onde se liga ao promotor “*Androgen Response Region*” (ARR). São recrutados cofactores<sup>21</sup> conjuntamente com outros elementos importantes para a transcrição<sup>22</sup> e ocorre assim expressão genética.



**Figura 8** – Acção dos androgénios no AR (1); Mecanismos de resistência no CP (2).

## 2.2. Os androgénios e o cancro da próstata. Biologia molecular da doença.

*“When Huggins recognized... he constructed the following syllogism: In many instances a malignant prostatic tumor is an overgrowth of adult prostatic epithelial cells. All known types of adult prostatic epithelium undergo atrophy when androgenic hormones are greatly reduced in amounts. Therefore, significant improvement should occur in the clinical condition of patients with far advanced prostatic carcinoma subjected to castration.”*

Resnick, M. I. *et al.*, *Urol. Clin. North Am.*, **1975**, 2, 141-161

Já desde 1941 que é conhecido o papel dos androgénios no desenvolvimento e progressão do CP. A descoberta foi de Huggins *et al.* e valeu-lhe o Prémio Nobel da Medicina.<sup>23, 24</sup> Pelo menos 80% dos CPs humanos respondem favoravelmente à privação de androgénios, evidenciada pelo desaparecimento de sintomas e diminuição dos níveis de PSA no sangue.<sup>19, 25</sup> As células epiteliais secretoras da próstata expressam o AR e necessitam de estimulação androgénica crónica para a sua sobrevivência e integridade funcional.<sup>26</sup> Se os níveis de androgénios baixarem além de um determinado patamar, como acontece na castração, as referidas células secretoras sofrem apoptose.

Inicialmente, o CP é considerado androgénio-dependente e é muito sensível à estimulação pelos androgénios.<sup>27</sup> À medida que progride, as células do CP tornam-se androgénio-independentes e proliferam bem em indivíduos castrados, revelando assim uma elevada capacidade adaptativa a níveis muito baixos de androgénios.<sup>27, 28</sup> Numa fase mais avançada, o crescimento das células de CP e a sua expressão de PSA (ainda que baixa) são suprimidas pelos androgénios e estrogénios. Este fenómeno está geralmente associado com um aumento do potencial invasivo e metastático das células tumorais.

Os mecanismos envolvidos na progressão da doença têm vindo a ser elucidados. A transição de um CP androgénio-dependente para a androgénio-independência ocorre tipicamente em menos de 2 anos após o início da terapêutica hormonal de primeira linha.<sup>29</sup> Foi demonstrado que a expressão de

elevados níveis de AR está associada a características clinicopatológicas agressivas dos tumores e à diminuição dos fenómenos de sobrevivência livre de recorrência no CP após prostatectomia radical.<sup>30</sup> Os tumores de pacientes que apresentam recorrência expressam quase sempre o AR e a sinalização celular dependente do AR persiste após a instituição de terapêuticas hormonais de primeira linha, embora os androgénios já não sejam necessários para a proliferação celular.<sup>26, 31-35</sup> As mutações no AR e a amplificação do número de receptores disponíveis são alguns dos fenómenos que ocorrem nas células hormonorresistentes (Figura 8, 2). As mutações do AR tornam o receptor promíscuo, conferindo-lhe a capacidade de ser activado por estrogénios, progestagénios, androgénios supra-renais ou mesmo antiandrogénios.<sup>36, 37</sup> Há um fenómeno bem caracterizado que ocorre com o antiandrogénio flutamida em que o crescimento do tumor parece ser paradoxalmente estimulado pelo composto e que se tem atribuído à presença destes receptores mutados.<sup>36</sup> Outros mecanismos que medeiam a progressão do CP incluem perturbações no balanço de coactivadores e co-repressores do AR, activação de outras vias de sinalização que são independentes do AR e aumento da conversão intracelular de androgénios supra-renais em testosterona **6** (Figura 8, 2).<sup>20, 29,</sup>

38, 39



### 3. Diagnóstico, estadiamento e tratamento do cancro da próstata

*“Dois milhões e meio de novos casos diagnosticados na Europa a cada ano, resultando em 9% dos óbitos por patologia oncológica entre os homens, obrigam ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes.”*

Monteiro, P. G. *Acta Urológica*, 2006, 23, 89-92.

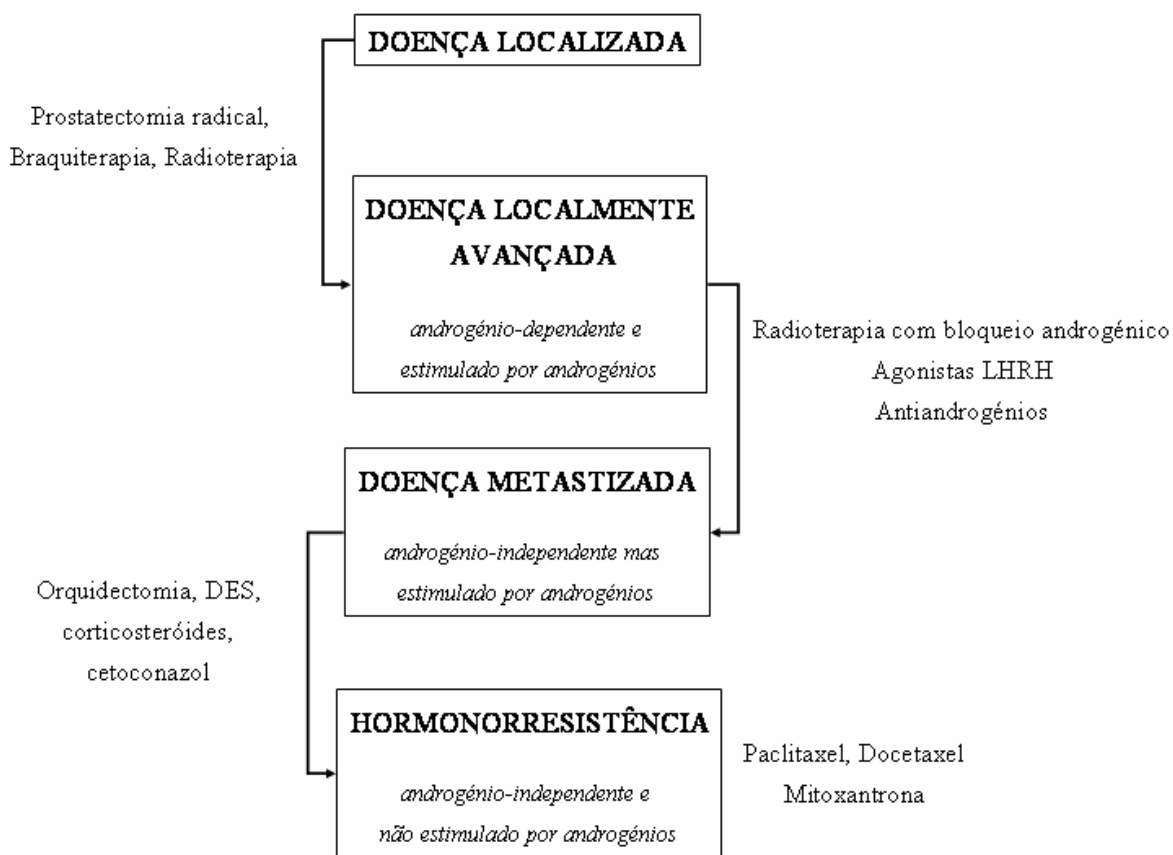
A *European Urological Association* e o *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* disponibilizam recomendações periódicas, que são continuamente actualizadas, no contexto da detecção, estadiamento, tratamento e seguimento do CP.<sup>14, 40</sup> A escolha do tratamento inicial depende da expectativa de vida estimada, co-morbilidades, potenciais efeitos adversos das terapêuticas disponíveis e preferência do paciente. Os pacientes são estratificados em categorias com diferentes probabilidades de atingir a cura. Entre os métodos mais usados para a detecção, diagnóstico e estadiamento do CP encontram-se os níveis sanguíneos de PSA, o toque rectal, o esquema de Gleason e o sistema Tumor, Nódulos, Metástases (TNM) (Tabela 1).

TESTE	DESCRIÇÃO	RESULTADO
PSA	Proteína produzida pelas células da próstata que pode ser quantificada no sangue	Os níveis de PSA aumentam no CP. Contudo, outras causas de elevação são prostatites, hiperplasia benigna da próstata ou ejaculação recente
Toque Rectal	O exame consiste em colocar um dedo no recto e sentir a superfície da próstata	Regiões duras da próstata adjacentes à parede rectal são geralmente indicativas de CP
Esquema de Gleason	Sistema de classificação do tumor baseado em observação microscópica das células do CP, após biópsia	A escala é de <b>I a 5</b> , de patologia menos para mais agressiva. A classificação atribuída tem valor prognóstico da doença
TNM	Sistema de classificação do tumor estabelecido pelo <i>AJCC</i> que avalia as características do tumor primário, a extensão de envolvimento dos nódulos linfáticos e a presença/ausência de metástases distantes, após biópsia	Considera 4 estadios ( <b>I a IV</b> ), de patologia menos para mais agressiva

**Tabela 1** – Métodos usados na detecção, diagnóstico e estadiamento do CP.

O papel do PSA na detecção precoce do CP tem sido controverso.<sup>41</sup> O aumento do seu valor não é específico do CP e há algum grau de incerteza acerca do limite a partir do qual deve ser valorizado. Foi reportado que os valores de PSA podem estar relacionados com polimorfismos no promotor do gene que o codifica,<sup>42</sup> o que seria uma agravante nesta tentativa de encontrar um valor exacto que defina a doença. Resultados recentes do “*Prostate Cancer Prevention Trial*” (PCPT) mostraram que níveis de PSA na ordem dos 0 a 4 ng/ml estavam associados a um valor preditivo positivo de apenas 6,6 a 26,9%.<sup>43</sup> A análise concluiu que não existe valor limite de PSA que tenha ao mesmo tempo elevada sensibilidade e especificidade para a detecção precoce do CP em homens saudáveis. Contudo, o valor do PSA enquanto ferramenta no contexto do CP é inegável.<sup>44</sup> Devido ao uso generalizado da medição dos níveis sanguíneos de PSA a partir de 1980, observou-se um aumento da incidência de CP, seguido de um aumento gradual da relação incidência/mortalidade. Houve também um aumento da proporção da doença confinada à próstata, numa população gradualmente mais jovem, uma redução no volume tumoral e da proporção de doença com invasão dos gânglios linfáticos e um aumento dos tumores bem ou moderadamente diferenciados.<sup>44</sup>

As diferentes etapas da progressão do CP estão representadas na Figura 9 assim como as intervenções terapêuticas mais frequentes em cada uma delas. Quando a doença está localizada na próstata, ela é potencialmente curável por intervenção cirúrgica ou por recurso a radioterapia.<sup>14, 40, 45, 46</sup> A prostatectomia radical consiste na remoção cirúrgica da próstata. A braquiterapia corresponde à implantação de sementes radioactivas na próstata. A terapêutica hormonal de primeira linha ainda não está indicada nesta situação por falta de dados consistentes que apoiem o seu uso. Outras abordagens terapêuticas menos frequentes incluem a “Vigilância Passiva” e a “Vigilância Activa”. No primeiro caso, considera-se que o paciente não irá beneficiar de um tratamento definitivo do CP, sendo prestados cuidados paliativos na doença localizada ou metastizada se e quando esta ocorrer. Esta situação está geralmente associada a pacientes com doença cancerígena de baixo risco ou com expectativa de vida muito limitada. A “Vigilância Activa” usa-se para pacientes com tumores de baixo risco e consiste em adiar a intervenção terapêutica até que se torne necessária.



**Figura 9** – Etapas da progressão do CP e principais intervenções terapêuticas.

A prostatectomia radical e a radioterapia conseguem conferir taxas de sobrevivência de cerca de 10 anos em 75% dos casos. Contudo, aproximadamente 14% dos pacientes com doença localmente avançada ou doença metastática e aproximadamente 40% de todos os pacientes apresentam recorrência após estas intervenções.<sup>47, 48</sup> Nestes casos inicia-se o bloqueio androgénico ou por castração cirúrgica (orquidectomia) ou por castração química, usando os fármacos de primeira linha onde se incluem os agonistas da LHRH (goserelina, triptorelina, leuprorelina) e os antiandrogénios esteróides (ciproterona, medroxiprogesterona, megesterol) ou não esteróides (bicalutamida, flutamida e nilutamida).<sup>14, 40, 46</sup> A combinação de um agonista LHRH com um antiandrogénio é conhecido como Bloqueio Androgénico Máximo (MAB) e foi demonstrado que tem menor benefício do que a castração cirúrgica.<sup>49</sup> Os antiandrogénios podem ser usados para

minimizar a ocorrência de rubores e suores causada pelos agonistas LHRH devido ao aumento inicial nos níveis de testosterona **6** que induzem e que é geralmente acompanhado de dor óssea e/ou obstrução do tracto urinário.<sup>50</sup> A monoterapia com antiandrogénios mostrou-se menos eficaz do que a castração cirúrgica, com a possível excepção de doentes sem metástases. Os efeitos laterais são diferentes, mas em geral menos toleráveis.<sup>51-53</sup>

Quase todos os pacientes com doença metastática que receberam terapêutica hormonal de primeira linha apresentam fenómenos de recorrência após 18 a 24 meses. Quando esta situação ocorre, o prognóstico é uma sobrevivência média de 12 a 18 meses.<sup>48, 54</sup> O objectivo da terapêutica nesta fase torna-se a palição dos sintomas do tumor e metástases de forma a melhorar a qualidade de vida do doente. Pode oferecer-se a estes doentes uma terapêutica hormonal de segunda linha para tentar protelar o tempo para iniciar a quimioterapia sistémica (paclitaxel, docetaxel, mitoxantrona).<sup>54</sup> Se os pacientes estavam a tomar antiandrogénios, costuma retirar-se o antiandrogénio visto ter sido documentado que se obtém resposta positiva (abaixamento dos níveis de PSA) nestes casos, especialmente com a flutamida.<sup>55, 56</sup> A remoção da bicalutamida, nilutamida, megestrol e dietilstilbestrol (DES) também origina resultados semelhantes. Esta resposta ocorre cerca de 2 a 4 semanas após a remoção do tratamento e é durável até cerca de 5 meses, podendo mesmo chegar a atingir os 2 anos.<sup>54</sup>

É neste contexto da doença que tem sido utilizado o inibidor da CYP17 de natureza não esteróide cetoconazol **11** (Figura 13). Apesar do seu perfil de efeitos laterais adversos, o cetoconazol **11** continua a ser o agente mais usado como terapêutica hormonal de segunda linha graças à sua eficácia e facilidade de administração.<sup>40, 54, 57-60</sup> Este composto está a ser estudado em ensaios clínicos de fase II em combinação com a lenalidomida (um agente que bloqueia o aporte de sangue ao tumor) em pacientes cujo CP não responde à terapêutica hormonal.<sup>61</sup> Também está planeado um ensaio de fase I com cetoconazol **11** e docetaxel em pacientes com CP metastático.<sup>62</sup> Recentemente foi publicado um estudo que descreve a ocorrência de elevada taxa de resposta em pacientes com CP resistente à castração usando cetoconazol **11** em combinação com um factor estimulador de

granulócitos e macrófagos.<sup>63</sup> Outro inibidor da CYP17 que merece destaque é o acetato de abiraterona **12** (Figura 19), um composto esteróide que, embora ainda não esteja a ser usado na prática clínica, já passou com sucesso os ensaios clínicos de fase I e II.<sup>64, 65</sup> O composto tem actividade contra o CP resistente à castração em pacientes a quem já foi administrado docetaxel<sup>66</sup> e tem também demonstrado bons resultados em casos de CP resistente à castração e às terapêuticas hormonais de primeira linha mais frequentes.<sup>67</sup> A descoberta de um inibidor da CYP17 de natureza esteróide (VN/124-1, **13**, Figura 22) que conjuga propriedades antiandrogénicas com a capacidade de ser mais eficaz do que a castração a inibir o crescimento do tumor androgénio-dependente no rato,<sup>68</sup> veio de certa forma redimensionar o tipo de ensaios pré-clínicos realizados nos compostos com potencial inibitório da enzima. O VN/124-1 **13** foi recentemente licenciado à Tokai Pharmaceuticals Inc., Boston, MA, EUA e espera-se que entre em ensaios clínicos brevemente.<sup>69</sup>

## 4. O citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase-C<sub>17,20</sub>-liase ou CYP17

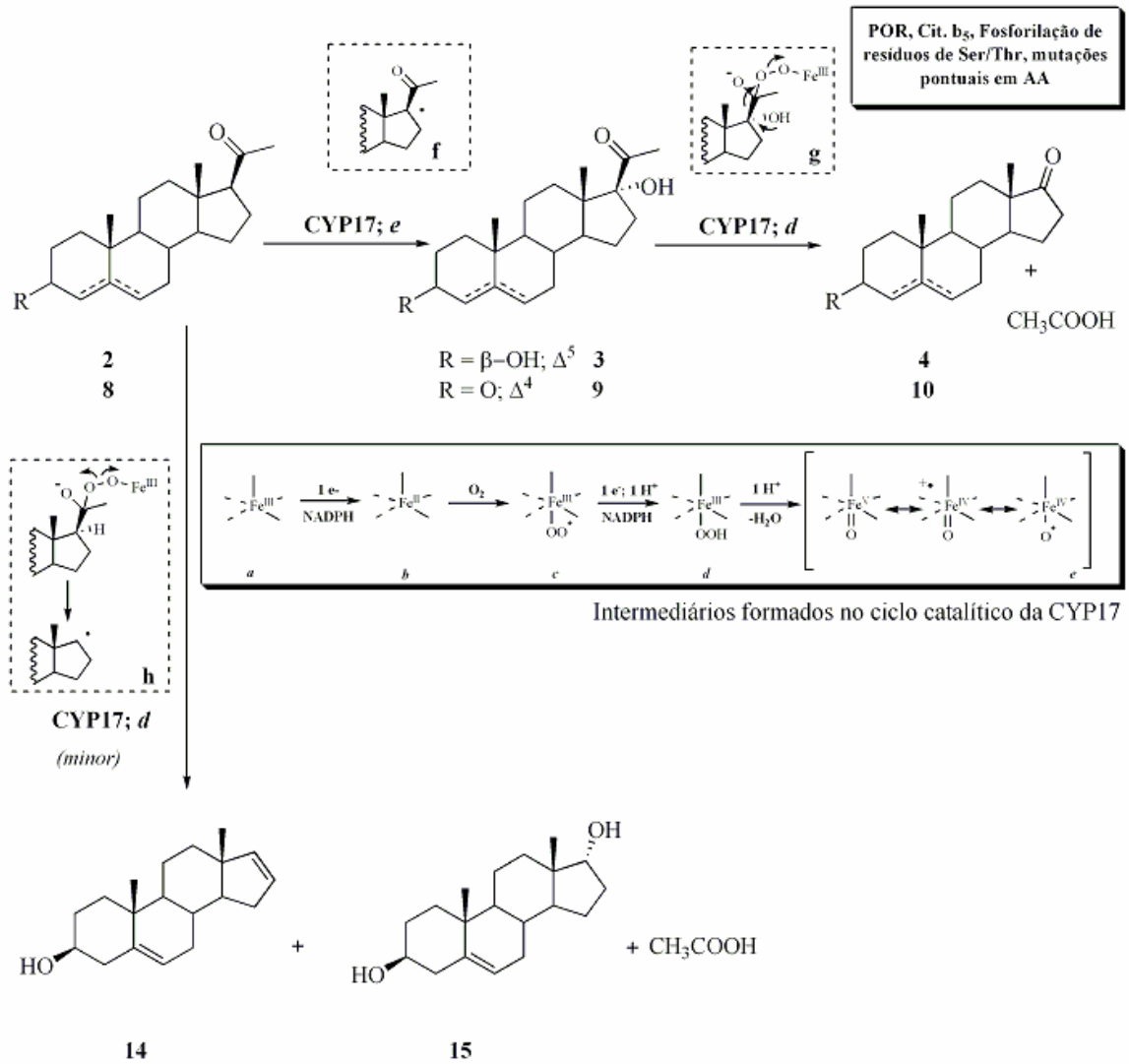
*“In human steroidogenic tissue, cytochrome P450c17, encoded by a single gene located on chromosome 10q24.3, is the sole enzyme that catalyzes both 17 $\alpha$ -hydroxylation and C<sub>17,20</sub>-lyase conversion of C<sub>21</sub> steroids to C<sub>19</sub> androgen precursors. P450c17 thus plays a key role in the biosynthesis of androgenic hormones.”*

Souter, I. *et al Fertil. Steril.* **2006**, 85, 1290-1298.

### 4.1 Actividades e mecanismo

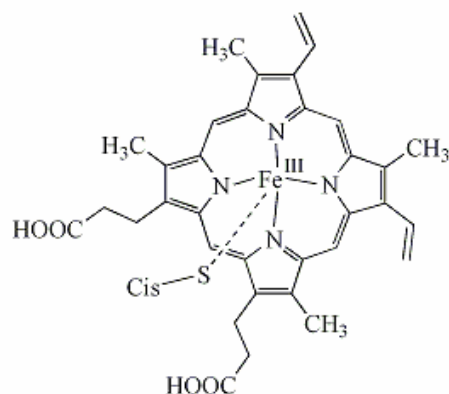
A CYP17 (EC 1.14.99.9) é uma enzima multifuncional associada à membrana do retículo endoplasmático com a dupla actividade de 17 $\alpha$ -hidroxilase e C<sub>17,20</sub>-liase, ambas cruciais para a fisiologia humana e relacionadas com um só local activo.<sup>70-75</sup> A actividade 17 $\alpha$ -hidroxilase converte a pregnenolona **2** e a progesterona **8** em derivados 17 $\alpha$ -hidroxilados (**3** e **9**) e a C<sub>17,20</sub>-liase faz a clivagem das suas cadeias laterais para originar a DHEA **4** e a AD **10**, respectivamente (Figuras 7 e 10).

A CYP17 já foi purificada a partir de órgãos esteroidogénicos como os testículos, glândulas supra-renais e ovários de vários animais incluindo o porco,<sup>70-72, 75, 76</sup> o porquinho-da-índia,<sup>77</sup> o vitelo<sup>78</sup> e o rato.<sup>79</sup> Em roedores como o rato que usam a corticosterona como o principal glucocorticóide, a CYP17 é expressa predominantemente nas gónadas estando ausente nas glândulas supra-renais.<sup>80</sup> Em outras espécies, incluindo na humana, a CYP17 existe tanto nas gónadas como nas glândulas supra-renais. Um estudo demonstrou recentemente que também existe no tecido adiposo.<sup>81</sup>



**Figura 10** – Actividade da CYP17.

Sendo um citocromo P450, a CYP17 é uma hemoproteína cujo grupo prostético é constituído por um átomo de Fe (III) inserido numa protoporfirina IX (Fe heme), ligado covalentemente à enzima pelo átomo de enxofre de um resíduo proximal de cisteína (Figura 11).<sup>82</sup>



**Figura 11** – Grupo prostético dos citocromos P450 onde se inclui a CYP17.

A CYP17 funciona como uma monooxigenase fazendo a activação e clivagem do oxigénio molecular de tal forma que apenas um dos átomos do oxigénio é introduzido no substrato, aumentando assim a sua polaridade, enquanto o segundo átomo de oxigénio é usado para originar uma molécula de água.<sup>82, 83</sup> O mecanismo proposto para cada uma das actividades da CYP17 envolve a formação de diferentes espécies reactivas de oxigénio durante o ciclo catalítico da enzima e está representado na Figura 10. Considera-se que o intermediário  $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$  (*e*) está envolvido na etapa de hidroxilação enquanto na reacção de clivagem participa a espécie  $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OOH}$  (*d*).<sup>84-88</sup>

A espécie que intervém na hidroxilação é formada a partir de um precursor  $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OO}^{\cdot}$  (*c*) que é protonado. Da heterólise da ligação O-O surge então a espécie *e*, que se comporta como um radical alcoxilo e participa na abstracção de H da ligação C-H do substrato (**2** ou **8**) para originar  $\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{OH}$  e um radical de carbono (*f*). Este radical é subsequentemente captado pela espécie  $\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{OH}$ .

O envolvimento da espécie *d* na reacção de clivagem da cadeia lateral foi inicialmente sugerida por Akhtar *et al.* com base em estudos com a CYP19 que mostraram a incorporação de um átomo de oxigénio do  $^{18}\text{O}_2$  no C19 que era subsequentemente libertado como formato.<sup>84, 89</sup> Da mesma forma, mostrou-se que um átomo de oxigénio do  $^{18}\text{O}_2$  era também incorporado no ácido acético resultante da reacção de clivagem da cadeia lateral catalisada pela CYP17.<sup>90, 91</sup> A reacção de clivagem da cadeia lateral admite vários produtos de reacção finais entre os quais o derivado 17-



ona (**4** ou **10**) ou o composto insaturado em C16 **14** e o derivado 17 $\alpha$ -hidroxilado **15**, conforme a espécie **d** ataque o substrato 17 $\alpha$ -hidroxilado (**3** ou **9**) ou o substrato original **2**, respectivamente.<sup>85</sup>  
<sup>90, 92, 93</sup> Neste mecanismo proposto, é a justaposição da espécie nucleofílica **d** e do grupo carbonilo electrofílico do substrato a responsável pela formação do intermediário (**g** ou **h**) que dirige a reacção no sentido da clivagem da cadeia lateral. A clivagem homolítica da ligação O-O subsequente permite a libertação do ião acetato.<sup>94</sup>

## 4.2 Propriedades e mecanismos de regulação da sua actividade

*“The bifunctionality of the single gene product cytochrome P450c17 might lead to the assumption that 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase activities are always linked. However, there are many situations in which the dual activities of cytochrome P450c17 appear to be dissociated.”*

Dharia, S. *et al. Biol. Reprod.* **2004**, 71, 83-88.

O estudo da CYP17 humana assim como de outros citocromos P450 de organismos eucarióticos tem sido dificultado por problemas associados com a purificação da enzima a partir das membranas onde se encontra associada e subsequente reconstituição da sua actividade *in vitro*.<sup>73</sup> Esta dificuldade é também a razão pela qual ainda não se conseguiu obter a sua estrutura 3D.<sup>82, 83</sup> Os aspectos moleculares subjacentes à sua função têm sido clarificados essencialmente por técnicas de biologia molecular que permitem a expressão de formas individuais de citocromos P450 em vectores heterólogos como as leveduras, as células COS-1, células eucarióticas infectadas com vectores virais ou bactérias como a *E. coli*.<sup>95</sup> O cDNA da CYP17 humana foi isolado a partir dos testículos<sup>96</sup> e das glândulas supra-renais<sup>97</sup> independentemente e com estrutura idêntica, conforme esperado para o produto de um gene único. A CYP17 humana é expressa a partir de um só gene localizado numa banda específica do cromossoma 10 (q24.3), nos tecidos esteroideogénicos.<sup>96, 98, 99</sup>

Esta enzima contém 508 aminoácidos e tem peso molecular de aproximadamente 57.000 Da.<sup>100, 101</sup> A CYP17 humana, bovina e de porco partilham mais de 75% de homologia na sequência primária de aminoácidos mas, apesar disso, apresentam diferenças enzimáticas importantes entre si. A CYP17 de porco,<sup>76</sup> rato<sup>102</sup> e truta<sup>103</sup> têm actividade C<sub>17,20</sub>-liase indiferenciada para a 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona **3** e a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona **9**. As enzimas humana e bovina têm actividade C<sub>17,20</sub>-liase preferencial para a 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona **3**.<sup>95, 100</sup> Têm sido usadas técnicas de modelação molecular e mutagénese para tentar elucidar melhor estas diferenças.<sup>80, 104-111</sup>

As técnicas de modelação molecular e acostagem (*docking*) têm também sido exploradas para a elaboração de modelos fidedignos do local activo da CYP17. Os primeiros modelos criados basearam-se na P450<sub>cam</sub>, uma P450 microbiana obtida a partir da *Pseudomonas putida*, que cataliza a hidroxilação estereoespecífica da ligação C5-H exo da cânfora e não está associada à membrana celular.<sup>112, 113</sup> Foi sugerido, com base neste modelos, que o local activo da CYP17 era bilobal e que ambos os lóbulos eram suficientemente grandes para substratos esteróides como a pregnenolona **2**, e que, após o primeiro passo de hidroxilação, haveria migração do derivado hidroxilado para o segundo lóbulo onde se daria a clivagem da cadeia lateral. Outros modelos apresentados basearam-se na P450<sub>BM-3</sub> (CYP102), uma monooxigenase do *Bacillus megaterium* que, tal como a CYP17 humana, usa uma peroxidoreductase (POR) como parceiro redox.<sup>114-116</sup> Os resultados obtidos foram contraditórios com os do modelo anterior porque sugeriam que não ocorria deslocação do derivado hidroxilado para outra zona do local activo da enzima, mas sim que havia apenas uma posição no local activo associada às duas actividades. Esta segunda hipótese foi posteriormente validada por estudos de mutagénese e por uma variedade de programas que avaliam estruturas proteicas.<sup>116</sup> A CYP17 da *Saccharopolyspora erythraea* (CYP<sub>EryF</sub>) também serviu de modelo para a CYP17.<sup>117</sup> O modelo revelou um só local activo, grande e essencialmente hidrofóbico, com partes hidrofílicas nas zonas mais periféricas. Usando técnicas de *docking*, demonstrou-se que para que a hidroxilação da pregnenolona **2** ocorra é necessário que esta se ligue à enzima segundo um plano quase paralelo ao do grupo heme.<sup>117</sup>

A bifuncionalidade de um gene único poderia facilmente levar à suposição de que as duas actividades da CYP17 estão sempre associadas. Existem, contudo, factores que afectam a actividade da CYP17 e que são responsáveis pela expressão individual de cada uma das suas actividades. Um bom exemplo disto ocorre nas glândulas supra-renais onde, na *zona glomerulosa*, a CYP17 está ausente e a esteroidogénese é dirigida para a produção do mineralocorticoide aldosterona. Já na *zona fasciculata*, há um predomínio da actividade  $17\alpha$ -hidroxilase e isto determina que a via preferencial seja a síntese de glucocorticóides (cortisol), enquanto na *zona reticularis* (e nas gónadas) a expressão de ambas as actividades da CYP17 é fundamental para a produção de esteróides sexuais.<sup>111</sup> O quociente efectivo de actividade  $C_{17,20}$ -liase/ $17\alpha$ -hidroxilase nas glândulas supra-renais humanas é rigorosamente controlado durante o desenvolvimento, e aumenta muito na puberdade. Nesta fase, ocorre um aumento da produção de DHEA 4 sem alteração concomitante na produção de gluco- e mineralocorticóides.<sup>111</sup>

Entre os factores estudados que condicionam a actividade  $C_{17,20}$ -liase estão a presença de transportadores electrónicos como a POR,<sup>118</sup> a fosforilação de resíduos de treonina e serina,<sup>119-122</sup> mutações pontuais em aminoácidos<sup>123-126</sup> e a proteína acessória cit. b<sub>5</sub> (Figura 10).<sup>121, 127-129</sup> Em microsomas testiculares de porco, verificou-se que a actividade  $C_{17,20}$ -liase aumentava em relação à actividade  $17\alpha$ -hidroxilase em função da presença do transportador electrónico POR.<sup>118</sup> Um efeito semelhante foi observado a partir de microsomas das glândulas supra-renais, que expressaram mais actividade  $C_{17,20}$ -liase quando POR exógena foi adicionada.<sup>75</sup> Verificou-se ainda que os microsomas testiculares expressam cerca de 3,5 vezes mais actividade reductase que os das glândulas supra-renais.<sup>75, 118</sup> De facto, a taxa de síntese de POR nos testículos e nas glândulas supra-renais tem um efeito pronunciado sobre qual das actividades é mais expressa pela CYP17.<sup>118, 130</sup> A importância da POR na regulação da actividade da CYP17 é ainda mais evidenciada pelo facto de mutações no gene da POR, que causam perturbação do seu normal funcionamento, causarem hiperplasia adrenal congénita<sup>131</sup> e perturbação da esteroidogénese com e sem síndrome de

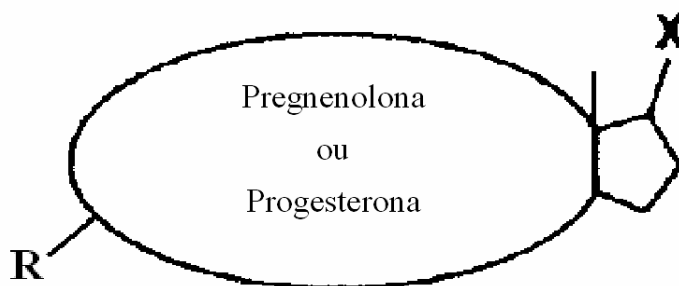
Antley-Bixler.<sup>132, 133</sup> A fosforilação de resíduos de serina regulada por hormonas foi sugerida como um possível mecanismo na puberdade humana e na síndrome do ovário policístico.<sup>119, 120, 122</sup> Foram reportadas mutações no gene da CYP17 que provocam alterações ou no local de ligação do seu parceiro redox, de forma a não ocorrer transporte electrónico,<sup>123, 125, 134, 135</sup> ou no local de ligação ao substrato,<sup>126, 135</sup> responsáveis por uma deficiência de actividade C<sub>17,20</sub>-liase. A presença de outras mutações provou ser ainda responsável por perda de resposta da CYP17 à influência do cit. b<sub>5</sub>.<sup>124, 134</sup> É necessário um quociente elevado de cit. b<sub>5</sub>/CYP17 nos testículos humanos para ocorrer produção de androgénios em oposição ao que acontece nas glândulas supra-renais, em condições fisiológicas.<sup>127, 136, 137</sup> O mecanismo pelo qual o cit. b<sub>5</sub> modula a actividade da CYP17 parece envolver modulação alostérica do complexo da CYP17 com a POR e não o transporte electrónico, como tinha também sido sugerido na literatura.<sup>128, 129, 138</sup> O cit. b<sub>5</sub> e a fosforilação da CYP17 potenciam a actividade C<sub>17,20</sub>-liase de forma independente e cada mecanismo é suficiente por si para causar uma estimulação máxima da referida actividade.<sup>121</sup>

## 5. Inibidores da CYP17

*“It is almost 70 years since the discovery by Huggins et al. that androgens are essential for prostate cancer (PC) growth and progression, and there has been about 30 years experience using ketoconazole for PC therapy. Since then we have come a long way in learning about the disease and developing new strategies to approach it, among which is cytochrome 17 $\alpha$ -hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-lyase (CYP17) inhibition... Evidence of this is provided by the fact that many inhibitors, both steroidal and nonsteroidal, are now available and have a better inhibition profile than ketoconazole, that has been traditionally accepted as a reference compound because it has been used clinically.”*

Moreira, V. M. et al. *Curr. Med. Chem.*, **2008**, em impressão.

Na ausência de estrutura 3D da CYP17, o *design* e a síntese de inibidores da enzima têm evoluído de uma combinação de tentativa-erro para estudos mais elaborados baseados em técnicas de modelação molecular<sup>139</sup> e *docking*.<sup>140</sup> Há características que já foram aceites como sendo importantes para um bom inibidor (Figura 12).



**Figura 12** – Características geralmente aceites para que um composto seja um bom inibidor da CYP17. **X** = Grupo com heteroátomo(s) capazes de coordenar o Fe heme da enzima; **R** = Grupo capaz de estabelecer pontes de H.

Estas incluem um esqueleto hidrofóbico de tamanho geral comparável ao de um esteróide, substituição com grupos electronegativos apenas nas posições externas do esqueleto hidrofóbico, um grupo contendo heteroátomos que sejam capazes de estabelecer uma coordenação estável com o Fe heme da enzima numa das posições externas e outro grupo que funcione como dador/aceitador em ligações de hidrogénio no extremo oposto.<sup>141</sup>

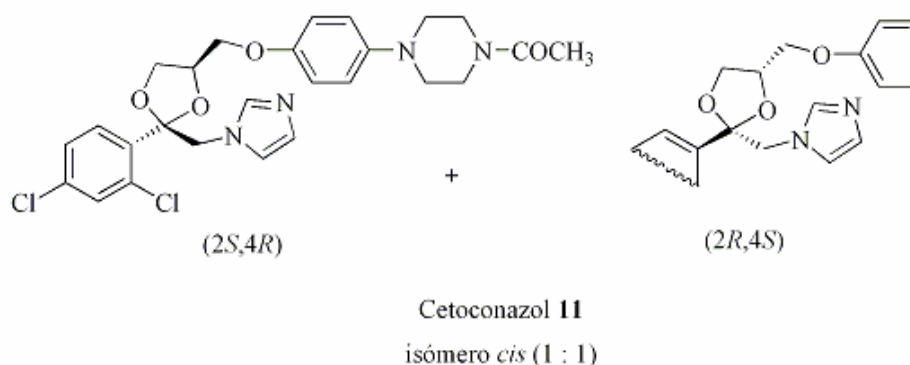
A literatura disponível acerca de inibidores da CYP17 tem sido alvo de várias revisões.<sup>142-150</sup> Contudo, ao longo das quase 4 décadas desde que foi reportada a síntese do primeiro inibidor da CYP17 que obedecia a um racional,<sup>151</sup> foram usadas técnicas diferentes nos ensaios de avaliação do potencial inibitório dos compostos sintetizados. Nestes estudos, encontram-se diferenças na origem da enzima usada, tipo de substrato escolhido, modo de cálculo da actividade enzimática, concentração de substrato, tipo de sistema heterólogo de expressão escolhido para a enzima, entre outras. Torna-se por isso muito difícil comparar resultados, o que impossibilita uma visão global do tema. Como o cetoconazol **11** tem sido utilizado como padrão interno em praticamente toda a literatura disponível acerca de inibidores da CYP17, a forma mais fácil de ultrapassar a desvantagem atrás referida é expressar os resultados em potência relativa (RP) calculada em função do cetoconazol **11**. Assim, o RP corresponde a um quociente entre o valor de inibição do cetoconazol **11** e o do composto em avaliação (geralmente apresentados na forma de IC<sub>50</sub> ou K<sub>i</sub>), nas mesmas condições de ensaio. Se o composto tiver RP maior que 1, este é mais potente do que o padrão interno visto que o seu valor de IC<sub>50</sub> é menor, ou seja, é necessária menor quantidade de composto do que de cetoconazol **11** para inibir a actividade enzimática em 50%, nas mesmas condições experimentais. No caso do valor de K<sub>i</sub> o pressuposto mantém-se visto que este representa a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor, ou seja, quanto menor o seu valor para um composto, maior é a afinidade desse composto para a enzima. O conceito de RP é generalizável a outros compostos que se pretendam usar como padrão de comparação. Na descrição que se segue, os casos particulares em que o RP não se refere ao cetoconazol **11** estão devidamente assinalados.

A avaliação prospectiva dos inibidores da CYP17 vai muito para além de um ensaio enzimático para determinação do valor de  $K_i$  ou do  $IC_{50}$ . Os compostos têm sido estudados do ponto de vista de conjugação de efeitos com interesse no contexto da doença. É frequente encontrar reportada a inibição de enzimas adicionais na cascata de biossíntese de androgénios como a  $5\alpha$ -reductase, a selectividade em relação à inibição da CYP19, a avaliação das propriedades agonistas/antagonistas para o AR mutado e não mutado, os efeitos dos compostos na transcrição por ele mediada, o efeito nos níveis séricos de testosterona **6** e peso dos órgãos androgénio-dependentes, entre outros. A classificação adoptada na descrição dos inibidores da CYP17 que se segue assume dois grandes grupos: os compostos não esteróides e os esteróides. A presença de substituintes como o imidazole ou a piridina é realçada no caso dos compostos não esteróides mas na verdade revela-se fundamental para uma boa capacidade inibitória também no caso dos compostos esteróides. Estes últimos foram agrupados de acordo com a natureza do seu esqueleto esteróide.

## 5.1 Não esteróides

### 5.1.1 Derivados do imidazole

Muito do que se sabe actualmente sobre o uso de inibidores da CYP17 na prática clínica do CP está relacionado com o cetoconazol **11** (Figura 13), um antifúngico oral que se descobriu provocar ginecomastia em pacientes do sexo masculino.<sup>152, 153</sup> A base da actividade antifúngica do cetoconazol **11** é a inibição da lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase a qual está envolvida na conversão do lanosterol em ergosterol, que por sua vez é necessário para manter a integridade da membrana celular do organismo.<sup>154</sup> Mais tarde, estudos no rato,<sup>155-158</sup> cão<sup>158</sup> e no homem<sup>153, 159, 160</sup> mostraram que o cetoconazol **11** tinha capacidade inibitória sobre a CYP17. Embora o mecanismo pelo qual o cetoconazol **11** provoca ginecomastia no homem seja desconhecido, tem sido sugerido que a supressão da produção testicular de androgénios e o deslocamento dos estrogénios da sua ligação à “*Steroid Hormone Binding Globulin*” (SHBG) causam perturbação no quociente sanguíneo de androgénios/estrogénios, satisfazendo um dos requisitos considerados essenciais para esta condição.<sup>161</sup>



**Figura 13** – Cetoconazol.



A inibição causada pelo cetoconazol **11** na CYP17 testicular e supra-renal parece estar essencialmente associada à actividade C<sub>17,20</sub>-liase.<sup>159, 162, 163</sup> Foi também reportada inibição significativa da 11 $\beta$ -hidroxilase, uma enzima importante na síntese do cortisol<sup>160, 163, 164</sup> e inibição da 5-lipoxigenase no porquinho-da-índia, após administração oral.<sup>165</sup>

O cetoconazol **11** tem sido usado na prática clínica em doses elevadas (400 mg a cada 8 horas) para o tratamento do CP avançado.<sup>163, 166-169</sup> Esta dosagem provoca efeitos gastrointestinais indesejáveis e hepatotoxicidade.<sup>167, 168, 170</sup> Um estudo recente mostrou igual benefício em usar o cetoconazol **11** numa dosagem mais baixa (200 mg, 3 vezes por dia), com redução significativa dos efeitos adversos.<sup>171</sup> O cetoconazol **11** é ainda, hoje em dia, alvo de vários estudos em combinação com outros agentes terapêuticos, essencialmente para o tratamento do CP androgénio-independente mas estimulado por baixos níveis de androgénios, conforme referido anteriormente. O cetoconazol **11** é um racemato do isómero *cis* (Figura 13).<sup>143, 172</sup> O enantiómero (2*S*,4*R*) demonstrou um potencial inibitório da CYP17 de porco 48 vezes superior ao do enantiómero (2*R*,4*S*), retendo 4 vezes maior capacidade de inibir a 11 $\beta$ -hidroxilase supra-renal bovina, não se revelando por isso vantajosa a separação dos enantiómeros (Tabela 2).<sup>154</sup> Esta diferença no potencial inibitório foi atribuída ao facto de a ligação do enantiómero (2*S*,4*R*) permitir uma melhor interacção com o local activo da enzima.<sup>173, 174</sup>

Entrada	Enantiómero	CYP17 <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	11 $\beta$ -hidroxilase <sup>b</sup> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CYP17 RP <sup>c</sup>	11 $\beta$ -hidroxilase RP <sup>c</sup>	Ref.
1	<b>2<i>S</i>,4<i>R</i></b>	0,05	0,152	48	4	154
2	<b>2<i>R</i>,4<i>S</i></b>	2,38	0,608	1	1	

**Tabela 2** - Inibição da CYP17 e da 11 $\beta$ -hidroxilase pelos isómeros do cetoconazol **11**; <sup>a</sup>CYP17 de testículos de porco; <sup>b</sup>11 $\beta$ -hidroxilase de glândulas supra-renais de boi; <sup>c</sup>RP = IC<sub>50</sub> (2*R*,4*S*) / IC<sub>50</sub> (2*S*,4*R*); Potência Relativa calculada em função do enantiómero (2*R*,4*S*).

O efeito de outros antifúngicos de estrutura semelhante ao cetoconazol **11** sobre a CYP17 também foi estudado. Os antifúngicos bifonazol **16**, clotrimazol **17**, miconazol **18**, tioconazol **19**, econazol **20** e isoconazol **21** (Figura 14) foram testados em enzima testicular de rato e revelaram-se inibidores competitivos da enzima, mas apenas com o bifonazol **16** se obteve inibição mais potente do que a conseguida com o cetoconazol **11** (Tabela 3).<sup>175</sup>

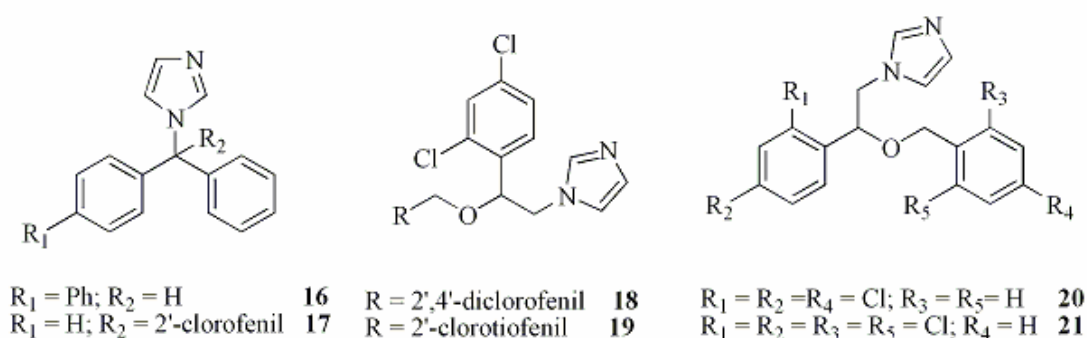


Figura 14 – Antifúngicos não esteróides derivados do imidazole.

Entrada	Composto	Inibição da CYP17		Ref.
		$K_i$ (nmol/l)	RP <sup>a</sup>	
1	<b>16</b>	OHase: 86 liase: 56,5	OHase: 1,9 liase: 1,5	175
2	<b>17</b>	OHase: 170 liase: 81,5	OHase: < 1 liase: < 1	
3	<b>18</b>	OHase: 599 liase: 243	OHase: < 1 liase: < 1	
4	<b>19</b>	OHase: 901 liase: 505	OHase: < 1 liase: < 1	
5	<b>20</b>	OHase: 668 liase: 325	OHase: < 1 liase: < 1	
6	<b>21</b>	OHase: 1090 liase: 610	OHase: < 1 liase: < 1	

Tabela 3 - Inibição da CYP17 testicular de rato por diversos antifúngicos; <sup>a</sup>RP =  $K_i$  (**11**) /  $K_i$  (inibidor).

Com os benzofuranos **22-27** (Figura 15) a inibição da CYP17 de rato foi cerca de 3 a 7 vezes mais potente do que com o cetoconazol **11** (Tabela 4, entradas 1-6).<sup>176</sup> Contudo, apenas o composto **26** inibiu a enzima humana de forma equiparável ao cetoconazol **11** (Tabela 4, entrada 5). Estes compostos também inibiram a CYP17 supra-renal bovina com valores de IC<sub>50</sub> entre 0,0015 e 0,232 μM. Os benzofuranos **28-31** inibiram a enzima bovina mas o mesmo não ocorreu para a enzima de rato, o que sugere que a presença do grupo fenilo nos compostos **22-27** foi importante para a inibição pretendida.<sup>177</sup>

Os di-hidronaftalenos **32-33** e naftalenos **34-35** (Figura 15) não inibiram a CYP17 humana.<sup>178</sup> Estudos de modelação molecular mostraram que a conformação destes compostos não era ideal para encaixe no local activo da enzima.

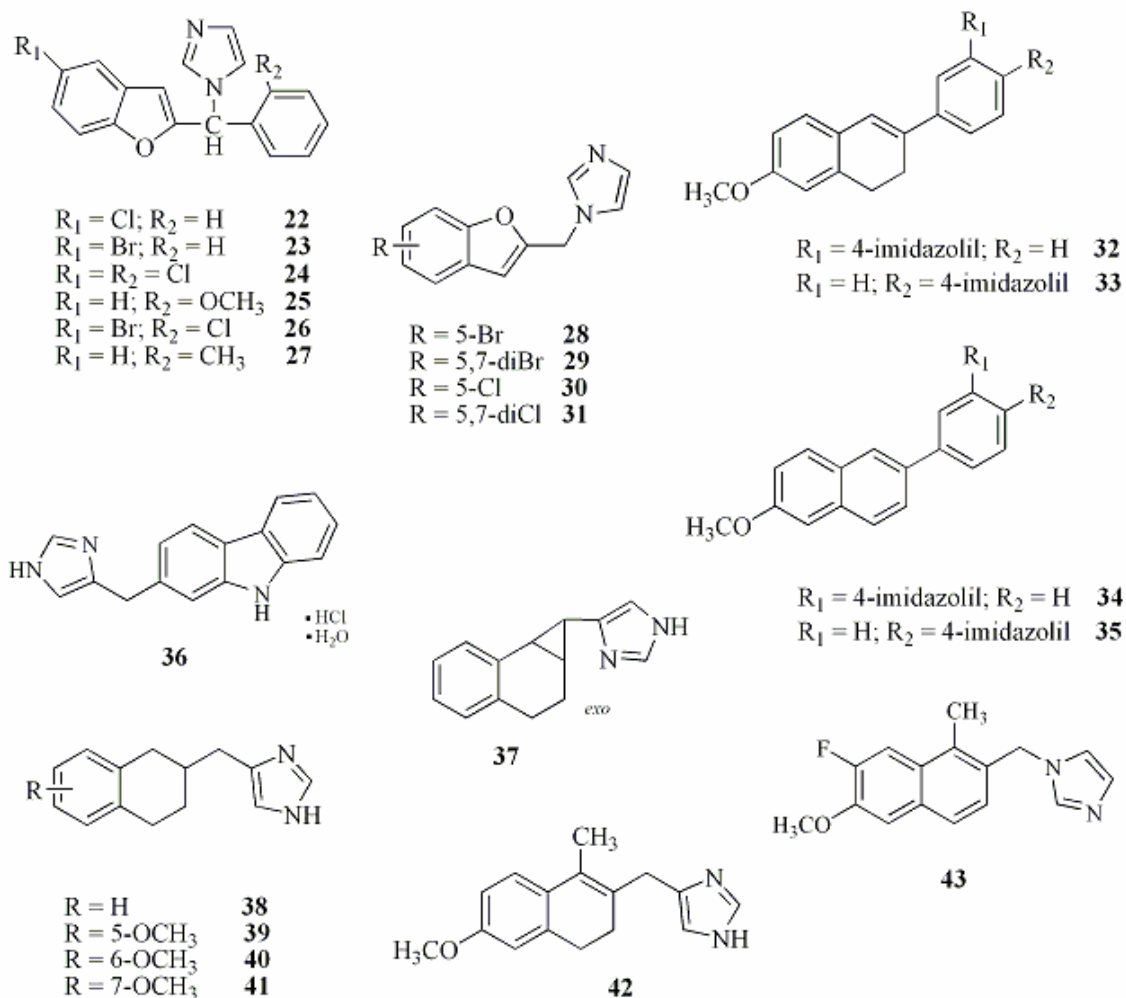


Figura 15 – Inibidores não esteróides derivados do imidazole.

O carbazole YM116 **36** (Figura 15) inibiu competitivamente a actividade C<sub>17,20</sub>-liase nos microsomas testiculares de rato, de forma dose-dependente, com um valor de IC<sub>50</sub> de 0,0054 µM.<sup>179</sup> Esta inibição foi cerca de 109 vezes mais potente do que a conseguida com o cetoconazol **11** (Tabela 4, entrada 7) e 1,5 vezes mais potente do que a conseguida com o acetato de abiraterona **12** (IC<sub>50</sub>: 0,0082 µM). A diminuição nas concentrações plasmáticas de testosterona **6** provocada pelo YM116 **36** foi cerca de 21 vezes mais potente que com cetoconazol **11** e 2 vezes mais potente que com acetato de abiraterona **12**.<sup>179</sup> O composto **36** também originou diminuição dos pesos das próstatas dos ratos de forma dose-dependente para níveis próximos dos atingidos por castração, quando administrado durante duas semanas, na dosagem de 40 mg/kg. A progressão e magnitude da redução dos pesos da próstata e das vesículas seminais foram iguais às atingidas por castração. A inibição da enzima humana foi também demonstrada para o YM116 **36**, com um valor de IC<sub>50</sub> de 0,0042 µM, sendo assim 4 vezes mais potente que o cetoconazol **11** (Tabela 4, entrada 7).<sup>180</sup> Este composto inibiu especificamente a produção supra-renal de androgénios nas células primárias adrenocorticais humanas (NCI-H295). O YM116 **36** inibiu a produção de AD **10** (IC<sub>50</sub>: 3,6 nM) de forma 15 vezes mais potente do que o cetoconazol **11** (IC<sub>50</sub>: 54,9 nM), sem provocar uma diminuição significativa da produção de cortisol, neste modelo de estudo.

Entrada	Composto	Inibição da CYP17		Ref.
		IC <sub>50</sub> (µM)	RP <sup>a</sup>	
1	22	Rato: 0,062 Humana: 0,062	Rato: 6,8 < 1	176
2	23	Rato: 0,070 ND	Rato: 6,0 ----	
3	24	Rato:0,107 Humana: 0,008	Rato: 4 < 1	
4	25	Rato: 0,118 Humana: 0,006	Rato: 3,6 < 1	
5	26	Rato: 0,130 Humana: 0,004	Rato: 3,2 Humana: 1,1	
6	27	Rato: 0,136 Humana: 0,007	Rato: 3 < 1	
7	36	Rato: 0,0054 Humana: 0,0042	Rato: 109 Humana: 4	179, 180
8	37	Rato: 13	Rato: 5	181
9	38	Rato: 5,8	Rato: 11	182
10	39	Rato: 4,2	Rato: 15	
11	40	Rato: 1,2	Rato: 54	
12	41	Rato: 4,8	Rato: 13	
13	42	Rato: 0,28 Humana: 0,11	Rato: 240 Humana: 7	183
14	43	Humana: 0,27	Humana: 2,7	184
15	44	Rato: 0,63 Humana: 0,13	Rato: 106 Humana: 5,7	185
16	45	Rato: 3,1 Humana: 0,087	Rato: 22 Humana: 8,5	
17	47	Rato: 0,98 Humana: 0,96	Rato: 68 Humana: 0,8	
18	48	Humana: 0,37	----	186
19	49	Humana: 0,96	----	
20	50	Rato: 1,2 Humana: 0,17	Rato: 56 Humana: 4,4	188
21	51	Rato: 0,54 Humana: 0,24	Rato: 124 Humana: 3,1	
22	52	Rato: 2,1 Humana: 0,25	Rato: 32 Humana: 3	

**Tabela 4** - Valores de IC<sub>50</sub> e RP para inibidores não esteróides derivados do imidazole;

<sup>a</sup>RP = IC<sub>50</sub> (11) / IC<sub>50</sub> (inibidor).

(cont.)

Entrada	Composto	Inibição da CYP17		Ref.
		IC <sub>50</sub> (µM)	RP <sup>a</sup>	
23	<b>53</b>	Rato: 0,027 ND	Rato: 9 ----	189
24	<b>54</b>	Rato: 0,004 Humana: 0,021	Rato: 60 ----	
25	<b>55</b>	Rato: 0,009 Humana: 0,021	Rato: 27 ----	
26	<b>56</b>	Rato: 0,006 Humana: 0,029	Rato: 40 ----	
27	<b>57</b>	Rato: 0,004 Humana: 0,011	Rato: 60 ----	190
28	<b>58</b>	Rato (OHase): 31,63 Rato (liase): 2,81	Rato (OHase): < 1 Rato (liase): < 1	191
29	<b>59</b>	Rato (OHase): 244,85 Rato (liase): 19,46	Rato (OHase): < 1 Rato (liase): < 1	
30	<b>60</b>	Rato (OHase): 2,95 Rato (liase): 0,33	Rato (OHase): 1,3 Rato (liase): 5	192

**Tabela 4** - Valores de IC<sub>50</sub> e RP para inibidores não esteróides derivados do imidazole;

<sup>a</sup>RP = IC<sub>50</sub> (**11**) / IC<sub>50</sub> (inibidor).

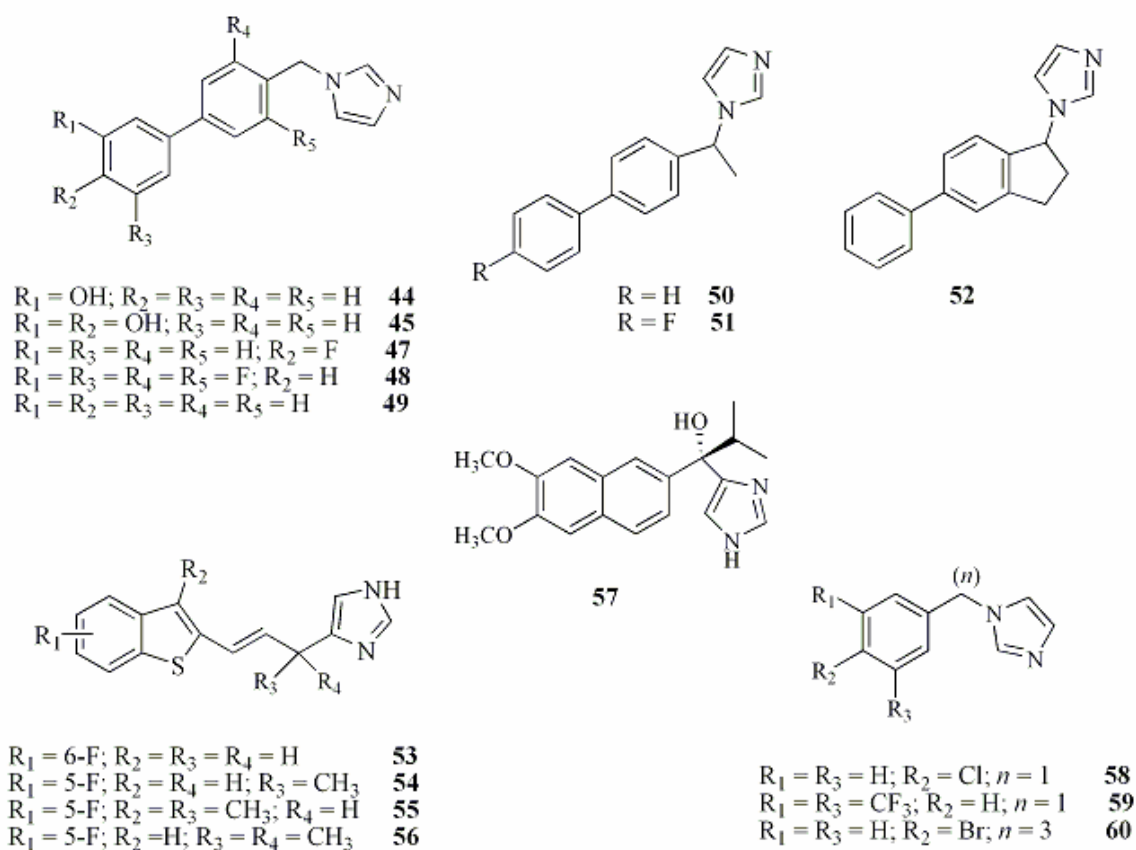
O composto **37** (Figura 15) inibiu a CYP17 de rato sendo 5 vezes mais potente do que o cetoconazol **11** (Tabela 4, entrada 8).<sup>181</sup> Contudo, inibiu também a CYP19 sendo 31 vezes mais potente do que a aminoglutetimida, um conhecido inibidor desta enzima. Na série de tetra-hidronaftalenos **38-41** (Figura 15), a inibição da CYP17 de rato ocorreu com valores de IC<sub>50</sub> entre 1,2 e 5,8 µM, de forma mais potente do que com cetoconazol **11** (Tabela 4, entradas 9-12).<sup>182</sup> Os compostos **38** e **40** provocaram uma redução eficaz da concentração plasmática de testosterona **6** em ratos Sprague-Dawley machos.<sup>182</sup> A uma dosagem equivalente a 20 mg/kg de cetoconazol **11**, estes compostos induziram um abaixamento dos níveis séricos de testosterona **6** para 0 e 0,1 ng/ml, respectivamente (controlo: 0,54 ng/ml; cetoconazol **11**: 0,1 ng/ml). O composto **42** (Figura 15) inibiu a enzima de rato e a humana valores de IC<sub>50</sub> de 0,28 e 0,11 µM, sendo 240 e 7 vezes mais potente do que o cetoconazol **11**, respectivamente (Tabela 4, entrada 13).<sup>183</sup>

A introdução de átomos de flúor nos compostos é uma estratégia habitualmente usada para aumentar a sua estabilidade metabólica graças ao poder electroatractivo do flúor e a uma elevada energia de ligação C-F. A presença de flúor também aumenta a lipofilia das estruturas, facilitando assim a permeação de membranas. A fluoração de naftalenos melhorou a sua capacidade de inibição da CYP17 e CYP19.<sup>184</sup> O composto **43** (Figura 15) foi o mais potente na inibição da enzima humana, com um valor de IC<sub>50</sub> de 0,27 µM, sendo apenas 2,7 vezes mais potente do que o cetoconazol **11** (Tabela 4, entrada 14), e retendo ainda assim actividade inibitória da CYP19 (32 vezes mais potente do que a aminoglutetimida).

Os derivados bifenilo **44** e **45** (Figura 16) inibiram a CYP17 com valores de IC<sub>50</sub> de 0,63 e 3,1 µM para a CYP17 de rato e 0,13 e 0,087 µM para a enzima humana, respectivamente (Tabela 4, entradas 15-16).<sup>185</sup> O inibidor esteróide VN/85-1 **46** (Figura 22) teve valores de IC<sub>50</sub> de 0,18 e 0,04 µM, nas mesmas condições de ensaio. O composto **44** provocou uma redução da concentração plasmática de testosterona **6** em ratos Sprague-Dawley machos, numa dosagem equivalente a 10 mg/kg de cetoconazol **11**, 2 horas após a sua administração. Contudo, após 6 horas, os níveis de testosterona **6** voltaram a subir. Foi sugerido que este efeito era devido a um rápido metabolismo. O composto **47** (Tabela 4, entrada 17), um derivado fluorado, originou resultados mais promissores, provocando um abaixamento dos níveis plasmáticos de testosterona **6** semelhante ao obtido por castração, 2 horas após a sua administração, na dosagem de 5 mg/kg.<sup>185</sup> Foram testados outros derivados fluorados entre os quais o composto **48**, que se revelou 3 vezes mais potente do que o seu análogo não fluorado **49** (Tabela 4, entradas 18-19).<sup>186</sup> A capacidade de inibição da adesão das células tumorais da mama MCF-7 às células endoteliais vasculares foi estudada para alguns destes compostos e verificou-se que não se correlacionava com o seu potencial inibitório da CYP17.<sup>187</sup>

Uma outra série de derivados bifenilo **50-52** (Figura 16) também revelou ter boa capacidade inibitória da CYP17 humana com valores de IC<sub>50</sub> de 0,17, 0,24 e 0,25 µM, respectivamente (Tabela 4, entradas 20-22).<sup>188</sup> O composto **51**, 124 vezes mais potente do que o cetoconazol **11** para a

inibição da enzima de rato (Tabela 4, entrada 21), provocou uma redução da concentração plasmática de testosterona **6** para níveis iguais aos atingidos por castração, 2 horas após a sua administração, numa dosagem equivalente a 10 mg/kg de cetoconazol **11**, a qual se manteve durante 6 horas. Estudos de modelação molecular mostraram que a conformação do composto **52** não é a ideal para interacção óptima com o local activo da enzima.<sup>188</sup>



**Figura 16** – Inibidores não esteróides derivados do imidazole.

Os benzotiofenos **53-56** (Figura 16) inibiram a enzima de rato e humana de forma eficaz e com uma boa duração de acção *in vivo* (Tabela 4, entradas 23-26).<sup>189</sup> Quando administrados numa dosagem de 25 mg/kg, observou-se um abaixamento dos níveis séricos de testosterona **6** para valores cerca de 2 a 4 vezes inferiores aos obtidos com o cetoconazol **11**, decorridas 2 horas, os

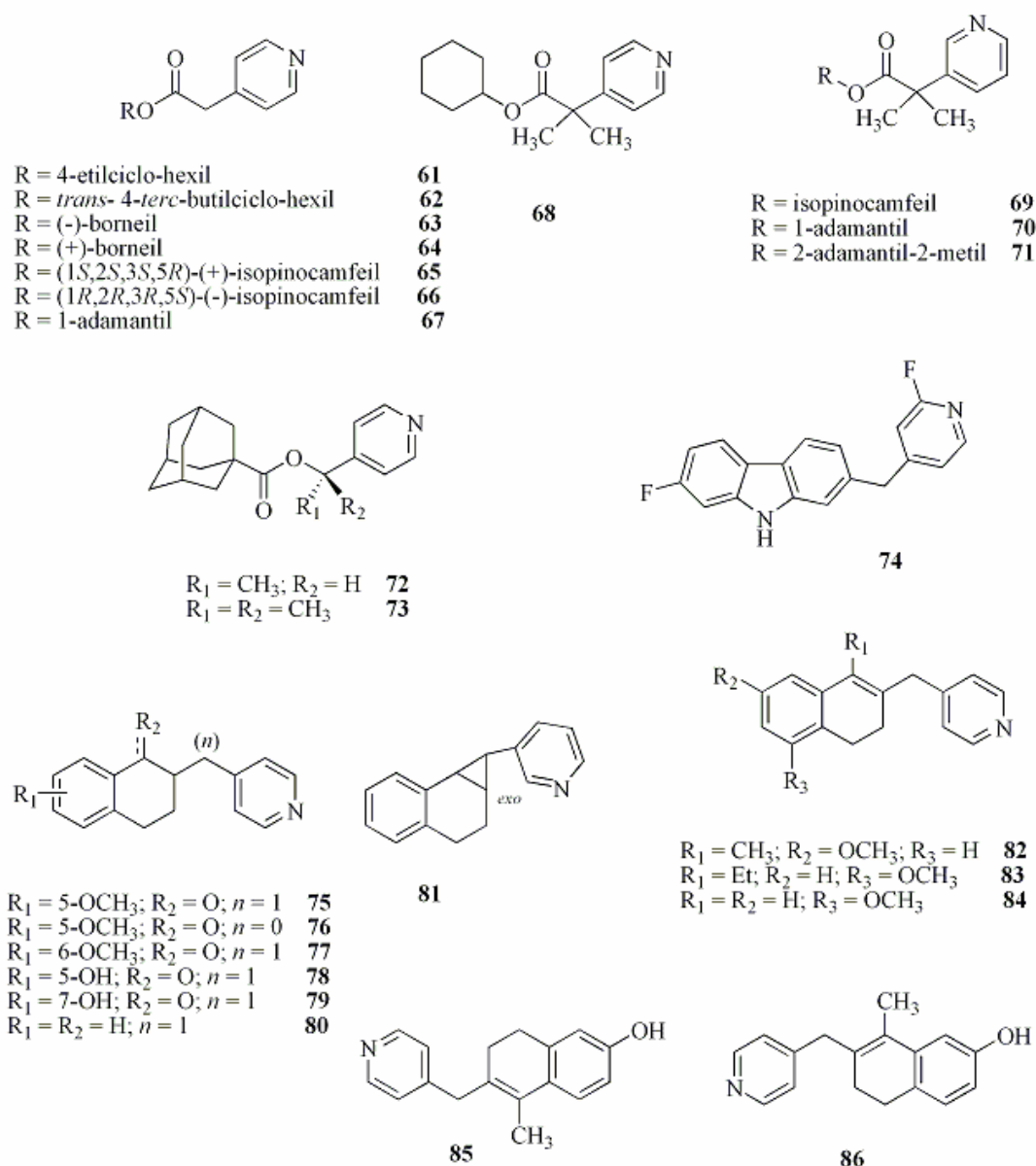


quais foram mantidos até 5 horas após a sua administração. A presença de flúor e do grupo imidazolilo revelaram ser importantes para a referida actividade.<sup>189</sup>

O composto **57** (Figura 16) inibiu selectivamente as enzimas de rato e humana (Tabela 4, entrada 27).<sup>190</sup> Também provocou abaixamento dos níveis séricos de testosterona **6** para níveis próximos dos atingidos por castração, após 8 horas, em administração única de 1 mg/kg, em macacos. Recentemente, foi sugerido que os compostos **58** e **59** podem ser interessantes no *design* de inibidores específicos da actividade C<sub>17,20</sub>-liase visto terem valores de IC<sub>50</sub> muito discrepantes para a inibição das duas actividades enzimáticas (Tabela 4, entradas 28-29).<sup>191</sup> Contudo, estes compostos revelaram-se menos potentes do que o cetoconazol **11** [IC<sub>50</sub> (OHase): 3,76 µM; IC<sub>50</sub> (liase): 1,66 µM] na inibição da enzima de rato. A inibição das actividades 17α-hidroxilase e C<sub>17,20</sub>-liase obtida com o composto **60**, que contém um espaçador alquilo maior ( $n = 3$ ), foi 1,3 e 5 vezes mais potente do que com o cetoconazol **11**, respectivamente (Tabela 4, entrada 30).<sup>192</sup>

### 5.1.2 Derivados da piridina

Os derivados da piridina que foram estudados como inibidores da CYP17 estão representados na Figura 17. Os ésteres do ácido 4-piridilacético inibem várias enzimas da biossíntese de androgénios e de estrogénios de forma não selectiva.<sup>193, 194</sup> Os compostos **61-68**, contendo um grupo ciclohexilo, inibiram a CYP17 de rato (Tabela 5, entradas 1-8) e a CYP19 humana (IC<sub>50</sub> entre 0,089 e 0,31 µM), concomitantemente.



**Figura 17** – Inibidores não esteróides derivados da piridina.

O composto **68**, que tem grupos metilo adicionais, mostrou melhor selectividade para a CYP17, tendo um valor de  $IC_{50}$  de 13  $\mu M$  para a inibição da CYP19 humana placentar (Tabela 5, entrada 8).<sup>193, 194</sup>

Entrada	Composto	Inibição da CYP17		Ref.
		$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	RP <sup>a</sup>	
1	<b>61</b>	Rato (OHase): 2,0 Rato (liase): 2,7	---- Rato (liase): 3,7	193, 194
2	<b>62</b>	Rato (OHase): 2,1 Rato (liase): 3,0	---- Rato (liase): 3,3	
3	<b>63</b>	Rato (OHase): 1,5 Rato (liase): 2,2	---- Rato (liase): 4,5	
4	<b>64</b>	Rato (OHase): 0,59 Rato (liase): 0,54	---- Rato (liase): 18	
5	<b>65</b>	Rato (OHase): 0,26 Rato (liase): 0,28	---- Rato (liase): 36	
6	<b>66</b>	Rato (OHase): 1,7 Rato (liase): 1,8	---- Rato (liase): 5,5	
7	<b>67</b>	Rato (OHase): 0,56 Rato (liase): 0,61	---- Rato (liase): 16	
8	<b>68</b>	Rato (OHase): 3,6 Rato (liase): 4,5	---- Rato (liase): 2,2	
9	<b>69</b>	Humana (OHase): 0,029 Humana (liase): 0,015	Humana (OHase): 2,2 Humana (liase): 1,7	194, 195
10	<b>70</b>	Humana (OHase): 0,090 Humana (liase): 0,013	Humana (OHase): 0,7 Humana (liase): 2	
11	<b>71</b>	Humana (OHase): 0,075 Humana (liase): 0,013	Humana (OHase): 0,9 Humana (liase): 2	
12	<b>72</b>	Humana (OHase): 0,0033 Humana (liase): 0,0018	Humana (OHase): 20 Humana (liase): 14	196
13	<b>73</b>	Humana (OHase): 0,0088 Humana (liase): 0,0027	Humana (OHase): 7,4 Humana (liase): 10	
14	<b>74</b>	Humana: 0,008	Humana: 11	198
15	<b>75</b>	Rato: 13	Rato: 5	199
16	<b>76</b>	Rato: 13	Rato: 5	
17	<b>77</b>	Rato: 19	Rato: 3,5	
18	<b>78</b>	Rato: 25	Rato: 2,7	
19	<b>79</b>	Rato: 39	Rato: 1,7	
20	<b>80</b>	Rato: 22	Rato: 3	

**Tabela 5** – Valores de  $IC_{50}$  e RP para inibidores não esteróides derivados da piridina;

<sup>a</sup>RP =  $IC_{50}$  (**11**) /  $IC_{50}$  (inibidor).

(cont.)

Entrada	Composto	Inibição da CYP17		Ref.
		IC <sub>50</sub> (μM)	RP <sup>a</sup>	
21	<b>81</b>	Rato: 6,3	Rato: 10	181
22	<b>82</b>	Rato: 0,62 Humana: 0,064	Rato: 110 Humana: 11	183
23	<b>83</b>	Rato: ND Humana: 0,072	---- Humana: 10	
24	<b>84</b>	Rato: ND Humana: 0,083	---- Humana: 9	
25	<b>85</b>	Rato: 0,11 Humana: 0,036	Rato: 610 Humana: 20	
26	<b>86</b>	Rato: 0,27 Humana: 0,058	Rato: 250 Humana: 13	

**Tabela 5** – Valores de IC<sub>50</sub> e RP para inibidores não esteróides derivados da piridina;

<sup>a</sup>RP = IC<sub>50</sub> (**11**) / IC<sub>50</sub> (inibidor).

Os ésteres do ácido 3-piridilacético inibiram a CYP17 humana de forma mais selectiva e aliada a uma boa potência.<sup>195</sup> O grau de potência para a inibição da actividade C<sub>17,20</sub>-liase da enzima testicular humana obtido com os compostos **69-71** foi semelhante ao do cetoconazol **11**, com valores de IC<sub>50</sub> de 0,015, 0,013 e 0,013 μM, respectivamente (Tabela 5, entradas 9-11). As características estruturais que se revelaram mais importantes para esta actividade foram o grupo piridilo, os grupos metilo em posição α relativamente ao grupo carbonilo e um substituinte alcóxido volumoso.<sup>195</sup> A importância da quiralidade na posição α em relação aos substituintes 3- e 4-piridilo na actividade inibitória foi estudada.<sup>194, 196</sup> Numa nova série de compostos em que a ligação éster está invertida, o composto mais potente foi o **72** com um valor de IC<sub>50</sub> de 0,018 μM para a actividade C<sub>17,20</sub>-liase (Tabela 5, entrada 12). O composto **73** foi identificado como um bom inibidor da CYP17 humana com boa resistência às esterases (Tabela 5, entrada 13).<sup>194, 196</sup> A bioquímica e a farmacocinética do composto **73** e do seu éster reverso **70** foram estudadas, mas o uso do rato como modelo animal revelou não ser apropriado.<sup>197</sup>

O carbazole **74** foi 11 vezes mais potente do que o cetoconazol **11** como inibidor da CYP17 humana (Tabela 5, entrada 14).<sup>198</sup> Numa dosagem de 3 mg/kg, provocou um abaixamento dos níveis séricos de testosterona **6** no rato para um valor igual a 40% do valor do controlo. O mesmo efeito só foi atingido com o cetoconazol **11** numa dosagem 10 vezes superior. A actividade inibitória da CYP17 de rato reportada para os tetra-hidronaftalenos **75-80** foi 1,7 a 5 vezes mais potente do que com o cetoconazol **11** (Tabela 5, entradas 15-20).<sup>199</sup>

O composto **81** inibiu a CYP17 de rato com um valor de  $IC_{50}$  de 6,3  $\mu$ M, sendo 10 vezes mais potente do que o cetoconazol **11** (Tabela 5, entrada 21).<sup>181</sup> Contudo, inibiu também a tromboxano  $A_2$  sintetase ( $IC_{50}$ : 14,5  $\mu$ M), sendo esta inibição 1 ordem de magnitude superior à obtida com o dazoxiben, um conhecido inibidor desta enzima. Os di-hidronaftalenos **82-86** inibiram a CYP17 do rato e humana (Tabela 5, entradas 22-26).<sup>183</sup> Contudo, inibiram também a CYP19 com valores de  $IC_{50}$  entre os 0,63 e 1,3  $\mu$ M.

### 5.1.3 Outros derivados não esteróides

Vários outros inibidores não esteróides foram sintetizados e avaliados para inibição da CYP17 e estão representados na Figura 18. O bifluranol **87** e os seus análogos **88-90** foram testados para a inibição da enzima de rato e verificou-se serem menos potentes do que o cetoconazol **11** (3 a 6 vezes menos potentes para a inibição da actividade 17 $\alpha$ -hidroxilase e 2 a 7 vezes menos potentes para a inibição da actividade C<sub>17,20</sub>-liase, respectivamente).<sup>200</sup> Um efeito semelhante ocorreu para os compostos **91-93**.<sup>201, 202</sup> Os carbazóis **94-96** inibiram a CYP17 humana e provocaram um abaixamento dos níveis séricos de testosterona **6**, numa dosagem de 3 mg/kg, para 14, 5 e 36% do valor do controlo, respectivamente (Tabela 6, entradas 1-3).<sup>198</sup> A inibição da enzima de rato foi 10 vezes mais potente com o composto **97** do que o cetoconazol **11** (Tabela 6, entrada 4).<sup>203</sup> Foi reportada actividade inibitória modesta da CYP17 humana com os compostos **98** e **99**, dois dihidronaftalenos que são isómeros *E* e *Z*, respectivamente,<sup>204</sup> assim como com os compostos **100-103**.<sup>205</sup> Os compostos **104-107** não revelaram potencial inibitório da enzima.<sup>178</sup>

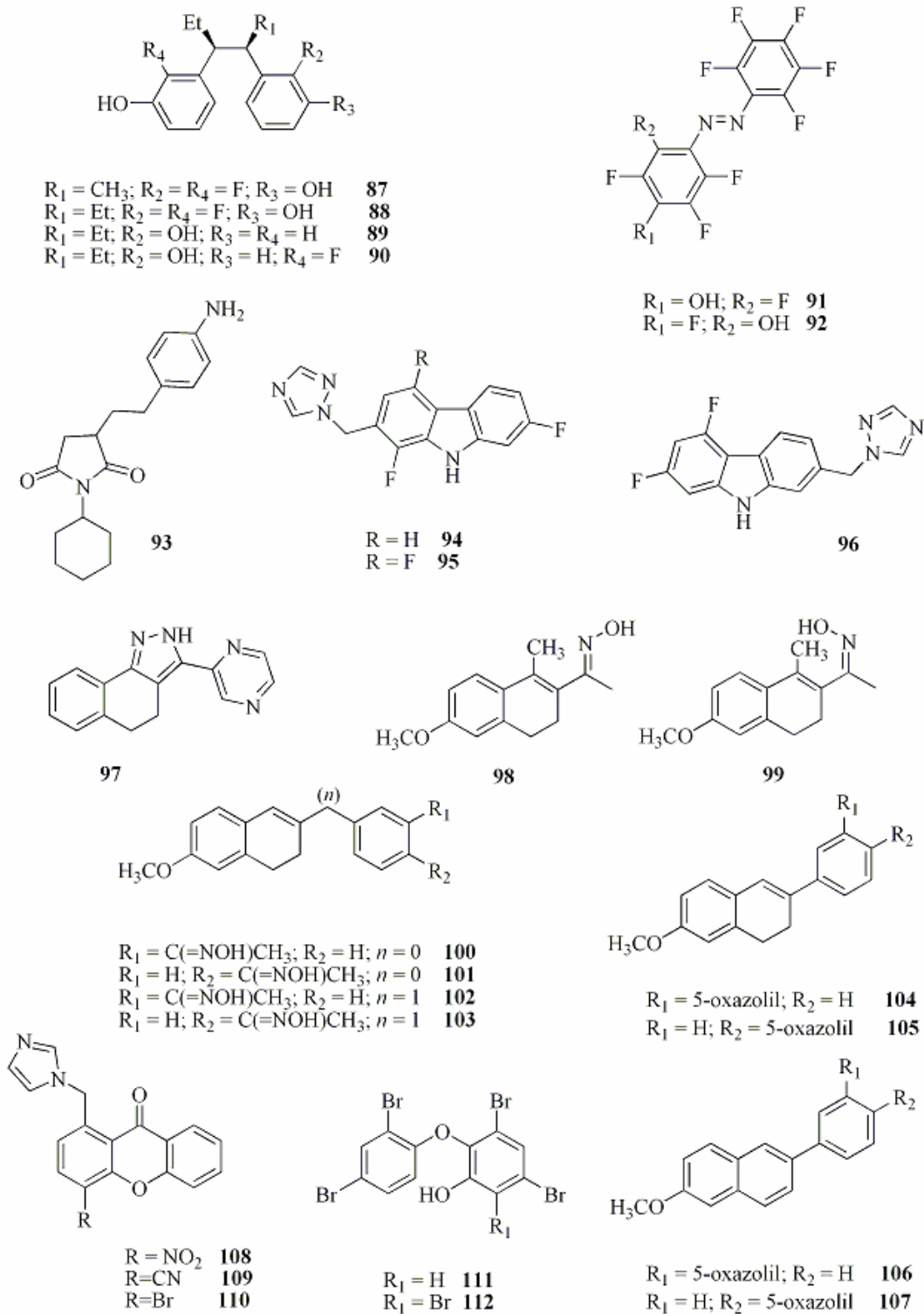


Figura 18 – Outros inibidores não esteróides.

Entrada	Composto	Inibição da CYP17		Ref.
		IC <sub>50</sub> (μM)	RP <sup>a</sup>	
1	<b>94</b>	Humana: 0,041	Humana: 2	198
2	<b>95</b>	Humana: 0,025	Humana: 3,4	
3	<b>96</b>	Humana: 0,012	Humana: 7	
4	<b>97</b>	Rato: 6,5	Rato: 10	203
5	<b>108</b>	Humana: 0,13	Humana: 5,7	206
6	<b>109</b>	Humana: 0,22	Humana: 3,4	
7	<b>110</b>	Humana: 0,042	Humana: 18	

**Tabela 6** – Valores de IC<sub>50</sub> e RP para outros inibidores não esteróides; <sup>a</sup>RP = IC<sub>50</sub> (**11**) / IC<sub>50</sub> (inibidor).

O *design*, síntese e avaliação de inibidores da CYP19 levou à descoberta dos compostos **108-110** como inibidores potentes e selectivos da CYP17 humana.<sup>206</sup> Estas xantonas tiveram, respectivamente, valores de IC<sub>50</sub> de 0,13, 0,22 e 0,042 μM para a inibição da enzima testicular humana, sendo mais potentes do que o cetoconazol **11** (Tabela 6, entradas 5-7). Recentemente, foi reportado que ocorria inibição da CYP17 humana por exposição a compostos retardadores da combustão **111-112**.<sup>207</sup> A inibição da CYP17 causada pelo composto **111** na concentração de 10 μM foi de cerca de 75%.



## 5.2 Esteróides

### 5.2.1 Derivados da série androstano

Compostos análogos da testosterona **6** com funções carbamato **114**, amida **115-116** e ureia **117** na posição C17 foram sintetizados e avaliados com base na observação de que o derivado 17 $\beta$ -acetilado **113** tinha actividade inibitória da CYP17 (Figura 19; Tabela 7, entrada 1).<sup>151</sup> Os compostos **114-117** inibiram a enzima testicular de rato em 60-85% na concentração de 0,38  $\mu$ M (Tabela 7, entradas 2-5). Os compostos **116** e **117** demonstraram boa selectividade uma vez que não inibiram a conversão de corticosterona em 18-hidroxycorticosterona nas mitocôndrias, *in vitro*. Os autores consideraram que os compostos eram análogos do substrato 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona **9** e que a falta do grupo 17 $\alpha$ -hidroxilo era responsável pela sua actividade inibitória.<sup>151</sup>

A mestanolona **118**, o estanozolol **119** e o furazabol **120** (Figura 19), três esteróides anabólicos, inibiram competitivamente a CYP17 de porco.<sup>208</sup> Os valores de IC<sub>50</sub> determinados para a inibição das actividades 17 $\alpha$ -hidroxilase e C<sub>17,20</sub>-liase com o estanozolol **119** foram de 2,90 e 0,74  $\mu$ M, respectivamente. O furazabol **120** e a mestanolona **118** inibiram apenas a actividade C<sub>17,20</sub>-liase com um valor de IC<sub>50</sub> de 33,3  $\mu$ M para ambos os compostos.

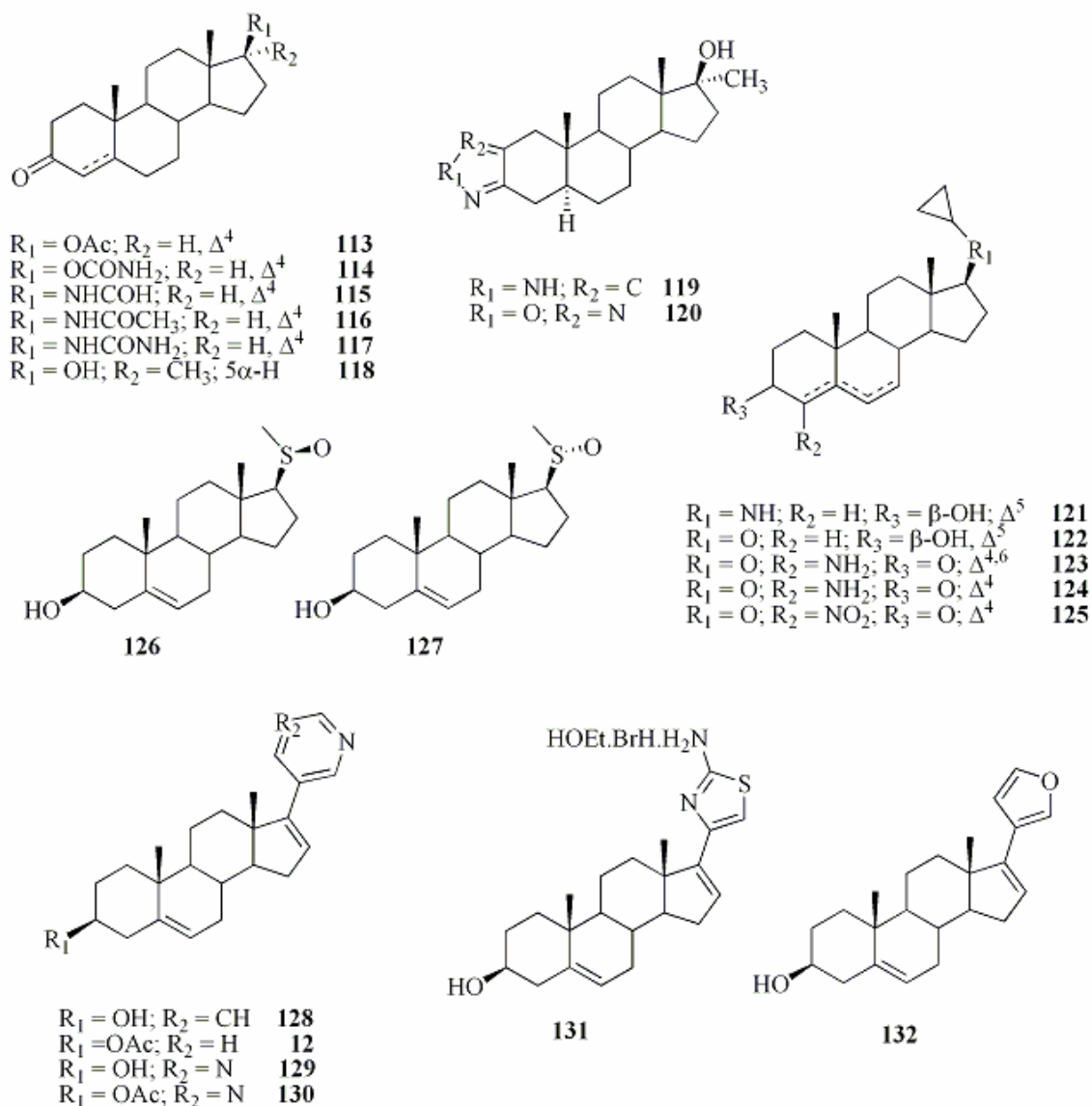
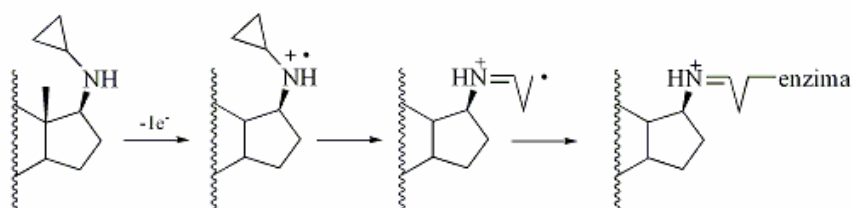


Figura 19 – Inibidores esteróides derivados do androstano.

Entrada	Composto	Conc. Inibidor (µM)	Tempo de Pré-incubação (min)	% Inibição <sup>a</sup>	K <sub>i</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (µM)	Ref.	
1	113	0,38	----	----	----	----	151	
		1,5		65				
2	114	0,38	----	85	----	----		
		1,5		95				
3	115	0,38	----	85	----	----		
		1,5		100				
4	116	0,38	----	60	----	----		
		1,5		85				
5	117	0,38	----	75	----	----		
		1,5		90				
6	121	----	----	----	90 <sup>b</sup>	4,6 <sup>c</sup>		209
7	122	0,8	0	11	----	----		210, 211
			30	64				
8	123	1	0	69	339 <sup>b</sup>	----		212, 213
		1	40	84				
		10	0	95				
		10	40	98				
9	124	1	0	79	286 <sup>b</sup>	----		
		1	40	86				
		10	0	96				
		10	40	99				
10	125	0,1	0	36 <sup>b</sup>	----	----	212	
		0,1	40	79 <sup>b</sup>				
		1	0	78 <sup>b</sup>				
		1	40	95 <sup>b</sup>				
11	126	----	----	----	380 <sup>c,d</sup>	1,9 <sup>c</sup>	214	
12	127	----	----	----	380 <sup>c,d</sup>	1,9 <sup>c</sup>		
13	131	0,1	----	58 <sup>b</sup>	----	0,063 <sup>b</sup>	221-223	
		1		71 <sup>b</sup>				
14	132	0,1	----	53 <sup>b</sup>	----	----		
		1		91 <sup>b</sup>				

**Tabela 7** – Inibição da CYP17 por derivados do androstano; <sup>a</sup> CYP17 humana; <sup>b</sup> Determinada em enzima de macaco; <sup>c</sup> CYP17 testicular de porco; <sup>d</sup> O K<sub>i</sub> para o composto **121** nas mesmas condições experimentais foi 3620 nM.

O 17 $\beta$ -(ciclopropilamino)androst-5-en-3 $\beta$ -ol **121** (Figura 19) demonstrou inibição selectiva, dependente do tempo e irreversível da CYP17 humana, com um  $K_i$  igual a 90 nM, que foi determinado em enzima de macaco (Tabela 7, entrada 6).<sup>209</sup> Um mecanismo de acção proposto para este inibidor envolve a formação de um catião-radical resultante da oxidação da amina, seguida da abertura do anel e formação de um radical  $\beta$ -imino que alquila a enzima, inactivando-a de forma irreversível (Figura 20).



**Figura 20** – Mecanismo de acção do composto **121**.

A síntese e a avaliação de análogos 17 $\beta$ -ciclopropiloxi substituídos foram também reportadas (Figura 19).<sup>210, 211</sup> A inibição mais potente da enzima testicular humana foi obtida com o composto **122**, atingindo-se 64% de inibição da actividade da CYP17 decorridos 30 minutos de pré-incubação com o composto, na concentração de 0,8  $\mu$ M (Tabela 7, entrada 7). Compostos com o grupo amina ligado ao C4 **123-124** inibiram a enzima humana em mais de 50% na concentração de 1  $\mu$ M, sem pré-incubação, e na concentração de 10  $\mu$ M a inibição foi praticamente completa (Tabela 7, entradas 8-9).<sup>212, 213</sup> Usando a enzima de macaco foram determinados valores de  $K_i$  para a inibição da actividade C<sub>17,20</sub>-liase de 339 e 286 nM para os compostos **123** e **124**, respectivamente (Tabela 7, entradas 8-9). O composto **124** inibiu o crescimento do tumor prostático humano quando testado nas dosagens de 30 e 100 mg/kg/dia. O derivado 4-nitrado **125** também mostrou uma boa inibição da enzima de macaco (Tabela 7, entrada 10).<sup>212</sup>

A inibição da CYP17 de porco promovida pelos compostos **126-127** (Figura 19) foi mais potente ( $IC_{50}$ : 1,9  $\mu$ M;  $K_i$ : 380 nM) do que com o composto **121** ( $IC_{50}$ : 4,6  $\mu$ M;  $K_i$ : 3,62  $\mu$ M) (Tabela 7, entradas 11-12).<sup>214</sup>

Um dos compostos de maior destaque ao nível da problemática dos inibidores da CYP17 é o 17-(3-piridil)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ol ou abiraterona **128** (Figura 19), um inibidor irreversível da CYP17 humana testicular, 16 e 9 vezes mais potente do que o cetoconazol **11** para a inibição das actividades 17 $\alpha$ -hidroxilase e C<sub>17,20</sub>-liase, respectivamente (Tabela 8, entrada 1).<sup>215-217</sup> Tanto o substituinte 3-piridilo como a dupla ligação em C16 são importantes para esta inibição. O composto **12** é o derivado 3 $\beta$ -acetilado da abiraterona e o seu pró-fármaco, com melhor biodisponibilidade e resistência à degradação pelas esterases (Tabela 8, entrada 2).<sup>218</sup> Quando administrado intraperitonealmente em regime diário a ratos adultos, observou-se abaixamento significativo dos níveis plasmáticos de testosterona **6** durante pelo menos 24 horas, apesar de ter ocorrido um aumento concomitante na concentração de LH circulante.<sup>218</sup> Observou-se também regressão de vários órgãos androgénio-dependentes tais como a próstata, as vesículas seminais e os testículos. Esta redução no peso testicular foi surpreendente uma vez que não foi reportada com o cetoconazol **11** ou com antiandrogénios como a flutamida. Também em oposição ao ocorrido com o cetoconazol **11**, com o composto **12** não se observou aumento do peso das glândulas supra-renais, indicando isto que o composto é selectivo para a inibição da CYP17, não afectando por isso a produção normal de corticosterona.<sup>218</sup>

Os ensaios clínicos de fase I do acetato de abiraterona **12** foram concluídos com sucesso.<sup>64, 65</sup> Em pacientes castrados (níveis plasmáticos de testosterona **6** confirmados como sendo inferiores a 2 nmol/l), o tratamento com este composto na dosagem de 500 mg resultou na supressão duradoura do eixo testosterona **6**/AD **10**. Não se verificou qualquer alteração da concentração de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona **9** nem dos níveis de cortisol, donde se concluiu que, qualquer inibição concomitante da actividade 17 $\alpha$ -hidroxilase que pudesse ter ocorrido teria que ser devida a mecanismos compensatórios relacionados com o retrocontrolo promovido pelo cortisol. Em pacientes não submetidos a qualquer abordagem cirúrgica no âmbito do CP, que estavam previamente em terapêutica com antiandrogénios ou agonistas LHRH, a administração do composto **12** numa dosagem de 800 mg, provocou uma supressão dos níveis séricos de testosterona **6** sem

despoletar um pico na concentração de LH. Em geral, o composto **12** foi bem tolerado sem efeitos adversos sérios atribuídos à sua administração.<sup>64, 65</sup> Os resultados dos ensaios de fase II com este composto foram recentemente reportados<sup>66, 67</sup> e continuam a validar o papel do acetato de abiraterona **12** como terapêutica hormonal de segunda linha para o CP resistente à castração em pacientes que apresentam recorrência após terapêutica hormonal de primeira linha.

Entrada	Composto	Inibição da CYP17		RP <sup>b</sup>	Ref.
		IC <sub>50</sub> (nM)	RP <sup>a</sup>		
1	<b>128</b>	Humana (OHase): 4 Humana (liase): 2,9	Humana (OHase): 16 Humana (liase): 9	Humana (OHase): 4,5 Humana (liase): 6	215-217
2	<b>12</b>	Humana (OHase): 18 Humana (liase): 17	Humana (OHase): 3,6 Humana (liase): 1,5	Humana (OHase): 1 Humana (liase): 1	
3	<b>129</b>	Rato: 220 Humana: 24 <i>E. coli</i> <sup>c</sup> : 30	Rato: 305 Humana: 31 <i>E. coli</i> <sup>c</sup> : > 83	Rato: 7 Humana: 5 <i>E. coli</i> <sup>c</sup> : > 83	219-220
4	<b>130</b>	Rato: 1460 Humana: 38 <i>E. coli</i> <sup>c</sup> : > 2500	Rato: 46 Humana: 19 <i>E. coli</i> <sup>c</sup> : 1	Rato: 1 Humana: 3 <i>E. coli</i> <sup>c</sup> : 1	
5	<b>133</b>	Rato: 91 Humana: 66	Rato: 12 Humana: 1,2	----	224-225
6	<b>134</b>	Rato: 49 Humana: 24	Rato: 22 Humana: 3,2	----	
7	<b>135</b>	Rato: 79 Humana: 58	Rato: 13,5 Humana: 1,3	----	
8	<b>136</b>	ND Humana: 21	---- Humana: 3,7	----	
9	<b>137</b>	Rato: 28 Humana: 42	Rato: 38 Humana: 1,8	----	
10	<b>138</b>	Rato: 76 Humana: 59	Rato: 14 Humana: 1,3	----	
11	<b>139</b>	Rato: 32 Humana: 39	Rato: 33 Humana: 2	----	233-236
12	<b>46</b>	Rato: 9 Humana: 8 LNCaP-CYP17 <sup>d</sup> : 1,25	Rato: 23 Humana: 10 LNCaP-CYP17 <sup>d</sup> : 65	----	
13	<b>153</b>	Rato: 8 Humana: 7 LNCaP-CYP17 <sup>d</sup> : 2,96	Rato: 26 Humana: 11 LNCaP-CYP17 <sup>d</sup> : 27	----	
14	<b>154</b>	Rato: 10 Humana: 13 LNCaP-CYP17 <sup>d</sup> : 7,97	Rato: 21 Humana: 6 LNCaP-CYP17 <sup>d</sup> : 10	----	
15	<b>13</b>	<i>E. coli</i> <sup>c</sup> : 300	<i>E. coli</i> <sup>c</sup> : 4	----	68, 236-
16	<b>155</b>	<i>E. coli</i> <sup>c</sup> : 915	<i>E. coli</i> <sup>c</sup> : 1,2	----	237

**Tabela 8** – Valores de IC<sub>50</sub> e RP para derivados do androstano; <sup>a</sup>RP = IC<sub>50</sub> (11) / IC<sub>50</sub> (inibidor); <sup>b</sup>RP = IC<sub>50</sub> (12) / IC<sub>50</sub> (inibidor); Potência relativa calculada em função do composto 12; <sup>c</sup>CYP17 humana recombinante expressa em *E. coli*; <sup>d</sup> CYP17 humana recombinante expressa em células LNCaP.

Os compostos **129** e **130** (Figura 19) inibiram a CYP17 humana de forma mais potente do que o acetato de abiraterona **12** e o cetoconazol **11** (Tabela 8, entradas 3-4).<sup>219, 220</sup> O composto **130** provocou uma redução eficaz dos níveis plasmáticos de testosterona **6** para valores próximos dos obtidos por castração, *in vivo*, quando administrado na dosagem de 0,1 mmol/kg, bem como do peso dos principais órgãos androgénio-dependentes. Os compostos **131** e **132** (Figura 19), contendo substituintes tiazolilo e furanilo, mostraram inibição potente da enzima de macaco, tendo atingido valores de inibição de 71 e 91%, na concentração de 1  $\mu$ M, respectivamente (Tabela 7, entradas 13-14).<sup>221-223</sup>

Vários androstanos substituídos em C17 com grupos imidazolilo, pirazolilo e isoxazolilo **133-139** (Figura 21) inibiram a CYP17 humana com valores de IC<sub>50</sub> entre 21 e 66 nM (Tabela 8, entradas 5-11).<sup>224, 225</sup> Além da inibição da CYP17, o composto **133** revelou ter actividade antagonista sobre o AR mutado e não mutado.<sup>226</sup> O composto **138** inibiu também a 5 $\alpha$ -reductase de forma competitiva, com valores de IC<sub>50</sub> de 31 nM e de K<sub>i</sub> de 20 nM, quando comparado com a finasterida (IC<sub>50</sub>: 33 nM; K<sub>i</sub>: 36 nM).<sup>227</sup> O composto **138** revelou, contudo, ter actividade agonista pura sobre o AR mutado das células LNCaP enquanto os compostos **136**, **137** e **139** mostraram actividade antagonista dos dois tipos de receptores.<sup>228</sup> Os compostos **136** e **137** não inibiram o crescimento das células LNCaP *in vivo*. O composto **139** foi o mais promissor da série como inibidor não-competitivo da CYP17 e competitivo da 5 $\alpha$ -reductase (valor de IC<sub>50</sub> de 33 nM igual ao da finasterida), com actividade antiandrogénica. A administração do composto **139**, na dosagem de 50 mg/kg/dia durante 28 dias, provocou uma redução do crescimento de tumores androgénio-dependentes em ratos atímicos próxima da atingida com a flutamida.<sup>228</sup> Quando administrado subcutâneamente a ratos Balb/c na dosagem de 50 mg/kg, teve um tempo de meia-vida de 1,5 horas e baixa biodisponibilidade, o que se sugeriu contribuir para limitar a sua actuação *in vivo*, visto serem esperados melhores resultados com base nos estudos *in vitro*.<sup>229, 230</sup>



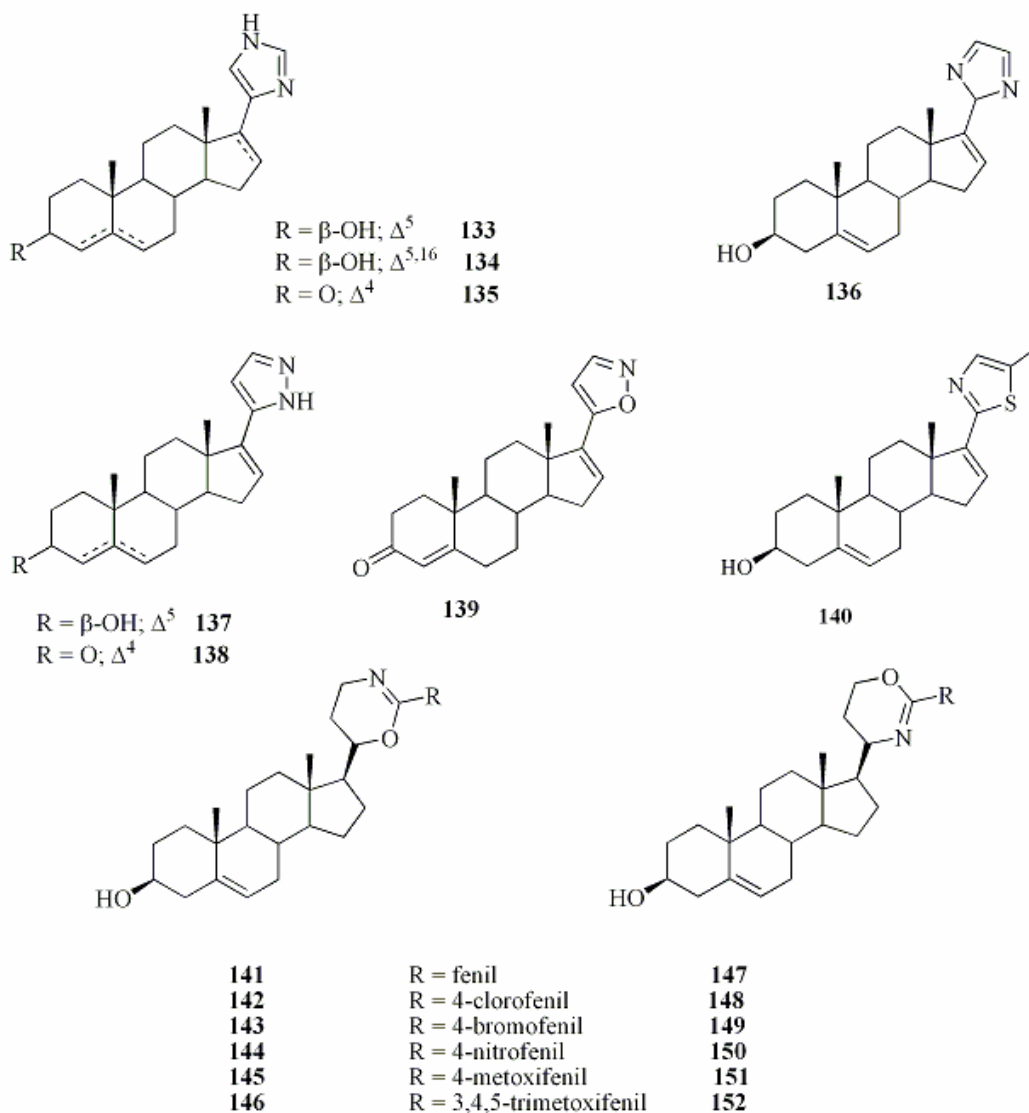
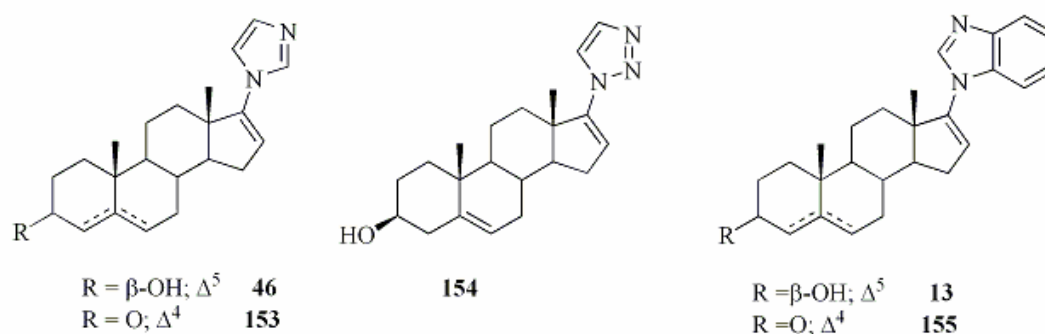


Figura 21 – Inibidores esteróides derivados do androstano.

A inibição da enzima humana recombinante expressa em *E. coli* com o composto **140** (Figura 21) foi menos eficaz do que com o cetoconazol **11**.<sup>231</sup> Um efeito semelhante ocorreu para os compostos **141-152** quando testados na enzima de rato.<sup>232</sup> Neste caso a falta de actividade foi atribuída à inexistência de uma dupla ligação em C16 e ao facto de o substituinte ligado ao C17 ser volumoso.

Um grupo interessante de derivados do androstano é constituído pelos compostos com uma ligação C17-N.<sup>233</sup> O VN/85-1 **46** (Figura 22)<sup>233-236</sup> é um inibidor potente da enzima humana enquanto que o VN/124-1 **13**<sup>68, 236, 237</sup> é o primeiro exemplo de um inibidor da CYP17/antiandrogénio capaz de inibir o crescimento do tumor androgénio-dependente no rato de forma mais eficaz do que a castração cirúrgica.



**Figura 22** – Inibidores esteróides derivados do androstano.

A inibição das enzimas humana e de rato com os compostos **46**, **153** e **154** foi 6 a 11 e 21 a 26 vezes mais potente do que com o cetoconazol **11**, respectivamente, e 10 a 65 vezes mais potente do que com o cetoconazol **11** para a enzima recombinante humana expressa em células LNCaP (Tabela 8, entradas 12-14). A inibição da  $5\alpha$ -reductase foi menos potente do que com a finasterida.<sup>234, 238</sup> Os compostos **46** e **154** inibiram quase completamente o crescimento induzido pela testosterona **6** e pela DHT **7** das células LNCaP, a concentrações inferiores a 5  $\mu\text{M}$ , e mostraram ter actividade antiandrogénica.<sup>234, 238</sup> Em ratos Sprague-Dawley machos, na dosagem de 50 mg/kg administrada durante 14 dias consecutivos, os compostos **46** e **153** provocaram uma redução dos níveis de testosterona **6** e DHT **7** circulantes, testosterona **6** testicular, testosterona **6** e DHT **7** prostática, e do peso das próstatas e vesículas seminais quando comparados com o controlo,

que foi, contudo, menos eficaz do que a atingida por castração.<sup>239</sup> O composto **46** foi consistentemente o mais potente e teve o efeito mais marcado nos níveis séricos e tecidulares de testosterona **6**, nos níveis tecidulares de DHT **7** e nos pesos dos órgãos avaliados. A farmacocinética dos compostos **46**, **153** e **154** foi estudada em ratos tendo-se verificado que estes compostos têm uma semi-vida relativamente curta e *clearance* moderada.<sup>230, 236, 240</sup>

Os compostos **13** e **155** (Figura 22), contendo o grupo benzimidazolilo, inibiram a enzima humana recombinante expressa em *E. coli* com valores de  $IC_{50}$  de 300 e 915 nM (Tabela 8, entradas 15-16).<sup>68</sup> A inibição provocada pelo composto **13** foi 3 vezes mais potente do que com a abiraterona. Ambos os compostos mostraram fraca inibição da  $5\alpha$ -reductase. Os compostos ligaram-se ao AR mutado com 14 e 10 vezes maior afinidade do que a flutamida, respectivamente, e 29 e 45 vezes maior afinidade que esta no AR normal. Mostraram actividade antagonista pura para o AR e capacidade de inibição do crescimento das células LNCaP e LAPC4 mediado pela DHT **7**, a concentrações inferiores a 10  $\mu$ M. Contudo, quando testados *in vivo*, apenas o composto **13** foi mais eficaz do que a castração cirúrgica na inibição do crescimento do tumor androgénio-dependente no rato, na dosagem de 50 mg/kg.<sup>68</sup>

### 5.2.2 Derivados da série pregnano

Para além de inibir a clivagem da cadeia lateral do colesterol **1**, o composto **156** (Figura 23) revelou actividade inibitória da CYP17 adrenocortical microsomal de bovino, com um valor de  $K_i$  de 29 nM ( $K_m$ : 0,50  $\mu$ M), sem actividade inibitória concomitante da 21-hidroxilase.<sup>241</sup>

Vários derivados do pregnano com substituintes de momento dipolar moderado a forte em C20 **157-159** (Figura 23) inibiram a CYP17 testicular humana de forma mais potente do que o cetoconazol **11**, para ambas as actividades enzimáticas (Tabela 9, entradas 1-3).<sup>225, 242, 243</sup> A inibição das actividades 17 $\alpha$ -hidroxilase e C<sub>17,20</sub>-liase com o derivado 20 $\beta$ -formilado **159** foi cerca de 4 e 6 vezes mais potente do que com o cetoconazol **11**, respectivamente (Tabela 9, entrada 3). Este composto mostrou também inibição concomitante da 5 $\alpha$ -reductase ( $K_i$ : 15,6 nM) em homogenatos prostáticos humanos ( $K_m$ : 50 nM).<sup>244</sup> Os níveis séricos de testosterona **6** foram significativamente diminuídos em resultado da administração do composto a ratos adultos, na dosagem de 50 mg/kg/dia, por um período de 2 semanas, sem alteração nos níveis séricos de corticosterona.

Os compostos **160-163** (Figura 23) revelaram actividade inibitória potente das enzimas de rato e humana, com valores RP entre os 129 e os 479 e os 3,7 e 9,6, respectivamente (Tabela 9, entradas 4-7).<sup>245</sup> Os compostos **160** e **161** também foram testados usando a estirpe bacteriana *E. coli* modificada para co-expressar a CYP17 humana e a NADPH reductase (Tabela 9, entradas 4-5). O composto **160** foi o mais eficaz sendo quase tão potente como o VN/85-1 **46** para esta inibição (IC<sub>50</sub>: 40 nM). Este composto provocou ainda diminuição das concentrações plasmáticas de testosterona **6** *in vivo*, a uma dosagem equivalente a 10 mg/kg de cetoconazol **11** (o cetoconazol **11** não provocou qualquer efeito a esta dosagem).<sup>245</sup> Apesar da função oxima se ter revelado importante para a inibição, o composto **164** contendo a função *N*-hidroxiamida, não revelou capacidade inibitória das enzimas de rato e humana.<sup>246</sup>

Os compostos **165-168** (Figura 23) inibiram a enzima de rato de forma mais potente do que o cetoconazol **11** (Tabela 9, entradas 8-11).<sup>247</sup> A inibição foi marcadamente enantioselectiva uma

vez que os isómeros *S* **165** e **167** foram 162 e 30 vezes mais potentes do que os isómeros *R* correspondentes **166** e **168**, respectivamente. Os compostos **165** e **166** foram também testados utilizando a enzima humana (Tabela 9, entradas 8-9).<sup>248</sup> O factor pelo qual os dois isómeros diferiram em potência na actividade inibitória foi de apenas 3. Os compostos **169-171** foram também inibitórios para a actividade de ambas as enzimas (Tabela 9, entradas 12-14). O composto **165** e a mistura diastereomérica **171** provocaram diminuição da concentração plasmática de testosterona **6** no rato em 81 e 84%, 2 horas após a sua administração, numa dosagem equivalente a 10 mg/kg de cetoconazol **11** (que não teve qualquer efeito a esta dose).

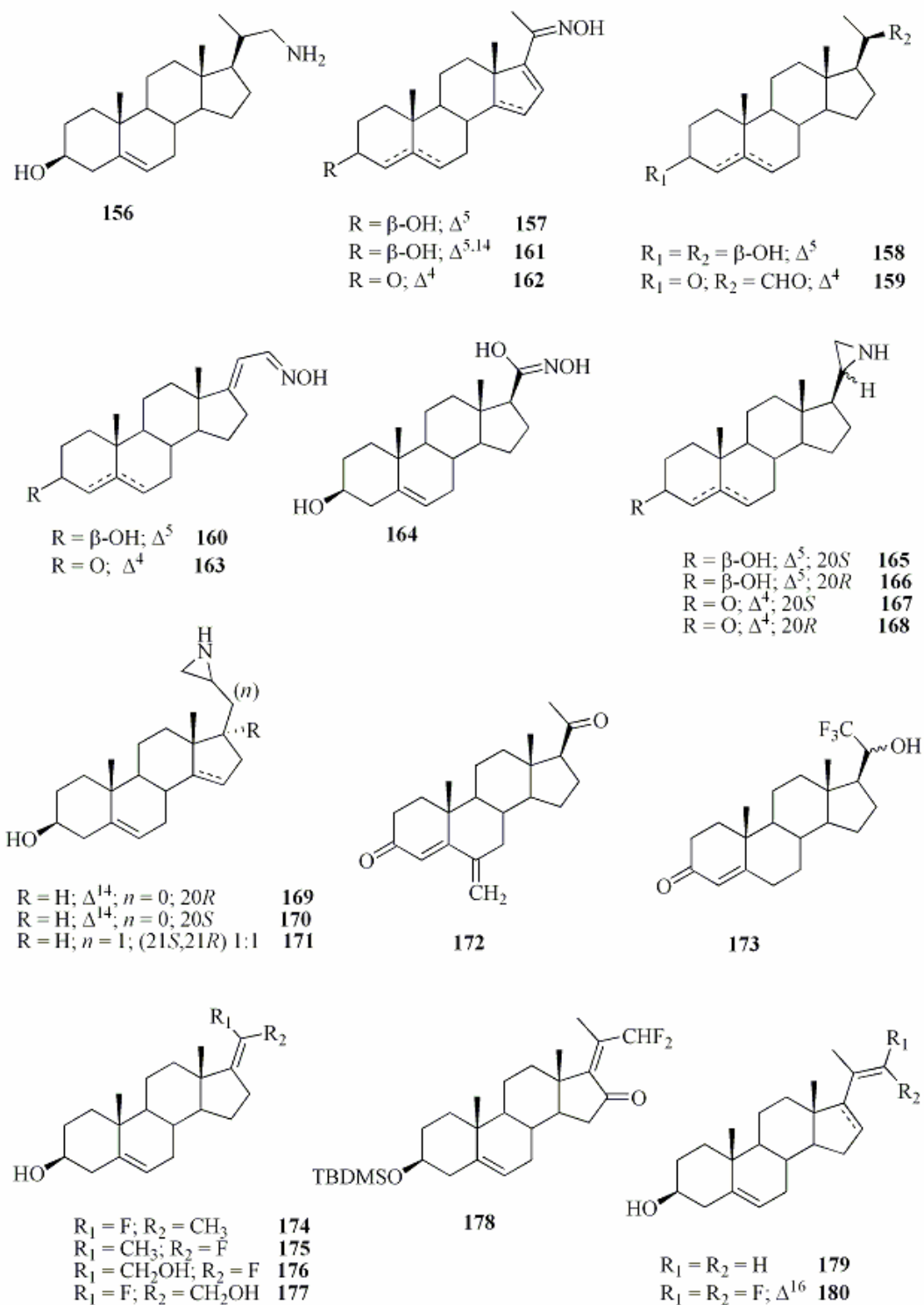


Figura 23 – Inibidores esteróides derivados do pregnano.

O composto **172** (Figura 23) inibiu a CYP17 testicular de rato e a  $5\alpha$ -reductase *in vitro* (Tabela 9, entrada 15).<sup>249</sup> A substituição na posição C16 da pregnenolona **2** e da progesterona **8** revelou-se ineficaz para a inibição da CYP17, particularmente no caso do grupo piridilo e da função *N*-metilformamida.<sup>250</sup>

Entrada	Composto	Inibição da CYP17		Ref.
		IC <sub>50</sub> (nM)	RP <sup>a</sup>	
1	<b>157</b>	Humana (OHase): 16 Humana (liase): 16	Humana (OHase): 54 Humana (liase): 58	225, 242-243
2	<b>158</b>	Humana (OHase): 180 Humana (liase): 190	Humana (OHase): 5 Humana (liase): 5	
3	<b>159</b>	Humana (OHase): 230 Humana (liase): 160	Humana (OHase): 4 Humana (liase): 6	244
4	<b>160</b>	Rato: 520 Humana: 77 <i>E. coli</i> <sup>c</sup> : 230	Rato: 129 Humana: 9,6 <i>E. coli</i> <sup>c</sup> : 12,2	245
5	<b>161</b>	Rato: <sup>b</sup> Humana: 200 <i>E. coli</i> <sup>c</sup> : 420	Rato: < 1 Humana: 3,7 <i>E. coli</i> <sup>c</sup> : 6,7	
6	<b>162</b>	Rato: <sup>b</sup> Humana: 100	Rato: < 1 Humana: 7,4	
7	<b>163</b>	Rato: 140 Humana: 180	Rato: 479 Humana: 4,1	
8	<b>165</b>	Rato: 210 Humana: 540	Rato: 319 Humana: 1,4	
9	<b>166</b>	Rato: 34000 Humana: 1520	Rato: 2 Humana: < 1	
10	<b>167</b>	Rato: 1200	Rato: 56	247-248
11	<b>168</b>	Rato: 36000	Rato: 1,9	
12	<b>169</b>	Rato: 9670 Humana: 970	Rato: 7 Humana: < 1	
13	<b>170</b>	Rato: 430 Humana: 290	Rato: 156 Humana: 2,6	
14	<b>171</b>	Rato: 530 Humana: 400	Rato: 126 Humana: 1,9	
15	<b>172</b>	Rato (OHase): 75,8 Rato (liase): 55,8	----	249
16	<b>173</b>	Rato: 600	Rato: 3,2	251

**Tabela 9** – Valores de IC<sub>50</sub> e RP para derivados do pregnano; <sup>a</sup>RP = IC<sub>50</sub> (**11**) / IC<sub>50</sub> (inibidor); <sup>b</sup>≥ 125 μM;

<sup>c</sup>*E. Coli* que coexpressa a CYP17 humana e NADPH reductase.

Os compostos fluorados **173-178** e **180** (Figura 23) foram sintetizados com o objectivo de melhorar a estabilidade metabólica em relação aos seus precursores.<sup>251-255</sup> A mistura isomérica **173** inibiu a CYP17 testicular de rato com um valor de IC<sub>50</sub> de 600 nM (Tabela 9, entrada 16).<sup>251</sup> Os compostos **174-180** mostraram boa inibição da enzima de macaco na concentração de 1 µM, sem pré-incubação, com valores de inibição entre os 49 e os 100% (Tabela 10).<sup>252, 255</sup>

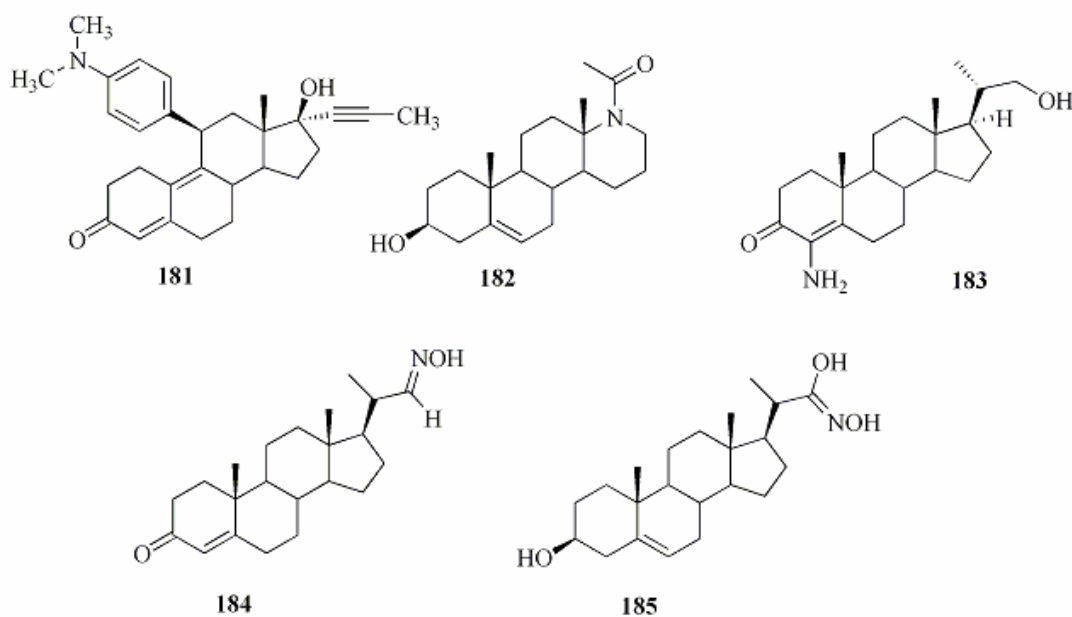
Entrada	Composto	Conc. Inibidor (µM)	Tempo de Pré-incubação (min)	% Inibição	Ref.
1	174	1	0	49	252, 255
		1	40	61	
		10	0	78	
		10	40	94	
2	175	1	0	54	
		1	40	60	
		10	0	88	
		10	40	94	
3	176	1	0	63	
		1	40	61	
		10	0	85	
		10	40	87	
4	177	1	0	96	
		1	40	94	
		10	0	100	
		10	40	100	
5	178	1	0	100	
		1	40	85	
6	179	1	0	70	
		1	40	60	
7	180	1	0	64	
		1	40	62	

**Tabela 10** – Inibição da CYP17 de macaco por derivados pregnano.



### 5.2.3 Outros derivados esteróides

Estes derivados estão representados na Figura 24. A mifepristona (RU-486) **181** é um antiprogestagénio com capacidade inibitória dose-dependente da actividade 17 $\alpha$ -hidroxilase, no rato.<sup>256</sup> A actividade enzimática testicular de ratos Sprague-Dawley machos diminuiu para 1,1 e 0,61 nmol/mg proteína/min, quando o composto foi administrado na dosagem de 1 e 5 mg/kg, respectivamente (controlo: 1,7 nmol/mg proteína/min). O composto **182** inibiu a enzima testicular humana com um valor de IC<sub>50</sub> de 4,9  $\mu$ M.<sup>257</sup> O composto **183** revelou ser um inibidor da CYP17 (K<sub>i</sub>: 14 nM) e da 5 $\alpha$ -reductase (K<sub>i</sub>: 27 nM).<sup>258</sup>



**Figura 24** – Outros inibidores esteróides.

Outro composto com esta dupla actividade é o **184**.<sup>259</sup> Os valores de K<sub>i</sub> determinados para a inibição das actividades 17 $\alpha$ -hidroxilase e C<sub>17,20</sub>-liase foram de 74 nM e de 18 nM (cetoconazol **11**: K<sub>i</sub> 50 e 15 nM, respectivamente), nos microsomas testiculares de rato. A inibição da 5 $\alpha$ -reductase foi potente e competitiva (valor de K<sub>i</sub> de 1,4 nM sendo 10 vezes inferior ao valor de K<sub>m</sub>), em

microsomas prostáticos humanos. O composto **184** provocou um abaixamento eficaz das concentrações sérica e testicular de testosterona **6** em 65 e 59% em relação ao controlo, quando administrado na dosagem de 50 mg/kg/dia durante um período de 21 dias, em ratos machos adultos. As concentrações de testosterona **6** e DHT **7** no tecido prostático foram concomitantemente diminuídas em 60 e 44% em relação ao controlo, sem alteração dos níveis séricos de LH.<sup>259</sup>

O composto **185** não teve qualquer potencial inibitório na CYP17 de rato e humana.<sup>246</sup>

## 6. Referências

1. Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Murray, T.; Xu, J.; Thun, M. J. Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J. Clin.* **2007**, *57*, 43-66.
2. Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Murray, T.; Xu, J.; Smigal, C.; Thun, M. J. Cancer Statistics, 2006. *CA Cancer J. Clin.* **2006**, *56*, 106-130.
3. Black, R. J.; Bray, F.; Ferlay, J.; Parkin, D. M. Cancer Incidence and Mortality in the European Union: Cancer Registry Data and Estimates of National Incidence for 1990. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 1075-1107.
4. Greenlee, R. T.; Murray, T.; Bolden, S.; Wingo, P. A. Cancer Statistics, 2000. *CA Cancer J. Clin.* **2000**, *50*, 7-33.
5. Pekmezovic, T.; Baade, P. Trends and patterns in prostate cancer mortality in Belgrade, Serbia: a join-point analysis. *Eur. J. Cancer Prev.* **2006**, *15*, 51-56.
6. Barros, H.; Lunet, N. Cancro. Uma perspectiva de saúde pública. *ArquiMed.* **2006**, *20*, 31-36.
7. Pienta, K. J.; Esper, P. S. Risk Factors for Prostate Cancer. *Ann. Intern. Med.* **1993**, *118*, 793-803.
8. Cussenot, O.; Valeri, A.; Berthon, P.; Fournier, G.; Mangin, P. Hereditary Prostate Cancer and Other Genetic Predispositions to Prostate Cancer. *Urol. Int.* **1998**, *60*, 30-34.
9. Reis, J. P.; Ferraz, J.; Varela, J.; Romão, A. Diagnóstico precoce do carcinoma da próstata. *Acta Urológica* **2006**, *23*, 77-83.
10. Mearini, L.; Mearini, F.; Zucchi, A.; Costantini, E.; Porena, M. CYP17 Polymorphisms and Prostate Cancer. *Eur. Urol. Suppl.* **2005**, *4*, 182.
11. Hamada, A.; Danesi, R.; Price, D. K.; Sissung, T.; Chau, C.; Venzon, D.; Sparreboom, A.; Dahut, W. L.; Figg, W. D. Association of a CYP17 Polymorphism with Overall Survival in Caucasian Patients with Androgen-Independent Prostate Cancer. *Urology* **2007**, *70*, 217-220.

12. Girão, C.; Girão, H.; Cortes, L.; Faro, C. Polimorfismo-160 C/A no promotor do gene da E-caderina e risco de cancro da próstata numa população portuguesa. *Acta Urológica* **2005**, *22*, 27-42.
13. Smith, R. A.; Cokkinides, V.; Eyre, H. J. Cancer Screening in the United States, 2007: A Review of Current Guidelines, Practices, and Prospects. *CA Cancer J. Clin.* **2007**, *57*, 90-104.
14. European Association of Urology. Guidelines on Prostate Cancer. [http://www.uroweb.org/fileadmin/user\\_upload/Guidelines/07\\_Prostate\\_Cancer\\_2007.pdf](http://www.uroweb.org/fileadmin/user_upload/Guidelines/07_Prostate_Cancer_2007.pdf). (acedido em 8 de Fevereiro, 2008).
15. Gao, W.; Bohl, C. E.; Dalton, J. T. Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 3352-3370.
16. Denis, L. J.; Griffiths, K. Endocrine Treatment in Prostate Cancer. *Semin. Surg. Oncol.* **2000**, *18*, 52-74.
17. Wynsberghe, D. V.; Noback, C. R.; Carola, R. *Human Anatomy & Physiology*, McGraw-Hill, Inc.: Boston-Burr Ridge-Dubuque-Madison-New York-SanFrancisco-St. Louis, **1995**.
18. Guyton, A. C.; Hall, J. E. *Textbook of Medical Physiology*, WB Saunders Company: Philadelphia, **2000**.
19. Koivisto, P.; Kolmer, M.; Visakorpi, T.; Kallioniemi, O. P. Androgen Receptor Gene and Hormonal Therapy Failure of Prostate Cancer. *Am. J. Pathol.* **1998**, *152*, 1-9 e referências aí citadas.
20. Debes, J. D.; Tindall, D. J. Mechanisms of Androgen-refractory Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 1488-1490 e referências aí citadas.
21. Heinlein, C. A.; Chang, C. Androgen Receptor (AR) Coregulators: an Overview. *Endocr. Rev.* **2002**, *23*, 175-200.
22. Shang, Y.; Myers, M.; Brown, M. Formation of the Androgen Receptor Transcription Complex. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 601-610.

23. Huggins, C.; Hodges, C. V. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res.* **1941**, *1*, 293-297.
24. Huggins, C.; Stevens, R. E.; Hodges, C. V. Studies on Prostatic Cancer. II. The Effect of Castration on Clinical Patients with Carcinoma of the Prostate. *Arch. Surg.* **1941**, *43*, 209-223.
25. Resnick, M. I.; Grayhack, J. T. Treatment of Stage IV Carcinoma of the Prostate. *Urol. Clin. North Am.* **1975**, *2*, 141-161 e referências aí citadas.
26. Chatterjee, B. The Role of the Androgen Receptor in the Development of Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. *Mol. Cell Biochem.* **2003**, *253*, 89-101.
27. Chung, L. W. K.; Zhau, H. E.; Wu, T. T. Development of human prostate cancer models for chemoprevention and experimental therapeutic studies. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **1997**, *28/29*, 174-181.
28. Roy-Burman, P.; Tindall, D. J.; Robins, D. M.; Greenberg, N. M.; Hendrix, M. J.; Mohla, S.; Getzenberg, R. H.; Isaacs, J. T.; Pienta, K. J. Androgens and Prostate Cancer: Are the Descriptors Valid? *Cancer Biol. Ther.* **2005**, *4*, 4-5.
29. Richter, E.; Srivastava, S.; Dobi, A. Androgen Receptor and Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2007**, *10*, 114-118.
30. Li, R.; Wheeler, T.; Dai, H.; Frolov, A.; Thompson, T.; Ayala, G. High Level of Androgen Receptor is Associated With Aggressive Clinicopathologic Features and Decreased Biochemical Recurrence-free Survival in Prostate Cancer Patients Treated With Radical Prostatectomy. *Am. J. Surg. Pathol.* **2004**, *28*, 928-934.
31. Culig, Z.; Hobisch, A.; Hittmair, A.; Peterziel, H.; Cato, A. C.; Bartsch, G.; Klocker, H. Expression, Structure, and Function of Androgen Receptor in Advanced Prostatic Carcinoma. *Prostate* **1998**, *35*, 63-70.
32. Mohler, J. L.; Gregory, C. W.; Ford, O. H.; Kim, D.; Weaver, C. M.; Petrusz, P.; Wilson, E. M.; French, F. S. The Androgen Axis in Recurrent Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 440-448.

33. Isaacs, J. T.; Isaacs, W. B. Androgen Receptor Outwits Prostate Cancer Drugs. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 26-27.
34. Tindall, D. J.; Horne, F. M.; Hruszkewycz, A.; Mohla, S.; Shuman, M.; Wang, Z.; Kantoff, P. Symposium on Androgen Action in Prostate Cancer. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7178-7180.
35. Yuan, X.; Li, T.; Wang, H.; Zhang, T.; Barua, M.; Borgesi, R. A.; Bubley, G. J.; Lu, M. L.; Balk, S. P. Androgen Receptor Remains Critical for Cell-cycle Progression in Androgen-independent CWR22 Prostate Cancer Cells. *Am. J. Pathol.* **2006**, *169*, 682-696.
36. Tilley, W. D.; Buchanan, G.; Hickey, T. E.; Bentel, J. M. Mutations in the Androgen Receptor Gene Are Associated With Progression of Human Prostate Cancer to Androgen Independence. *Clin. Cancer Res.* **1996**, *2*, 277-285.
37. Grigoryev, D. N.; Long, B. J.; Njar, V. C.; Brodie, A. Pregnenolone Stimulates LNCaP Prostate Cancer Cell Growth Via the Mutated Androgen Receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *75*, 1-10.
38. Chen, C. D.; Welsbie, D. S.; Tran, C.; Baek, S. H.; Chen, R.; Vessella, R.; Rosenfeld, M. G.; Sawyers, C. L. Molecular Determinants of Resistance to Antiandrogen Therapy. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 33-39.
39. Stanbrough, M.; Bubley, G. J.; Ross, K.; Golub, T. R.; Rubin, M. A.; Penning, T. M.; Febbo, P. G.; Balk, S. P. Increased Expression of Genes Converting Adrenal Androgens to Testosterone in Androgen-independent Prostate Cancer. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 2815-2825.
40. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Prostate Cancer. V.2.2007. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/prostate.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/prostate.pdf). (acedido em 8 de Fevereiro, 2008).
41. Thompson, I.; Leach, R. J.; Pollock, B. H.; Naylor, S. L. Prostate Cancer and Prostate-Specific Antigen: the More We Know, the Less We Understand. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 1027-1028.
42. Cramer, S. D.; Chang, B. L.; Rao, A.; Hawkins, G. A.; Zheng, S. L.; Wade, W. N.; Cooke, R. T.; Thomas, L. N.; Bleecker, E. R.; Catalona, W. J.; Sterling, D. A.; Meyers, D. A.;

- Ohar, J.; Xu, J. Association Between Genetic Polymorphisms in the Prostate-specific Antigen Gene Promoter and Serum Prostate-specific Antigen Levels. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 1044-1053.
43. Canby-Hagino, E.; Hernandez, J.; Brand, T. C.; Thompson, I. Looking back at PCPT: looking forward to new paradigms in prostate cancer screening and prevention. *Eur. Urol.* **2007**, *51*, 27-33.
44. Grilo, M. C. A.; Oliveira, M. A. P. M.; Rosa, A. F. M.; Sousa, N. M. A. Papel do antígeno específico da próstata no rastreio do carcinoma da próstata. *Acta Urológica* **2004**, *21*, 27-33.
45. American Urological Association. Guideline for the Management of Clinically Localized Prostate Cancer: 2007 Update. [http://www.auanet.org/guidelines/main\\_reports/proscan07/content.pdf](http://www.auanet.org/guidelines/main_reports/proscan07/content.pdf). (acedido em 8 de Fevereiro, 2008).
46. Monteiro, P. G. Terapêutica e Seguimento do Carcinoma da Próstata. *Acta Urológica* **2006**, *23*, 89-92.
47. Pound, C. R.; Partin, A. W.; Eisenberger, M. A.; Chan, D. W.; Pearson, J. D.; Walsh, P. C. Natural History of Progression After PSA Elevation Following Radical Prostatectomy. *JAMA* **1999**, *281*, 1591-1597.
48. Gleave, M. E.; Small, E. J. Report to the Nation on Prostate Cancer. *Medscape* **2004**, 27-36.
49. Collete, L.; Studer, U. E.; Schroeder, F. H.; Denis, L. J.; Sylvester, R. J. Why phase III trials of Maximum Androgen Blockade versus Castration in M1 prostate cancer rarely show statistically significant differences. *Prostate* **2001**, *48*, 29-39.
50. Crawford, E. D.; Eisenberger, M. A.; McLeod, D. G.; Spaulding, J. T.; Benson, R.; Dorr, F. A.; Blumenstein, B. A.; Davis, M. A.; Goodman, P. J. A Controlled Trial of Leuprolide With and Without Flutamide in Prostatic Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **1989**, *321*, 419-424.
51. Wirth, M. P.; See, W. A.; McLeod, D. G.; Iversen, P.; Morris, T.; Carroll, K. Bicalutamide 150 mg in Addition to Standard Care in Patients With Localized or Locally Advanced

- Prostate Cancer: Results From the Second Analysis of the Early Prostate Cancer Program at Median Followup of 5.4 Years. *J. Urol.* **2004**, *172*, 1865-1870.
52. Iversen, P.; Johansson, J. E.; Lodding, P.; Lukkarinen, O.; Lundmo, P.; Klarskov, P.; Tammela, T. L.; Tasdemir, I.; Morris, T.; Carroll, K. Bicalutamide (150 mg) Versus Placebo as Immediate Therapy Alone or as Adjuvant to Therapy With Curative Intent for Early Nonmetastatic Prostate Cancer: 5.3-Year Median Followup from the Scandinavian Prostate Cancer Group Study Number 6. *J. Urol.* **2004**, *172*, 1871-1876.
53. Tyrrell, C. J.; Iversen, P.; Tammela, T.; Anderson, J.; Bjork, T.; Kaisary, A. V.; Morris, T. Tolerability, Efficacy and Pharmacokinetics of Bicalutamide 300 mg, 450 mg or 600 mg as Monotherapy for Patients with Locally Advanced or Metastatic Prostate Cancer, Compared With Castration. *BJU Int.* **2006**, *98*, 563-572.
54. Lam, J. S.; Leppert, J. T.; Vemulapalli, S. N.; Shvarts, O.; Beldegrun, A. S. Secondary Hormonal Therapy for Advanced Prostate Cancer. *J. Urol.* **2006**, *175*, 27-34 e referências aí citadas.
55. Scher, H. I.; Kelly, W. K. Flutamide Withdrawal Syndrome: Its Impact on Clinical Trials in Hormone-refractory Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* **1993**, *11*, 1566-1572.
56. Sartor, O.; Cooper, M.; Weinberger, M.; Headlee, D.; Thibault, A.; Tompkins, A.; Steinberg, S.; Figg, W. D.; Linehan, W. M.; Myers, C. E. Surprising Activity of Flutamide Withdrawal, When Combined With Aminoglutethimide, in Treatment of "Hormone-refractory" Prostate Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **1994**, *86*, 222-227.
57. Small, E. J.; Baron, A. D.; Bok, R. Simultaneous Antiandrogen Withdrawal and Treatment with Ketoconazole and Hydrocortisone in Patients With Advanced Prostate Carcinoma. *Cancer* **1997**, *80*, 1755-1759.
58. Small, E. J.; Baron, A. D.; Fippin, L.; Apodaca, D. Ketoconazole Retains Activity in Advanced Prostate Cancer Patients With Progression Despite Flutamide Withdrawal. *J. Urol.* **1997**, *157*, 1204-1207.



59. Harris, K. A.; Weinberg, V.; Bok, R. A.; Kakefuda, M.; Small, E. J. Low Dose Ketoconazole With Replacement Doses of Hydrocortisone in Patients With Progressive Androgen Independent Prostate Cancer. *J. Urol.* **2002**, *168*, 542-545.
60. Small, E. J.; Halabi, S.; Dawson, N. A.; Stadler, W. M.; Rini, B. I.; Picus, J.; Gable, P.; Torti, F. M.; Kaplan, E.; Vogelzang, N. J. Antiandrogen Withdrawal Alone or in Combination With Ketoconazole in Androgen-independent Prostate Cancer Patients: a Phase III Trial (CALGB 9583). *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 1025-1033.
61. Ketoconazole, hydrocortisone and lenalidomide in treating patients with prostate cancer that do not respond to hormone therapy (NCT00460031). <http://clinicaltrials.gov>. (acedido em 7 de Fevereiro, 2008).
62. Ketoconazole and docetaxel in treating patients with metastatic prostate cancer (NCT00039221). <http://clinicaltrials.gov>. (acedido em 7 de Fevereiro, 2008).
63. Ryan, C. J.; Weinberg, V.; Rosenberg, J.; Fong, L.; Lin, A.; Kim, J.; Small, E. J. Phase II study of ketoconazole plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for prostate cancer: effect of extent of disease on outcome. *J. Urol.* **2007**, *178*, 2372-2377.
64. O'Donnell, A.; Judson, I.; Dowsett, M.; Raynaud, F.; Dearnaley, D.; Mason, M.; Harland, S.; Robbins, A.; Halbert, G.; Nutley, B.; Jarman, M. Hormonal Impact of the 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitor Abiraterone Acetate (CB7630) in Patients with Prostate Cancer. *Br. J. Cancer* **2004**, *90*, 2317-2325.
65. Attard, G.; Belldegrun, A. S.; De Bono, J. S. Selective Blockade of Androgenic Steroid Synthesis by Novel Lyase Inhibitors as a Therapeutic Strategy for Treating Metastatic Prostate Cancer. *BJU Int.* **2005**, *96*, 1241-1246.
66. Attard, G.; Reid, A. H. M.; Barrett, M.; Karavasilis, V.; Molife, R.; Thompson, E.; Parker, C.; Dearnaley, D.; Lee, G.; De Bono, J. S. In *Abiraterone, an Oral, Irreversible CYP450c17 Enzyme Inhibitor Appears to Have Activity in Post-docetaxel Castration Refractory Prostate Cancer (CRPC) Patients (pts)*, American Association for Cancer Research Annual Meeting, Los Angeles, CA, April 14-18, **2007**.

67. Attard, G.; Reid, A. H. M.; Barrett, M.; Karavasilis, V.; Molife, R.; Thompson, E.; Parker, C.; Dearnaley, D.; Lee, G.; De Bono, J. S. In *Inhibition of Androgen Synthesis Results in a High Response Rate in Castration Refractory Prostate Cancer*, American Association for Cancer Research Annual Meeting, Los Angeles, CA, April 14-18, **2007**.
68. Handratta, V. D.; Vasaitis, T. S.; Njar, V. C.; Gediya, L. K.; Kataria, R.; Chopra, P.; Newman, D.; Farquhar, R.; Guo, Z.; Qiu, Y.; Brodie, A. M. Novel C17-Heteroaryl Steroidal CYP17 Inhibitors/Antiandrogens: Synthesis, *in vitro* Biological Activity, Pharmacokinetics, and Antitumor Activity in the LAPC4 Human Prostate Cancer Xenograft Model. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2972-2984.
69. Bruno, R. D.; Njar, V. C. Targeting Cytochrome P450 Enzymes: a New Approach in Anti-cancer Drug Development. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5047-5060.
70. Nakajin, S.; Hall, P. F. Microsomal Cytochrome P-450 from Neonatal Pig Testis. Purification and Properties of a C<sub>21</sub> Steroid Side-chain Cleavage System (17 $\alpha$ -hydroxylase-C<sub>17,20</sub> lyase). *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 3871-3876.
71. Nakajin, S.; Shively, J. E.; Yuan, P. M.; Hall, P. F. Microsomal Cytochrome P-450 from Neonatal Pig Testis: Two Enzymatic Activities (17 $\alpha$ -Hydroxylase and C<sub>17,20</sub>-Lyase) Associated with One Protein. *Biochemistry* **1981**, *20*, 4037-4042.
72. Nakajin, S.; Hall, P. F.; Onoda, M. Testicular Microsomal Cytochrome P-450 for C<sub>21</sub> Steroid Side Chain Cleavage. Spectral and Binding Studies. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 6134-6139.
73. Zuber, M. X.; Simpson, E. R.; Waterman, M. R. Expression of Bovine 17 $\alpha$ -Hydroxylase Cytochrome P-450 cDNA in Nonsteroidogenic (COS 1) Cells. *Science* **1986**, *234*, 1258-1261.
74. Onoda, M.; Haniu, M.; Yanagibashi, K.; Sweet, F.; Shively, J. E.; Hall, P. F. Affinity Alkylation of the Active Site of C<sub>21</sub> Steroid Side-chain Cleavage Cytochrome P-450 from Neonatal Porcine Testis: a Unique Cysteine Residue Alkylated by 17-(Bromoacetoxy)progesterone. *Biochemistry* **1987**, *26*, 657-662.

75. Hall, P. F. Cytochrome P-450 C<sub>21</sub><sub>sc</sub>: One Enzyme with Two Actions: Hydroxylase and Lyase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1991**, *40*, 527-532.
76. Nakajin, S.; Shinoda, M.; Haniu, M.; Shively, J. E.; Hall, P. F. C<sub>21</sub> Steroid Side Chain Cleavage Enzyme From Porcine Adrenal Microsomes. Purification and Characterization of the 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C17,20-Lyase Cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3971-3976.
77. Kominami, S.; Shinzawa, K.; Takemori, S. Purification and Some Properties of Cytochrome P-450 Specific for Steroid 17 $\alpha$ -Hydroxylation and C<sub>17,C20</sub>-bond Cleavage From Guinea Pig Adrenal Microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *109*, 916-921.
78. Perrin, A.; Defaye, G.; Guidicelli, C.; Chambaz, E.M. Purification and Properties of Steroid 17 $\alpha$ -Hydroxylase From Calf Testis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1991**, *40*, 431-435.
79. Betz, G.; Tsai, P.; Hales, D. Reconstitution of Steroid 17,20-Lyase Activity after Separation and Purification of Cytochrome-P-450 and Its Reductase from Rat Testis Microsomes. *Endocrinology* **1980**, *7*, 1055-1060.
80. Brock, B. J.; Waterman, M. R. Biochemical Differences Between Rat and Human Cytochrome P450c17 Support the Different Steroidogenic Needs of These Two Species. *Biochemistry* **1999**, *38*, 1598-1606.
81. Puche, C.; Jose, M.; Cabero, A.; Meseguer, A. Expression and Enzymatic Activity of the P450c17 Gene in Human Adipose Tissue. *Eur. J. Endocrinol.* **2002**, *146*, 223-229.
82. Meunier, B.; Visser, S. P.; Shaik, S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947-3980.
83. Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253-2277.

84. Akhtar, M.; Njar, V. C.; Wright, J. N. Mechanistic Studies on Aromatase and Related C-C Bond Cleaving P-450 Enzymes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *44*, 375-387 e referências aí citadas.
85. Akhtar, M.; Corina, D.; Miller, S.; Shyadehi, A. Z.; Wright, J. N. Mechanism of the Acyl-carbon Cleavage and Related Reactions Catalyzed by Multifunctional P-450s: Studies on Cytochrome P-450<sub>17 $\alpha$</sub> . *Biochemistry* **1994**, *33*, 4410-4418.
86. Akhtar, M.; Wright, J. N.; Shyadehi, A. Z.; Robichaud, P. A Transition From Ionic to Free-radical Mechanisms in Chemistry and Enzymology. *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 2387-2390.
87. Akhtar, M.; Lee-Robichaud, P.; Wright, J. N.; Akhtar, M. E. A Discussion on the Activation of Oxygen in Chemistry and Enzymology. *Biochem. Soc. Trans.* **1998**, *26*, 322-325.
88. Swinney, D. C.; Mak, A. Y. Androgen Formation by Cytochrome P450 CYP17. Solvent Isotope Effect and pL Studies Suggest a Role for Protons in the Regulation of Oxene Versus Peroxide Chemistry. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2185-2190.
89. Akhtar, M.; Lee-Robichaud, P.; Akhtar, M. E.; Wright, J. N. The Impact of Aromatase Mechanism on Other P450s. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *61*, 127-132.
90. Akhtar, M.; Corina, D. L.; Miller, S. L.; Shyadehi, A. Z.; Wright, J. N. Incorporation of Label from <sup>18</sup>O<sub>2</sub> into Acetate during Side-chain Cleavage Catalyzed by Cytochrome P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  (17 $\alpha$ -Hydroxylase-17,20-Lyase). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 263-267.
91. Miller, S. L.; Wright, J. N.; Corina, D. L.; Akhtar, M. Mechanistic Studies on Pregnene Side-chain Cleavage Enzyme (17 $\alpha$ -Hydroxylase-17,20-Lyase) using <sup>18</sup>O. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 157-159.
92. Robichaud, P.; Wright, J. N.; Akhtar, M. The Involvement of An O<sub>2</sub>-derived Nucleophilic Species in Acyl-carbon Cleavage, Catalysed by Cytochrome P-450<sub>17 $\alpha$</sub> : Implications for Related P-450 Catalysed Fragmentation Reactions. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1501-1503.

93. Corina, D. L.; Miller, S. L.; Wright, J. N.; Akhtar, M. The Mechanism of Cytochrome P450 Dependent C-C Bond Cleavage: Studies on 17 $\alpha$ -Hydroxylase-17,20-Lyase. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 782-783.
94. Lee-Robichaud, P.; Akhtar, M. E.; Akhtar, M. An Analysis of The Role of Active Site Protic Residues of Cytochrome P-450s: Mechanistic and Mutational Studies on 17 $\alpha$ -Hydroxylase-17,20-Lyase (P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  also CYP17). *Biochem. J.* **1998**, *330*, 967-974 e referências aí citadas.
95. Barnes, H. J.; Arlotto, M. P.; Waterman, M. R. Expression and Enzymatic Activity of Recombinant Cytochrome P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5597-5601.
96. Chung, B. C.; Picado-Leonard, J.; Haniu, M.; Bienkowski, M.; Hall, P. F.; Shively, J. E.; Miller, W. L. Cytochrome P450c17 (Steroid 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20 Lyase): Cloning of Human Adrenal and Testis cDNAs Indicates the Same Gene is Expressed in Both Tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 407-411.
97. Bradshaw, K. D.; Waterman, M. R.; Couch, R. T.; Simpson, E. R.; Zuber, M. X. Characterization of Complementary Deoxyribonucleic Acid for Human Adrenocortical 17 $\alpha$ -Hydroxylase: a Probe for Analysis of 17 $\alpha$ -Hydroxylase Deficiency. *Mol. Endocrinol.* **1987**, *1*, 348-354.
98. Sparkes, R. S.; Klisak, I.; Miller, W. L. Regional Mapping of Genes Encoding Human Steroidogenic Enzymes: P450<sub>sc</sub> to 15q23-q24, Adrenodoxin to 11q22; Adrenodoxin Reductase to 17q24-q25; and P450c17 to 10q24-q25. *DNA Cell Biol.* **1991**, *10*, 359-365.
99. Fan, Y. S.; Sasi, R.; Lee, C.; Winter, J. S.; Waterman, M. R.; Lin, C. C. Localization of the Human CYP17 gene (cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub> ) to 10q24.3 by Fluorescence *in situ* Hybridization and Simultaneous Chromosome Banding. *Genomics* **1992**, *14*, 1110-1111.
100. Imai, T.; Gliberman, H.; Gertner, J. M.; Kagawa, N.; Waterman, M. R. Expression and Purification of Functional Human 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450c17) in *Escherichia*

- coli*. Use of This System for Study of a Novel Form of Combined  $17\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase Deficiency. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 19681-19689.
101. Yanase, T.; Simpson, E. R.; Waterman, M. R.  $17\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase Deficiency: From Clinical Investigation to Molecular Definition. *Endocr. Rev.* **1991**, 12, 91-108.
102. Fevold, H. R.; Lorence, M. C.; McCarthy, J. L.; Trant, J. M.; Kagimoto, M.; Waterman, M. R.; Mason, J. I. Rat P450<sub>17 $\alpha$</sub>  From Testis: Characterization of a Full-length cDNA Encoding a Unique Steroid Hydroxylase Capable of Catalyzing Both  $\Delta^4$ - and  $\Delta^5$ -Steroid-17,20-Lyase Reactions. *Mol. Endocrinol.* **1989**, 3, 968-975.
103. Sakai, N.; Tanaka, M.; Adachi, S.; Miller, W. L.; Nagahama, Y. Rainbow Trout Cytochrome P-450<sub>c17</sub> ( $17\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase). cDNA Cloning, Enzymatic Properties and Temporal Pattern of Ovarian P-450<sub>c17</sub> mRNA Expression During Oogenesis. *FEBS Lett.* **1992**, 301, 60-64.
104. Kitamura, M.; Buczko, E.; Dufau, M. L. Dissociation of Hydroxylase and Lyase Activities by Site-directed Mutagenesis of the Rat P450<sub>17 $\alpha$</sub> . *Mol. Endocrinol.* **1991**, 5, 1373-1380.
105. Koh, Y.; Buczko, E.; Dufau, M. L. Requirement of Phenylalanine 343 for the Preferential  $\Delta^4$ -Lyase Versus  $\Delta^5$ -Lyase Activity of Rat CYP17. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 18267-18271.
106. Auchus, R. J.; Worthy, K.; Geller, D. H.; Miller, W. L. Probing Structural and Functional Domains of Human P450c17. *Endocr. Res.* **2000**, 26, 695-703.
107. Mathieu, A. P.; Auchus, R. J.; LeHoux, J. G. Molecular Modeling of the Hamster Adrenal P450c17. *Endocr. Res.* **2000**, 26, 723-728.
108. Mathieu, A. P.; Auchus, R. J.; LeHoux, J. G. Comparison of the Hamster and Human Adrenal P450c17 ( $17\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase) Using Site-directed Mutagenesis and Molecular Modeling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2002**, 80, 99-107.
109. Mathieu, A. P.; LeHoux, J. G.; Auchus, R. J. Molecular Dynamics of Substrate Complexes With Hamster Cytochrome P450c17 (CYP17): Mechanistic Approach to Understanding Substrate Binding and Activities. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, 1619, 291-300.

110. Gilep, A. A.; Estabrook, R. W.; Usanov, S. A. Chimerogenesis in Estimation of Specificity and Pathway Directions for Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  Catalyzed Reactions. *Biochemistry* **2004**, *69*, 364-375.
111. Miller, W. L.; Auchus, R. J.; Geller, D. H. The Regulation of 17,20-Lyase Activity. *Steroids* **1997**, *62*, 133-142.
112. Laughton, C. A.; Neidle, S.; Zvelebil, M. J.; Sternberg, M. J. A Molecular Model for The Enzyme Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub> , a Major Target for The Chemotherapy of Prostatic Cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *171*, 1160-1167.
113. Lin, D.; Zhang, L. H.; Chiao, E.; Miller, W. L. Modeling and Mutagenesis of the Active Site of Human P450c17. *Mol. Endocrinol.* **1994**, *8*, 392-402.
114. Burke, D. F.; Laughton, C. A.; Neidle, S. Homology Modelling of the Enzyme P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase - A Target For Prostate Cancer Chemotherapy - From the Crystal Structure of P450BM-3. *Anticancer Drug Des.* **1997**, *12*, 113-123.
115. Lewis, D. F.; Lee-Robichaud, P. Molecular Modelling of Steroidogenic Cytochromes P450 From Families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 Based on the CYP102 Crystal Structure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *66*, 217-233.
116. Auchus, R. J.; Miller, W. L. Molecular Modeling of Human P450c17 (17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase): Insights into Reaction Mechanisms and Effects of Mutations. *Mol. Endocrinol.* **1999**, *13*, 1169-1182.
117. Schappach, A.; Holtje, H. D. Molecular Modelling of 17 $\alpha$ -Hydroxylase-17,20-Lyase. *Pharmazie* **2001**, *56*, 435-442.
118. Yanagibashi, K.; Hall, P. F. Role of Electron Transport in the Regulation of the Lyase Activity of C21 Side-chain Cleavage P-450 From Porcine Adrenal and Testicular Microsomes. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8429-8433.
119. Zhang, L. H.; Rodriguez, H.; Ohno, S.; Miller, W. L. Serine Phosphorylation of Human P450c17 Increases 17,20-Lyase Activity: Implications for Adrenarche and the Polycystic Ovary Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10619-10623.

120. Pandey, A. V.; Mellon, S. H.; Miller, W. L. Protein Phosphatase 2A and Phosphoprotein SET Regulate Androgen Production by P450c17. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2837-2844.
121. Pandey, A. V.; Miller, W. L. Regulation of 17,20-Lyase Activity by Cytochrome *b*<sub>5</sub> and by Serine Phosphorylation of P450c17. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13265-13271 e referências aí citadas.
122. Souter, I.; Munir, I.; Mallick, P.; Weitsman, S. R.; Geller, D. H.; Magoffin, D. A. Mutagenesis of Putative Serine-threonine Phosphorylation Sites Proximal to Arg255 of Human Cytochrome P450c17 Does Not Selectively Promote Its 17,20-Lyase Activity. *Fertil. Steril.* **2006**, *85*, 1290-1299.
123. Geller, D. H.; Auchus, R. J.; Mendonca, B. B.; Miller, W. L. The Genetic and Functional Basis of Isolated 17,20-Lyase Deficiency. *Nat. Genet.* **1997**, *17*, 201-205.
124. Lee-Robichaud, P.; Akhtar, M. E.; Akhtar, M. Lysine Mutagenesis Identifies Cationic Charges of Human CYP17 That Interact With Cytochrome *b*<sub>5</sub> to Promote Male Sex-hormone Biosynthesis. *Biochem. J.* **1999**, *342*, 309-312.
125. Van Den Akker, E. L.; Koper, J. W.; Boehmer, A. L.; Themmen, A. P.; Verhoef-Post, M.; Timmerman, M. A.; Otten, B. J.; Drop, S. L.; De Jong, F. H. Differential Inhibition of 17 $\alpha$ -Hydroxylase and 17,20-Lyase Activities by Three Novel Missense CYP17 Mutations Identified in Patients With P450c17 Deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 5714-5721.
126. Sherbet, D. P.; Tiosano, D.; Kwist, K. M.; Hochberg, Z.; Auchus, R. J. CYP17 Mutation E305G Causes Isolated 17,20-Lyase Deficiency by Selectively Altering Substrate Binding. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48563-48569.
127. Dharia, S.; Slane, A.; Jian, M.; Conner, M.; Conley, A. J.; Parker, C. R. Colocalization of P450c17 and Cytochrome *b*<sub>5</sub> in Androgen-synthesizing Tissues of the Human. *Biol. Reprod.* **2004**, *71*, 83-88.



128. Akhtar, M. K.; Kelly, S. L.; Kaderbhai, M. A. Cytochrome *b*<sub>5</sub> Modulation of 17 $\alpha$ -Hydroxylase and 17,20-lyase (CYP17) Activities in Steroidogenesis. *J. Endocrinol.* **2005**, *187*, 267-274.
129. Naffin-Olivos, J. L.; Auchus, R. J. Human Cytochrome *b*<sub>5</sub> Requires Residues E48 and E49 to Stimulate the 17,20-Lyase Activity of Cytochrome P450c17. *Biochemistry* **2006**, *45*, 755-762.
130. Lin, D.; Black, S. M.; Nagahama, Y.; Miller, W. L. Steroid 17 $\alpha$ -Hydroxylase and 17,20-Lyase Activities of P450c17: Contributions of Serine106 and P450 Reductase. *Endocrinology* **1993**, *132*, 2498-2506.
131. Arlt, W.; Walker, E. A.; Draper, N.; Ivison, H. E.; Ride, J. P.; Hammer, F.; Chalder, S. M.; Borucka-Mankiewicz, M.; Hauffa, B. P.; Malunowicz, E. M.; Stewart, P. M.; Shackleton, C. H. Congenital Adrenal Hyperplasia Caused by Mutant P450 Oxidoreductase and Human Androgen Synthesis: Analytical Study. *Lancet* **2004**, *363*, 2128-2135.
132. Fluck, C. E.; Tajima, T.; Pandey, A. V.; Arlt, W.; Okuhara, K.; Verge, C. F.; Jabs, E. W.; Mendonca, B. B.; Fujieda, K.; Miller, W. L. Mutant P450 Oxidoreductase Causes Disordered Steroidogenesis With and Without Antley-Bixler Syndrome. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 228-230.
133. Huang, N.; Pandey, A. V.; Agrawal, V.; Reardon, W.; Lapunzina, P. D.; Mowat, D.; Jabs, E. W.; Vliet, G. V.; Sack, J.; Fluck, C. E.; Miller, W. L. Diversity and Function of Mutations in P450 Oxidoreductase in Patients with Antley-Bixler Syndrome and Disordered Steroidogenesis. *Am. J. Hum. Genet.* **2005**, *76*, 729-749.
134. Geller, D. H.; Auchus, R. J.; Miller, W. L. P450c17 Mutations R347H and R358Q Selectively Disrupt 17,20-Lyase Activity by Disrupting Interactions With P450 Oxidoreductase and Cytochrome *b*<sub>5</sub>. *Mol. Endocrinol.* **1999**, *13*, 167-175.
135. Auchus, R. J. The Genetics, Pathophysiology, and Management of Human Deficiencies of P450c17. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2001**, *30*, 101-119.

136. Lee-Robichaud, P.; Wright, J. N.; Akhtar, M. E.; Akhtar, M. Modulation of the Activity of Human  $17\alpha$ -Hydroxylase-17,20-Lyase (CYP17) by Cytochrome  $b_5$ : Endocrinological and Mechanistic Implications. *Biochem. J.* **1995**, *308*, 901-908.
137. Katagiri, M.; Kagawa, N.; Waterman, M. R. The role of Cytochrome  $b_5$  in the Biosynthesis of Androgens by Human P450c17. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *317*, 343-347.
138. Auchus, R. J.; Lee, T. C.; Miller, W. L. Cytochrome  $b_5$  Augments the 17,20-Lyase Activity of Human P450c17 Without Direct Electron Transfer. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 3158-3165.
139. Clement, O. O.; Freeman, C. M.; Hartmann, R. W.; Handratta, V. D.; Vasaitis, T. S.; Brodie, A. M.; Njar, V. C. Three Dimensional Pharmacophore Modeling of Human CYP17 Inhibitors. Potential Agents for Prostate Cancer Therapy. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2345-2351.
140. Cavalli, A.; Recanatini, M. Looking for Selectivity Among Cytochrome P450s Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 251-254.
141. Schappach, A.; Holtje, H. D. Investigations on Inhibitors of Human  $17\alpha$ -Hydroxylase-17,20-Lyase and Their Interactions With the Enzyme. Molecular Modelling of  $17\alpha$ -Hydroxylase-17,20-Lyase, Part II. *Pharmazie* **2001**, *56*, 835-842.
142. Barrie, S. E.; Jarman, M. Inhibitors of Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  ( $17\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-lyase). *Endocr. Relat. Cancer* **1996**, *3*, 25-39.
143. Jarman, M.; Smith, H. J.; Nicholls, P. J.; Simons, C. Inhibitors of Enzymes of Androgen Biosynthesis: Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  and  $5\alpha$ -Steroid Reductase. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 495-512.
144. Njar, V. C.; Brodie, A. M. Inhibitors of  $17\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17): Potential Agents for the Treatment of Prostate Cancer. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, *5*, 163-180.
145. Hartmann, R. W.; Ehmer, P. B.; Haidar, S.; Hector, M.; Jose, J.; Klein, C. D.; Seidel, S. B.; Sergejew, T. F.; Wachall, B. G.; Wachter, G. A.; Zhuang, Y. Inhibition of CYP 17, a New

- Strategy for the Treatment of Prostate Cancer. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, 335, 119-128.
146. Schneider, G.; Wolfling, J. Synthetic Cardenolides and Related Compounds. *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 1381-1403.
147. Leroux, F. Inhibition of P450 17 as a New Strategy for the Treatment of Prostate Cancer. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 1623-1629.
148. Hakki, T.; Bernhardt, R. CYP17- and CYP11B-dependent Steroid Hydroxylases as Drug Development Targets. *Pharmacol. Ther.* **2006**, 111, 27-52.
149. Baston, E.; Leroux, F. Inhibitors of Steroidal Cytochrome P450 Enzymes as Targets For Drug Development. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2007**, 2, 31-58.
150. Moreira, V. M.; Salvador, J. A. R.; Vasaitis, T. S.; Njar, V. C. CYP17 Inhibitors for Prostate Cancer Treatment - An Update. *Curr. Med. Chem.* **2008**, em impressão.
151. Arth, G. E.; Patchett, A. A.; Jefopoulos, T.; Bugianesi, R. L.; Peterson, L. H.; Ham, E. A.; Kuehl, F. A.; Brink, N. G. Steroidal Androgen Biosynthesis Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1971**, 14, 675-679.
152. DeFelice, R.; Johnson, D. G.; Galgiani, J. N. Gynecomastia with ketoconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, 19, 1073-1074.
153. Pont, A.; Williams, P. L.; Azhar, S.; Reitz, R. E.; Bochra, C.; Smith, E. R.; Stevens, D. A. Ketoconazole Blocks Testosterone Synthesis. *Arch. Intern. Med.* **1982**, 142, 2137-2140.
154. Rotstein, D. M.; Kertesz, D. J.; Walker, K. A.; Swinney, D. C. Stereoisomers of Ketoconazole: Preparation and Biological Activity. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2818-2825.
155. Trachtenberg, J. The Effects of Ketoconazole on Testosterone Production and Normal and Malignant Androgen Dependent Tissues of the Adult Rat. *J. Urol.* **1984**, 132, 599-601.
156. Rajfer, J.; Sikka, S. C.; Xie, H. W.; Swerdloff, R. S. Effect of *in vitro* Ketoconazole on Steroid Production in Rat Testis. *Steroids* **1985**, 46, 867-881.
157. Sikka, S. C.; Swerdloff, R. S.; Rajfer, J. *In vitro* Inhibition of Testosterone Biosynthesis by Ketoconazole. *Endocrinology* **1985**, 116, 1920-1925.

158. De Coster, R.; Coene, M. C.; Van Camp, C.; Van Camp, K.; Beerens, D.; Cools, W. Comparative Effects of Ketoconazole on Rat, Dog and Human Testicular Steroidogenesis. *J. Enzyme Inhib.* **1989**, *2*, 261-268.
159. Santen, R. J.; Vanden Bossche, H.; Symoens, J.; Brugmans, J.; De Coster, R. Site of Action of Low Dose Ketoconazole on Androgen Biosynthesis in Men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1983**, *57*, 732-736.
160. Trachtenberg, J.; Zadra, J. Steroid Synthesis Inhibition by Ketoconazole: Sites of Action. *Clin. Invest. Med.* **1988**, *11*, 1-5.
161. Grosso, D. S.; Boyden, T. W.; Pamenter, R. W.; Johnson, D. G.; Stevens, D. A.; Galgiani, J. N. Ketoconazole Inhibition of Testicular Secretion of Testosterone and Displacement of Steroid Hormones From Serum Transport Proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *23*, 207-212.
162. Kan, P. B.; Hirst, M. A.; Feldman, D. Inhibition of Steroidogenic Cytochrome P-450 Enzymes in Rat Testis by Ketoconazole and Related Imidazole Anti-fungal Drugs. *J. Steroid Biochem.* **1985**, *23*, 1023-1029.
163. De Coster, R.; Caers, I.; Coene, M. C.; Amery, W.; Beerens, D.; Haelterman, C. Effects of High Dose Ketoconazole Therapy on the Main Plasma Testicular and Adrenal Steroids in Previously Untreated Prostatic Cancer Patients. *Clin. Endocrinol.* **1986**, *24*, 657-664.
164. Loose, D. S.; Kan, P. B.; Hirst, M. A.; Marcus, R. A.; Feldman, D. Ketoconazole Blocks Adrenal Steroidogenesis by Inhibiting Cytochrome P450-dependent Enzymes. *J. Clin. Invest.* **1983**, *71*, 1495-1499.
165. Beetens, J. R.; Loots, W.; Somers, Y.; Coene, M. C.; De Clerck, F. Ketoconazole Inhibits the Biosynthesis of Leukotrienes *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Pharmac.* **1986**, *35*, 883-891.
166. Trachtenberg, J.; Pont, A. Ketoconazole Therapy for Advanced Prostate Cancer. *Lancet* **1984**, *2*, 433-435.
167. Moffat, L. E.; Kirk, D.; Tolley, D. A.; Smith, M. F.; Beastall, G. Ketoconazole as Primary Treatment of Prostatic Cancer. *Br. J. Urol.* **1988**, *61*, 439-440.

168. Mahler, C.; Verhelst, J.; Denis, L. Ketoconazole and Liarozole in the Treatment of Advanced Prostatic Cancer. *Cancer* **1993**, *71*, 1068-1073.
169. Muscato, J. J.; Ahmann, T. A.; Johnson, K. M.; Wilding, W.; Monaghan, G.; Schlossman, D. M. Optimal Dosing of Ketoconazole (KETO) and Hydrocortisone (HC) Leads to Long Responses in Hormone Refractory Prostate Cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1994**, *13*, 229.
170. Lake-Bakaar, G.; Scheuer, P. J.; Sherlock, S. Hepatic Reactions Associated With Ketoconazole in the United Kingdom. *BMJ* **1987**, *294*, 419-422.
171. Nakabayashi, M.; Xie, W.; Regan, M. M.; Jackman, D. M.; Kantoff, P. W.; Oh, W. K. Response to Low-dose Ketoconazole and Subsequent Dose Escalation to High-dose Ketoconazole in Patients With Androgen-independent Prostate Cancer. *Cancer* **2006**, *107*, 975-981.
172. Heeres, J.; Backx, L. J.; Mostmans, J. H.; Cutsem, J. V. Antimycotic Imidazoles. Part 4. Synthesis and Antifungal Activity of Ketoconazole, a New Potent Orally Active Broad-spectrum Antifungal Agent. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1003-1005.
173. Ahmed, S.; Keane, J. Modeling Study of Some Inhibitors of 17,20-Lyase, a Component of the Enzyme 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase: a Novel Approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *253*, 273-276.
174. Ahmed, S. A Novel Molecular Modelling Study of Inhibitors of the 17 $\alpha$ -Hydroxylase Component of the Enzyme System 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (P-450<sub>17 $\alpha$</sub> ). *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1487-1496.
175. Ayub, M.; Levell, M. J. Inhibition of Testicular 17 $\alpha$ -Hydroxylase and 17,20-Lyase but not 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-isomerase or 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Oxidoreductase by Ketoconazole and Other Imidazole Drugs. *J. Steroid Biochem.* **1987**, *28*, 521-531.
176. Al-Hamrouni, A. M.; Ahmadi, M.; Nicholls, P. J.; Smith, H. J.; Lombardi, P.; Pestellini, V. 1-[(Benzofuran-2-yl)phenylmethyl] Imidazoles as Inhibitors of 17 $\alpha$ -hydroxylase: 17,20-lyase (P450 17): Species and tissue differences. *Pharmaceutical Sci.* **1997**, *3*, 259-263.

177. Bahshwan, S. A.; Owen, C. P.; Nicholls, P. J.; Smith, H. J.; Masoud, A. Some 1-[(Benzofuran-2-yl)methyl] Imidazoles as Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase: 17,20-Lyase (P450 17) and Their Specificity Patterns. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, *50*, 1109-1116.
178. Zhuang, Y.; Hartmann, R. W. Synthesis and Evaluation of Azole-substituted 2-Aryl-6-methoxy-3,4-dihydronaphthalenes and -naphthalenes as Inhibitors of 17 $\alpha$ -hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-lyase (P450 17). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1999**, *332*, 25-30.
179. Ideyama, Y.; Kudoh, M.; Tanimoto, K.; Susaki, Y.; Nanya, T.; Nakahara, T.; Ishikawa, H.; Yoden, T.; Okada, M.; Fujikura, T.; Akaza, H.; Shikama, H. Novel Nonsteroidal Inhibitor of Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  (17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase), YM116, Decreased Prostatic Weights by Reducing Serum Concentrations of Testosterone and Adrenal Androgens in Rats. *Prostate* **1998**, *37*, 10-18.
180. Ideyama, Y.; Kudoh, M.; Tanimoto, K.; Susaki, Y.; Nanya, T.; Nakahara, T.; Ishikawa, H.; Fujikura, T.; Akaza, H.; Shikama, H. YM116, 2-(1*H*-Imidazol-4-ylmethyl)-9*H*-carbazole, Decreases Adrenal Androgen Synthesis by Inhibiting C<sub>17,20</sub>- Lyase Activity in NCI-H295 Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **1999**, *79*, 213-220.
181. Wachter, G. A.; Hartmann, R. W.; Sergejew, T.; Grun, G. L.; Ledergerber, D. Tetrahydronaphthalenes: Influence of Heterocyclic Substituents on Inhibition of Steroid Enzymes P450 arom and P450 17. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 834-841.
182. Hartmann, R. W.; Frotscher, M.; Ledergerber, D.; Wachter, G. A.; Grun, G. L.; Sergejew, T. F. Synthesis and Evaluation of Azole-substituted Tetrahydronaphthalenes as Inhibitors of P450 arom, P450 17, and P450 TxA<sub>2</sub>. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1996**, *329*, 251-261.
183. Hartmann, R. W.; Wachall, B. G.; Yoshihama, M.; Nakakoshi, M.; Nomoto, S.; Ikeda, Y. Novel Dihydronaphthalene Compounds and Processes of Producing the Same. *US Patent* 0032211 A1, **2002**.
184. Hartmann, R. W.; Paluszczak, A.; Lacan, F.; Ricci, G.; Ruzziconi, R. CYP 17 and CYP 19 Inhibitors. Evaluation of Fluorine Effects on the Inhibiting Activity of Regioselectively

- Fluorinated 1-(Naphthalen-2-ylmethyl)imidazoles. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2004**, *19*, 145-155.
185. Wachall, B. G.; Hector, M.; Zhuang, Y.; Hartmann, R. W. Imidazole Substituted Biphenyls: a New Class of Highly Potent and *in vivo* Active Inhibitors of P450 17 as Potential Therapeutics for Treatment of Prostate Cancer. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1913-1924.
186. Leroux, F.; Hutschenreuter, T. U.; Charriere, C.; Scopelliti, R.; Hartmann, R. W. *N*-(4-Biphenylmethyl)imidazoles as Potential Therapeutics For the Treatment of Prostate Cancer: Metabolic Robustness Due to Fluorine Substitution? *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2671-2686.
187. Bild, T.; Jose, J.; Hartmann, R. W. Discovery of Inhibitors of MCF-7 Tumor Cell Adhesion to Endothelial Cells and Investigation on Their Mode of Action. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2004**, *337*, 687-694.
188. Zhuang, Y.; Wachall, B. G.; Hartmann, R. W. Novel Imidazolyl and Triazolyl Substituted Biphenyl Compounds: Synthesis and Evaluation as Nonsteroidal Inhibitors of Human 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C17, 20-Lyase (P450 17). *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1245-1252.
189. Matsunaga, N.; Kaku, T.; Itoh, F.; Tanaka, T.; Hara, T.; Miki, H.; Iwasaki, M.; Aono, T.; Yamaoka, M.; Kusaka, M.; Tasaka, A. C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors I. Structure-based De Novo Design and SAR Study of C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2251-2273.
190. Matsunaga, N.; Kaku, T.; Ojida, A.; Tanaka, T.; Hara, T.; Yamaoka, M.; Kusaka, M.; Tasaka, A. C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors. Part 2: Design, Synthesis and Structure-activity Relationships of (2-Naphthylmethyl)-1*H*-imidazoles as Novel C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4313-4336.
191. Owen, C. P.; Dhanani, S.; Patel, C. H.; Shahid, I.; Ahmed, S. Synthesis and Biochemical Evaluation of a Range of Potent Benzyl Imidazole-based Compounds as Potential

- Inhibitors of the Enzyme Complex 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> ). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4011-4015.
192. Patel, C. H.; Dhanani, S.; Owen, C. P.; Ahmed, S. Synthesis, Biochemical Evaluation and Rationalisation of the Inhibitory Activity of Range of 4-Substituted Phenyl Alkyl Imidazole-based Inhibitors of the Enzyme Complex 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> ). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4752-4756.
193. McCague, R.; Rowlands, M. G.; Barrie, S. E.; Houghton, J. Inhibition of Enzymes of Estrogen and Androgen Biosynthesis by Esters of 4-Pyridylacetic Acid. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 3050-3055.
194. Chan, F.; Jarman, M.; Potter, G. A. Substituted Pyridines, Their Preparation and Pharmaceutical Use. *GB Patent 2 266 887 A*, **1993**.
195. Rowlands, M. G.; Barrie, S. E.; Chan, F.; Houghton, J.; Jarman, M.; McCague, R.; Potter, G. A. Esters of 3-Pyridylacetic Acid That Combine Potent Inhibition of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase (Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub> ) With Resistance to Esterase Hydrolysis. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4191-4197.
196. Chan, F. C.; Potter, G. A.; Barrie, S. E.; Haynes, B. P.; Rowlands, M. G.; Houghton, J.; Jarman, M. 3- and 4-Pyridylalkyl Adamantanecarboxylates: Inhibitors of Human Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  (17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase). Potential Nonsteroidal Agents For the Treatment of Prostatic Cancer. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3319-3323.
197. Barrie, S. E.; Haynes, B. P.; Potter, G. A.; Chan, F. C.; Goddard, P. M.; Dowsett, M.; Jarman, M. Biochemistry and Pharmacokinetics of Potent Non-steroidal Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  Inhibitors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *60*, 347-351.
198. Cherry, P. C.; Cocker, J. D.; Searle, A. D. Carbazole Derivatives With 17,20-Lyase Inhibiting Activity. *WO Patent 94/27989*, **1994**.
199. Sergejew, T.; Hartmann, R. W. Pyridyl Substituted Benzocycloalkenes: New Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450 17 $\alpha$ ). *J. Enzyme Inhib.* **1994**, *8*, 113-122.



200. Barrie, S. E.; Rowlands, M. G.; Foster, A. B.; Jarman, M. Inhibition of  $17\alpha$ -Hydroxylase/ $C_{17,20}$ -Lyase by Bifluranl and Its Analogues. *J. Steroid Biochem.* **1989**, *33*, 1191-1195.
201. Jarman, M.; Barrie, S. E.; Deadman, J. J.; Houghton, J.; McCague, R.; Rowlands, M. G. Hydroxyperfluoroazobenzenes: Novel Inhibitors of Enzymes of Androgen Biosynthesis. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2452-2455.
202. Ahmed, S.; Smith, J. H.; Nicholls, P. J.; Whomsley, R.; Cariuk, P. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Pyrrolidine-2,5-dione Inhibitors as Potential Anti-tumour Agents. *Drug Des. Discov.* **1995**, *12*, 275-287.
203. Hartmann, R. W.; Wachter, G. A.; Sergejew, T.; Wurtz, R.; Duerkop, J. 4,5-Dihydro-3-(2-Pyrazinyl)Naphtho[1,2-*c*]Pyrazole - a Potent and Selective Inhibitor of Steroid- $17\alpha$ -Hydroxylase- $C_{17,20}$ -Lyase (P450 17). *Arch. Pharm.* **1995**, *328*, 573-575.
204. Zhuang, Y.; Zapp, J.; Hartmann, R. W. Synthesis of *Z*- and *E*-1-Methyl-2-(1-hydroximinoethyl)-6-methoxy-3,4-dihydronaphthalene and Evaluation as Inhibitors of  $17\alpha$ -Hydroxylase- $C_{17,20}$ -Lyase (P450 17). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1997**, *330*, 359-361.
205. Zhuang, Y.; Hartmann, R. W. Synthesis of Novel Oximes of 2-Aryl-6-methoxy-3,4-dihydronaphthalene and Their Evaluation as Inhibitors of  $17\alpha$ -Hydroxylase- $C_{17,20}$ -Lyase (P450 17). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1998**, *331*, 36-40.
206. Recanatini, M.; Bisi, A.; Cavalli, A.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Rampa, A.; Valenti, P.; Palzer, M.; Paluszczak, A.; Hartmann, R. W. A New Class of Nonsteroidal Aromatase Inhibitors: Design and Synthesis of Chromone and Xanthone Derivatives and Inhibition of the P450 Enzymes Aromatase and  $17\alpha$ -Hydroxylase/ $C_{17,20}$ -Lyase. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 672-680.
207. Canton, R. F.; Sanderson, J. T.; Nijmeijer, S.; Bergman, A.; Letcher, R. J.; Van Den Berg, M. *In vitro* Effects of Brominated Flame Retardants and Metabolites on CYP17 Catalytic Activity: A Novel Mechanism of Action? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *216*, 274-281.

208. Nakajin, S.; Takahashi, K.; Shinoda, M. Inhibitory Effect and Interaction of Stanozolol With Pig Testicular Cytochrome P-450 (17 $\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-lyase). *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 1855-1858.
209. Angelastro, M. R.; Laughlin, M. E.; Schatzman, G. L.; Bey, P.; Blohm, T. R. 17 $\beta$ -(Cyclopropylamino)-androst-5-en-3 $\beta$ -ol, A Selective Mechanism-based Inhibitor of Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  (Steroid 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *162*, 1571-1577.
210. Angelastro, M. R.; Blohm, T. R. 4-Substituted 17 $\beta$ -(cyclopropyloxy)androst-5-en-3 $\beta$ -ol and Related Compounds Useful as C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors. *US Pat* 4,966,897, **1990**.
211. Angelastro, M. R.; Marquart, A. L.; Weintraub, P. M.; Gates, C. A.; Laughlin, M. E.; Blohm, T. R.; Peet, N. P. Time-dependent Inactivation of Steroid C<sub>17(20)</sub>-Lyase by 17 $\beta$ -Cyclopropyl Ether-substituted Steroids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 97-100.
212. Weintraub, P. M.; Gates, C.; Angelastro, M. R.; Flynn, G. A. Process For the Preparation of 4-Amino- $\Delta^4$ -3-ketosteroids Via Nitro- $\Delta^4$ -3-ketosteroids. *WO Patent* 95/29932, **1995**.
213. Weintraub, P. M.; Gates, C. A.; Angelastro, M. R.; Curran, T. T.; Johnston, J. O. 4-Amino-17 $\beta$ -(Cyclopropyloxy)androst-4-en-3-one, 4-Amino-17 $\beta$ -(Cyclopropylamino)androst-4-en-3-one and Related Compounds as C<sub>17,20</sub>-Lyase and 5 $\alpha$ -Reductase. *US Patent* 5,486,511, **1996**.
214. Wilson, S. R.; Miao, E. Anti-testosterone compounds and Method of Use Thereof. *WO Patent* 92/15604, **1992**.
215. Potter, G. A.; Barrie, S. E.; Jarman, M.; Rowlands, M. G. Novel Steroidal Inhibitors of Human Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  (17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase): Potential Agents For the Treatment of Prostatic Cancer. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2463-2471.
216. Barrie, S. E.; Jarman, M.; Potter, G. A.; Hardcastle, I. R. 17-Substituted Steroids Useful in Cancer Treatment. *US Patent* 5,604, 213, **1997**.

217. Jarman, M.; Barrie, S. E.; Llera, J. M. The 16,17-Double Bond is Needed For Irreversible Inhibition of Human Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  by Abiraterone (17-(3-Pyridyl)androsta-5, 16-dien-3 $\beta$ -ol) and Related Steroidal Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5375-5381.
218. Barrie, S. E.; Potter, G. A.; Goddard, P. M.; Haynes, B. P.; Dowsett, M.; Jarman, M. Pharmacology of Novel Steroidal Inhibitors of Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  (17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *50*, 267-273.
219. Haidar, S.; Ehmer, P. B.; Hartmann, R. W. Novel Steroidal Pyrimidyl Inhibitors of P450 17 (17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2001**, *334*, 373-374.
220. Haidar, S.; Ehmer, P. B.; Barassin, S.; Batzl-Hartmann, C.; Hartmann, R. W. Effects of Novel 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17, 20</sub>-Lyase (P450 17, CYP 17) Inhibitors on Androgen Biosynthesis *in vitro* and *in vivo*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *84*, 555-562.
221. Burkhart, J. P.; Gates, C. A.; Laughlin, M. E.; Resvick, R. J.; Peet, N. P. Inhibition of Steroid C<sub>17(20)</sub>-Lyase With C17-Heteroaryl Steroids. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1411-1420.
222. Peet, N. P.; Burkhart, J. P.; Gates, C. 16-Unsaturated C17 Heterocyclic Steroids Useful as Steroid C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors. *US Patent 5,677,293*, **1997**.
223. Peet, N. P.; Burkhart, J. P.; Gates, C. Methods and Compositions using  $\Delta^{16}$ -Unsaturated C17-Heterocyclic Steroids Useful as C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors. *US Patent 5,977,094*, **1999**.
224. Ling, Y. Z.; Li, J. S.; Liu, Y.; Kato, K.; Klus, G. T.; Brodie, A. 17-Imidazolyl, Pyrazolyl, and Isoxazolyl Androstene Derivatives. Novel Steroidal Inhibitors of Human Cytochrome C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> ). *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3297-3304.
225. Brodie, A.; Yangzhi, L. Androgen Synthesis Inhibitors. *US Patent 6,133,280*, **2000**.
226. Klus, G. T.; Nakamura, J.; Li, J. S.; Ling, Y. Z.; Son, C.; Kemppainen, J. A.; Wilson, E. M.; Brodie, A. M. Growth Inhibition of Human Prostate Cells *in vitro* by Novel Inhibitors of Androgen Synthesis. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 4956-4964.

227. Nnane, I. P.; Kato, K.; Liu, Y.; Lu, Q.; Wang, X.; Ling, Y. Z.; Brodie, A. Effects of Some Novel Inhibitors of C<sub>17,20</sub>-Lyase and 5 $\alpha$ -Reductase *in vitro* and *in vivo* and Their Potential Role in the Treatment of Prostate Cancer. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 3826-3832.
228. Long, B. J.; Grigoryev, D. N.; Nnane, I. P.; Liu, Y.; Ling, Y. Z.; Brodie, A. M. Antiandrogenic Effects of Novel Androgen Synthesis Inhibitors on Hormone-dependent Prostate Cancer. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6630-6640.
229. Nnane, I. P.; Long, B. J.; Ling, Y. Z.; Grigoryev, D. N.; Brodie, A. M. Anti-tumour Effects and Pharmacokinetic Profile of 17-(5'-Isoxazolyl)androsta-4,16-dien-3-one (L-39) in Mice: An Inhibitor of Androgen Synthesis. *Br. J. Cancer* **2000**, *83*, 74-82.
230. Nnane, I. P.; Njar, V. C. O.; Brodie, A. M. H. Pharmacokinetics of Novel Inhibitors of Androgen Synthesis After Intravenous Administration in Mice. *Cancer Chemother. Pharmac.* **2003**, *51*, 519-524.
231. Zhu, N.; Ling, Y.; Lei, X.; Handratta, V.; Brodie, A. M. Novel P450<sub>17 $\alpha$</sub>  Inhibitors: 17-(2'-Oxazolyl)- and 17-(2'-Thiazolyl)-androstene Derivatives. *Steroids* **2003**, *68*, 603-611.
232. Wolfling, J.; Oravec, E. A.; Ondre, D.; Mernyak, E.; Schneider, G.; Toth, I.; Szecsi, M.; Julesz, J. Stereoselective Synthesis of Some 17 $\beta$ -Dihydrooxazinyl Steroids, as Novel Presumed Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase. *Steroids* **2006**, *71*, 809-816.
233. Njar, V. C.; Klus, G. T.; Brodie, A. M. H. Nucleophilic Vinylic "Addition-elimination" Substitution Reaction of 3 $\beta$ -Acetoxy-17-chloro-16-formylandrosta-5,16-diene: A Novel and General Route to 17-Substituted Steroids. Part 1 - Synthesis of Novel 17-Azoly- $\Delta^{16}$ -steroids; Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (17 $\alpha$ -Lyase). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2777-2782.
234. Njar, V. C.; Kato, K.; Nnane, I. P.; Grigoryev, D. N.; Long, B. J.; Brodie, A. M. Novel 17-Azoly Steroids, Potent Inhibitors of Human Cytochrome 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> ): Potential Agents for the Treatment of Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 902-912.

235. Brodie, A.; Njar, V. C. 17-Azolyl Steroids Useful as Androgen Synthesis Inhibitors. *US Patent* 6,200,965 B1, **2001**.
236. Handratta, V. D.; Jelovac, D.; Long, B. J.; Kataria, R.; Nnane, I. P.; Njar, V. C.; Brodie, A. M. Potent CYP17 Inhibitors: Improved Syntheses, Pharmacokinetics and Anti-tumor Activity in the LNCaP Human Prostate Cancer Model. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *92*, 155-165.
237. Brodie, A.; Njar, V. C. Novel C-17-Heteroaryl Steroidal CYP17 Inhibitors/Antiandrogens: Synthesis, *in vitro* Biological Activities, Pharmacokinetics and Antitumor Activity. *WO Patent* 2006/093993, **2006**.
238. Grigoryev, D. N.; Long, B. J.; Nnane, I. P.; Njar, V. C.; Liu, Y.; Brodie, A. M. Effects of New 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors on LNCaP Prostate Cancer Cell Growth *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Cancer* **1999**, *81*, 622-630.
239. Nnane, I. P.; Njar, V. C.; Liu, Y.; Lu, Q.; Brodie, A. M. Effects of Novel 17-Azolyl Compounds on Androgen Synthesis *in vitro* and *in vivo*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *71*, 145-152.
240. Nnane, I. P.; Njar, V. C.; Brodie, A. A. Pharmacokinetic Profile of 3 $\beta$ -Hydroxy-17-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)androsta-5,16-diene (VN/87-1), A Potent Androgen Synthesis Inhibitor, in Mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *78*, 241-246.
241. Sheets, J. J.; Zuber, M. X.; McCarthy, J. L.; Vickery, L. E.; Waterman, M. R. Discriminatory Inhibition of Adrenocortical 17 $\alpha$ -Hydroxylase Activity by Inhibitors of Cholesterol Side Chain Cleavage Cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *242*, 297-305.
242. Brodie, A.; Jisong, L. 20-Substituted Pregnene Derivatives and Their Use as Androgen Inhibitors. *US Patent* 5,264,427, **1993**.
243. Li, J. S.; Li, Y.; Son, C.; Brodie, A. M. Synthesis and Evaluation of Pregnane Derivatives as Inhibitors of Human Testicular 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4335-4339.

244. Li, J.; Li, Y.; Son, C.; Banks, P.; Brodie, A. 4-Pregnene-3-one-20  $\beta$ -carboxaldehyde: A Potent Inhibitor of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase and of 5 $\alpha$ -Reductase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1992**, *42*, 313-320.
245. Hartmann, R. W.; Hector, M.; Haidar, S.; Ehmer, P. B.; Reichert, W.; Jose, J. Synthesis and Evaluation of Novel Steroidal Oxime Inhibitors of P450 17 (17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase) and 5 $\alpha$ -Reductase Types 1 and 2. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4266-4277.
246. Haidar, S.; Klein, C. D.; Hartmann, R. W. Synthesis and Evaluation of Steroidal Hydroxamic Acids as Inhibitors of P450 17 (17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2001**, *334*, 138-140.
247. Njar, V. C.; Hector, M.; Hartmann, R. W. 20-Amino and 20,21-Aziridinyl Pregnene Steroids: Development of Potent Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450 17). *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1447-1453.
248. Hartmann, R. W.; Hector, M.; Wachall, B. G.; Paluszczak, A.; Palzer, M.; Huch, V.; Veith, M. Synthesis and Evaluation of 17-Aliphatic Heterocycle-substituted Steroidal Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450 17). *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4437-4445.
249. Neubauer, B. L.; Best, K. L.; Blohm, T. R.; Gates, C.; Goode, R. L.; Hirsch, K. S.; Laughlin, M. E.; Petrow, V.; Smalstig, E. B.; Stamm, N. B.; Toomey, R. E.; Hoover, D. M. LY207320 (6-Methylene-4-pregnene-3,20-dione) Inhibits Testosterone Biosynthesis, Androgen Uptake, 5 $\alpha$ -Reductase, and Produces Prostatic Regression in Male-Rats. *Prostate* **1993**, *23*, 181-199.
250. Haidar, S.; Hartmann, R. W. C16 and C17 Substituted Derivatives of Pregnenolone and Progesterone as Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17, 20</sub>-Lyase: Synthesis and Biological Evaluation. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, *335*, 526-534.
251. Njar, V. C.; Klus, G. T.; Johnson, H. H.; Brodie, A. M. Synthesis of Novel 21-Trifluoropregnane Steroids: Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (17 $\alpha$ -Lyase). *Steroids* **1997**, *62*, 468-473.

252. Burkhart, J. P.; Weintraub, P. M.; Gates, C. A.; Resvick, R. J.; Vaz, R. J.; Friedrich, D.; Angelastro, M. R.; Bey, P.; Peet, N. P. Novel Steroidal Vinyl Fluorides as Inhibitors of Steroid C<sub>17(20)</sub>-Lyase. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 929-934.
253. Peet, N. P.; Weintraub, P. M.; Burkhart, J. P.; Gates, C. 20-Fluoro-17(20)-Vinyl Steroids. *US Patent* 6,413,951 B2, **2002**.
254. Peet, N. P.; Weintraub, P. M.; Burkhart, J. P.; Gates, C. 20-Fluoro-17(20)-Vinyl steroids as Inhibitors of C<sub>17,20</sub>-Lyase and 5 $\alpha$ -Reductase. *WO Patent* 02/00681 A1, **2002**.
255. Weintraub, P. M.; Holland, A. K.; Gates, C. A.; Moore, W. R.; Resvick, R. J.; Bey, P.; Peet, N. P. Synthesis of 21,21-Difluoro-3 $\beta$ -hydroxy-20-methylpregna-5,20-diene and 5,16,20-Triene as Potential Inhibitors of Steroid C<sub>17(20)</sub>-Lyase. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 427-431.
256. Sanchez, P. E.; Ryan, M. A.; Kridelka, F.; Gielen, I.; Ren, S. G.; Albertson, B.; Malozowski, S.; Nieman, L.; Cassorla, F. RU-486 Inhibits Rat Gonadal Steroidogenesis. *Horm. Metab. Res.* **1989**, *21*, 369-371.
257. Deadman, J. J.; McCague, R.; Jarman, M. Heptafluoro-*p*-tolyl as a protecting group in a synthesis of 3-hydroxy-17 $\alpha$ -aza-17 $\alpha$ -homopregn-5-en-20-one. A potential inhibitor of androgen biosynthesis. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 2413-2416.
258. Curran, T. T.; Flynn, G. A.; Rudisill, D. E.; Weintraub, P. M. A Novel Route to a 4-Amino Steroid - MDL 19687. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4761-4764.
259. Li, J.; Li, Y.; Son, C.; Brodie, A. M. Inhibition of Androgen Synthesis by 22-Hydroximino-23,24-Bisnor-4-cholen-3-one. *Prostate* **1995**, *26*, 140-150.

## 7. OBJECTIVOS GERAIS DO TRABALHO

A inibição da CYP17 resulta na redução dos níveis de androgénios circulantes e tem por isso sido reconhecida tradicionalmente como uma estratégia eficaz no tratamento do CP, após a demonstração do papel fundamental dos androgénios no crescimento e progressão desta doença. A falta de estrutura 3D da enzima tem dificultado a pesquisa de inibidores da CYP17, que tem assim evoluído de uma abordagem baseada na tentativa-erro para o uso de técnicas mais sofisticadas de modelação molecular e acostagem. Muitos compostos inicialmente concebidos para inibir a aromatase mostraram actividade para a CYP17 e foram posteriormente modificados para tentar melhorar a selectividade para esta enzima. Por outro lado, a presença de estruturas heterocíclicas como o imidazole e a piridina na molécula de inibidor demonstrou ser altamente eficaz, tanto em compostos esteróides como em compostos não esteróides. Hoje em dia é geralmente aceite que as características fundamentais de um bom inibidor da CYP17 incluem um esqueleto hidrofóbico de tamanho geral comparável ao de um esteróide, substituição com grupos electronegativos apenas nas posições externas do esqueleto hidrofóbico, um grupo contendo heteroátomos que sejam capazes de estabelecer uma coordenação estável com o Fe heme da enzima numa das posições externas e outro grupo que funcione como dador/aceitador em ligações de hidrogénio no extremo oposto. O sucesso que compostos como o acetato de abiraterona **12** e o VN/124-1 **13** estão a fazer na clínica e pré-clínica, respectivamente, tem motivado a continuidade da pesquisa de inibidores potentes da CYP17.

Este trabalho teve como objectivo a síntese e avaliação, do ponto de vista da inibição da CYP17, de novos compostos esteróides de núcleo androstano que, obedecendo às considerações gerais de estrutura-actividade conhecidas para os inibidores da CYP17, contribuíssem positivamente para a pesquisa de compostos importantes no contexto do tratamento do cancro da próstata. A síntese deveria obedecer a duas estratégias diferentes que resultariam na obtenção de dois grupos de compostos, nomeadamente os derivados do indazole e os C17 carbamatos derivados do 2'-metilimidazole. A elucidação estrutural dos novos compostos sintetizados seria realizada usando

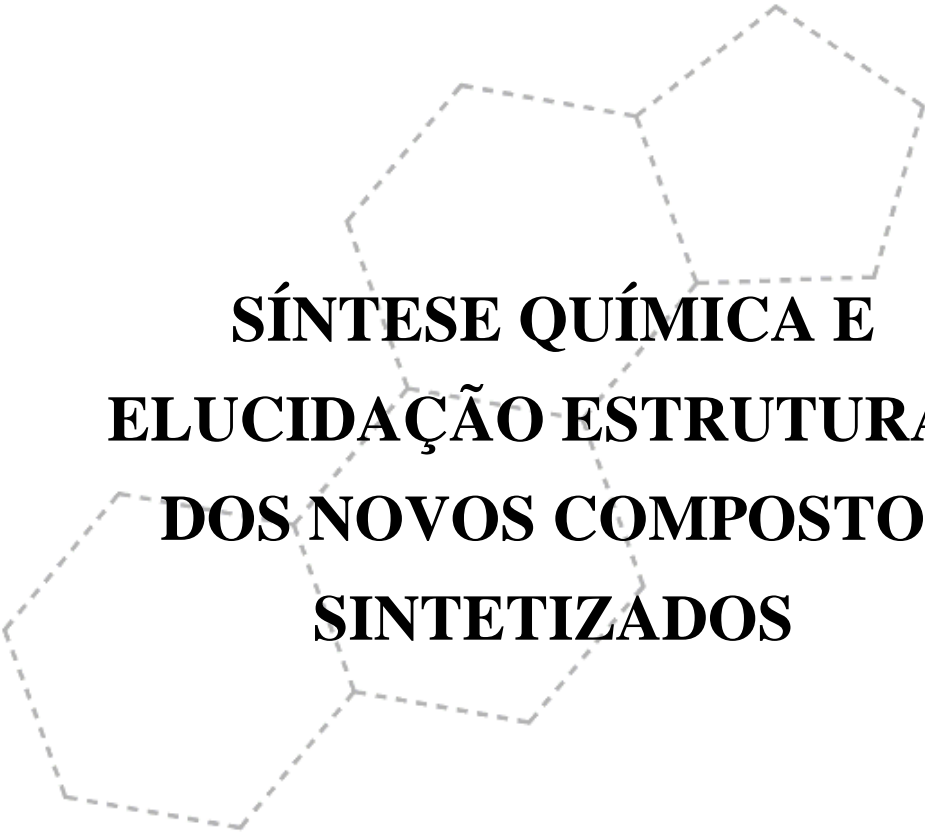


técnicas de IR, espectrometria de massa e  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR 1D e 2D. Para avaliação da inibição da CYP17 pelos dois grupos de compostos sintetizados foi preconizado o uso de um ensaio em células de rim humano (293T) expressando a CYP17 humana, usando como substrato a  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona tritiada.

Com base no conhecimento prévio de que compostos concebidos como inibidores da CYP17 possuíam propriedades desejáveis do ponto de vista de ligação ao AR e inibição da transcrição por ele mediada, e atendendo ao papel fundamental do AR na progressão da doença, foi determinado que a afinidade dos derivados do indazole e dos C17 carbamatos derivados do 2'-metilimidazole para o AR original e mutado, usando células de metástases ósseas do cancro da próstata LAPC4 e LNCaP, seria também alvo de estudo do presente trabalho. Para o efeito usar-se-ia um ensaio de ligação competitiva ao receptor, na presença de um androgénio sintético tritiado. Perspectivou-se ainda o estudo do efeito dos novos compostos na transcrição mediada pelo receptor das células LNCaP, na presença e ausência do ligando natural DHT 7, utilizando o ensaio da luciferase.

Os novos compostos sintetizados deveriam ainda ser estudados do ponto de vista da capacidade de inibição da proliferação celular das linhas celulares do cancro da próstata LAPC4, LNCaP e PC-3. As células PC-3, ao contrário das células LAPC4 e LNCaP derivam de metástases ósseas do cancro da próstata e não expressam o AR, permitindo assim o conhecimento do efeito dos compostos sobre células de estádios mais avançados da doença.

# CAPÍTULO II



**SÍNTESE QUÍMICA E  
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL  
DOS NOVOS COMPOSTOS  
SINTETIZADOS**

## 1. Síntese de derivados do indazole

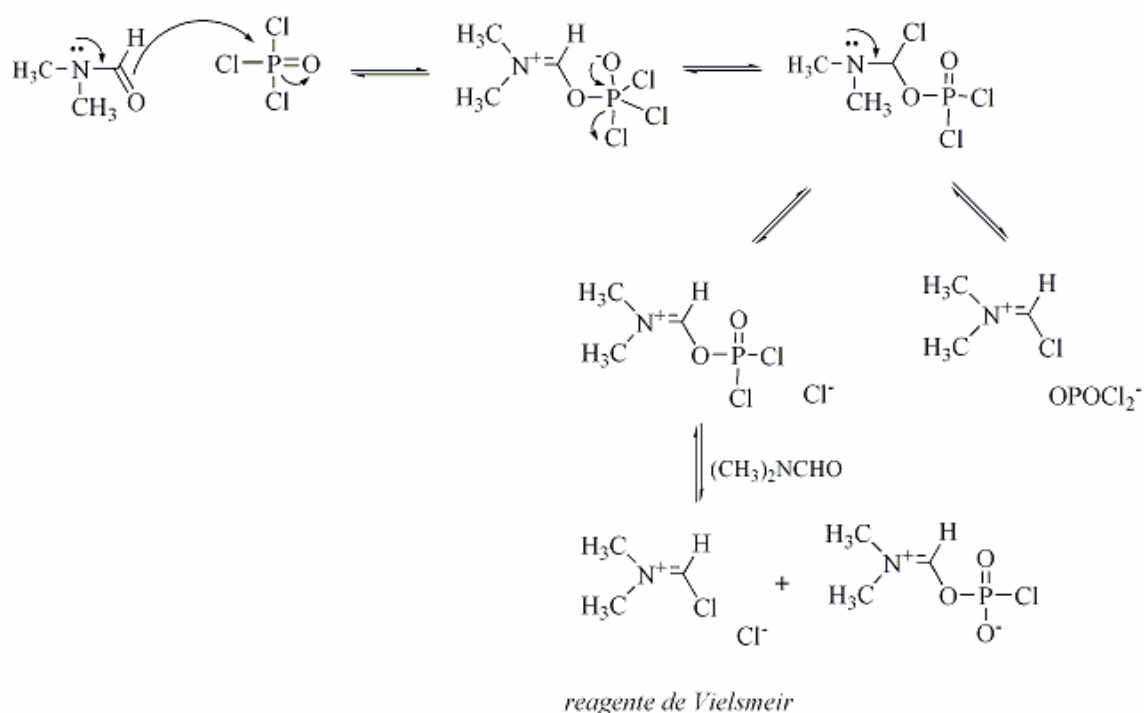
De acordo com as relações de estrutura-actividade previamente discutidas, foi planeada a síntese de novos compostos de núcleo androstano com uma dupla ligação em C16, e um substituinte em C17 com heteroátomos contendo electrões disponíveis para coordenação com o Fe heme da enzima.<sup>1</sup>

A estratégia de síntese foi delineada em cinco etapas. A primeira consistiu na preparação de um derivado contendo uma dupla ligação activada em C16 que fosse suficientemente reactivo para a etapa seguinte de introdução do grupo indazolilo em C17. Desta segunda etapa resultaram dois compostos que diferiram entre si no átomo de N do grupo indazolilo que se ligava ao C17 do núcleo esteróide. Estes compostos originaram novos compostos nas etapas seguintes os quais designámos de *série 1* (ligação ao C17 pelo N1 do grupo indazolilo) e *série 2* (ligação ao C17 pelo N2 do grupo indazolilo). As restantes etapas consistiram na remoção do grupo formilo activador com um catalisador de ródio, na hidrólise do grupo 3 $\beta$ -acetilo e na reacção de Oppenauer, com o intuito de obter compostos cujos anéis A e B fossem em tudo semelhantes aos substratos naturais da CYP17, pregnenolona **2** e progesterona **8**.

### 1.1 Estratégia de Síntese

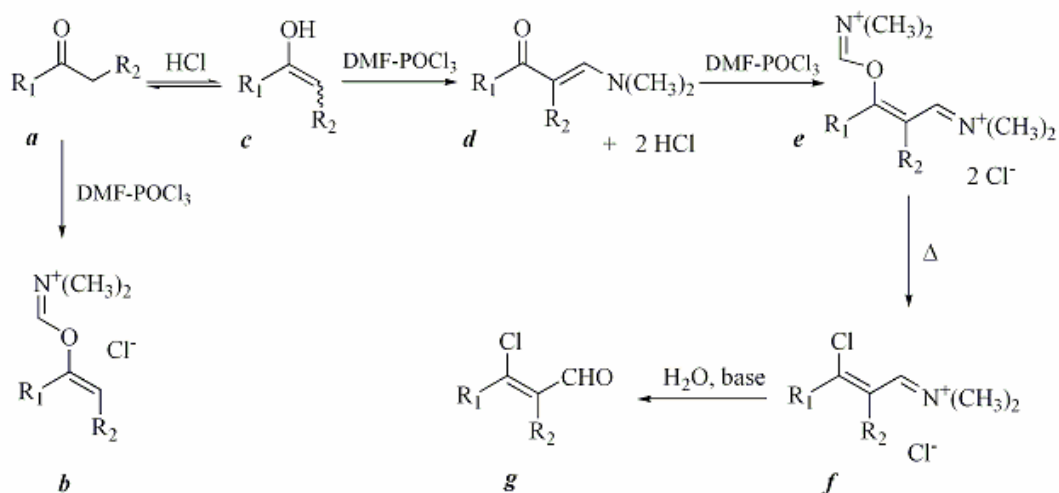
#### 1.1.1 Reacção do reagente de Vilsmeier com cetonas

A reacção de Vilsmeier-Haack clássica consiste na introdução de um grupo formilo em compostos aromáticos ricos em electrões para originar benzaldeídos, por acção do reagente de Vilsmeier.<sup>2</sup> Este reagente é gerado *in situ* por reacção dos haletos de ácidos inorgânicos (SOCl<sub>2</sub>, COCl<sub>2</sub> e POCl<sub>3</sub>) com a dimetilformamida (DMF), que origina complexos activos que são bons agentes formiladores, halogenantes e desidroxiladores (Figura 25).<sup>2,3</sup>



**Figura 25** - Preparação do reagente de Vilsmeier a partir da DMF e do POCl<sub>3</sub>.

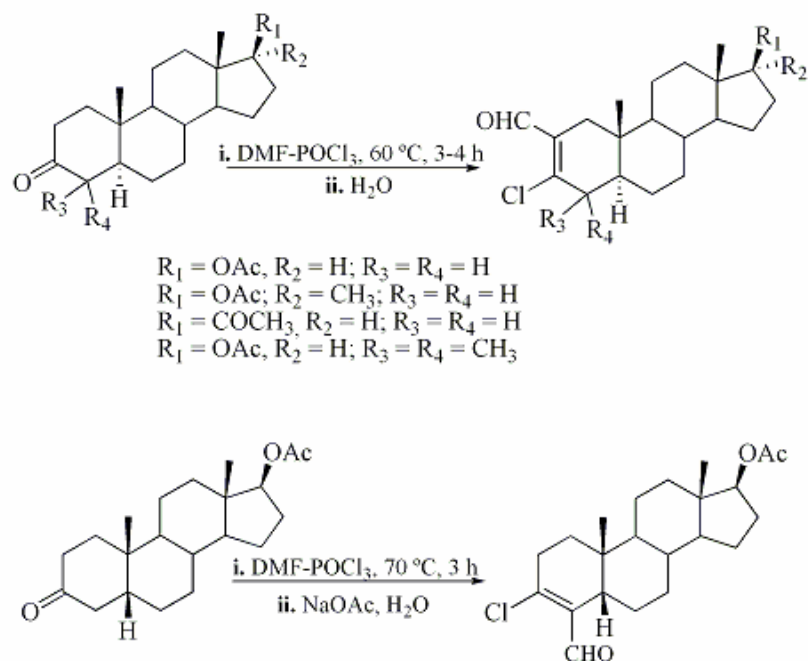
A reacção destes complexos activos com cetonas origina derivados do tipo halovinilaldeídos, de acordo com o mecanismo de reacção proposto (Figura 26).<sup>3</sup> Foi sugerido que a reacção ocorre por meio da forma enólica *c*. A reacção começaria com o ataque electrofílico do reagente de Vilsmeier aos electrões disponíveis do oxigénio do grupo carbonilo da cetona *a*, com formação de um sal *b* e de HCl. O papel fundamental deste primeiro passo seria a geração de HCl *in situ* o qual promoveria a formação desejável do enol *c*, capaz de sofrer substituição pelo reagente de Vilsmeier para originar a espécie *d*. Com o aumento da concentração de HCl, ocorreria aceleração autocatalítica da reacção. A reacção da espécie *d* com outra molécula de reagente de Vilsmeier originaria a espécie *e* que facilmente se degradaria por acção térmica no composto *f*. A geração do produto final da reacção *g* ocorreria por adição de uma solução aquosa alcalina.<sup>3</sup>



**Figura 26** - Mecanismo proposto para a reacção do reagente de Vilsmeier com cetonas.

O procedimento habitual da reacção de Vilsmeier envolve a adição lenta da cetona ao reagente de Vilsmeier, com arrefecimento. A mistura POCl<sub>3</sub>-DMF é a mais utilizada para a preparação do reagente. A reacção é geralmente fortemente exotérmica e, por vezes, mesmo violenta. Após a primeira etapa de reacção, a mistura pode ser aquecida e no final a reacção é parada por adição de gelo e neutralizada com base.

Da acção do reagente de Vilsmeier sobre 3-oxo-5 $\alpha$ -esteróides resultam os respectivos derivados 3-cloro-2-formil-2-eno (Figura 27)<sup>3</sup>. A regioselectividade da formilação do anel A é fortemente influenciada pelo tipo de fusão dos anéis A/B. O acetato de 5 $\beta$ -androst-3-ona-17 $\beta$ -ilo originou o derivado 3-cloro-4-formil-3-eno, por reacção com o reagente de Vilsmeier.

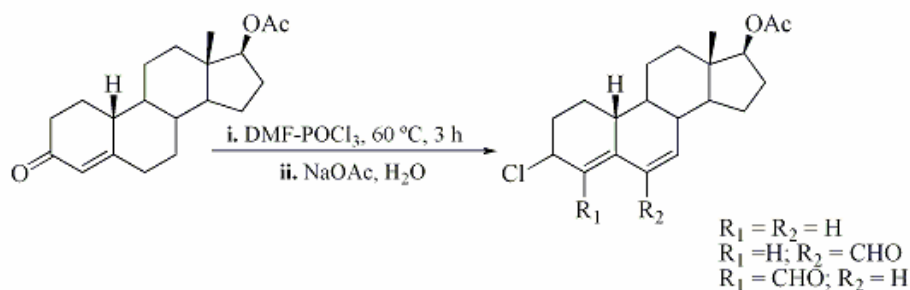


**Figura 27** - Reacção de Vilsmeier em cetonas esteróides saturadas.

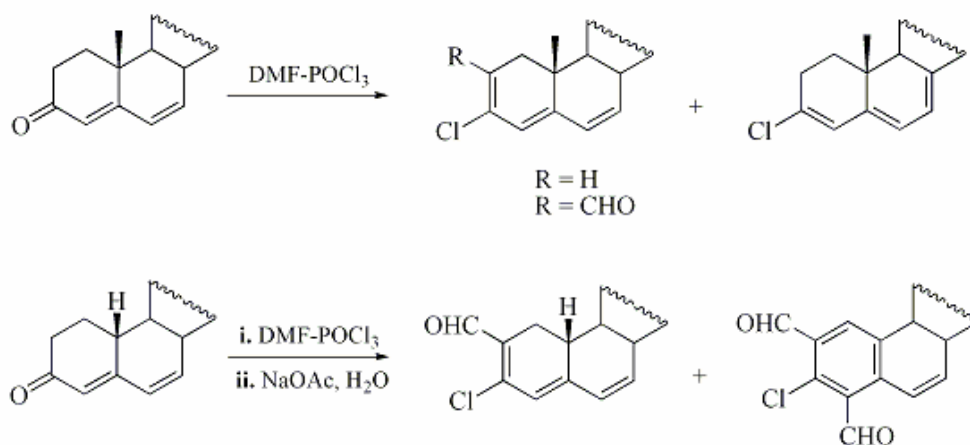
As cetonas esteróides  $\alpha,\beta$ -insaturadas dão geralmente origem a misturas de produtos em que o halodieno é o produto principal.<sup>3</sup> Os 3-oxo-4-eno esteróides originam os derivados 3-cloro-3,5-dieno e os 3-oxo-1,4,6-trienos os derivados 3-cloro-1,3,5,7-tetraeno. Contudo, o acetato de 19-nortestosterona originou uma mistura de aldeídos como produtos principais (1:1) e um clordieno (Figura 28).<sup>3</sup> Só nos derivados 19-nor é que o reagente de Vilsmeier consegue atacar o C4 e o C6 após deslocamento da função oxigenada em C3 pelo cloro.<sup>3</sup> Esta observação sugere que existe impedimento estereoquímico ao ataque pelo reagente de Vilsmeier por parte do grupo 19-metilo, quando presente.

A reactividade de uma série de derivados 3-oxo-4,6-dieno com o reagente de Vilsmeier foi estudada e observou-se a formação de uma mistura de 3-cloro-2,4,6-trienos, 3-cloro-2-formil-2,4,6-trienos e 3-cloro-3,5,7-trienos como produtos de reacção (Figura 29).<sup>3</sup> Nalguns casos foram também obtidos os dialdeídos aromáticos, formados por oxidação. Os derivados 7-oxo-5-eno com

um grupo acetilo em C3 eliminam ácido acético nas condições de Vilsmeier originando os 7-oxo-3,5-dienos, os quais são convertidos numa mistura de produtos clorados (Figura 30).<sup>3</sup>



**Figura 28** - Reacção de Vilsmeier em cetonas esteróides  $\alpha,\beta$ -insaturadas.



**Figura 29** - Reacção de Vilsmeier em cetonas esteróides  $\alpha,\beta$ -insaturadas.

A síntese dos derivados do indazole começou com a reacção do reagente de Vilsmeier com o acetato de DHEA **186** (Figura 31). A reacção já tinha sido previamente descrita para este substrato e foi reportada a obtenção do composto **188** como produto secundário.<sup>3-5</sup>

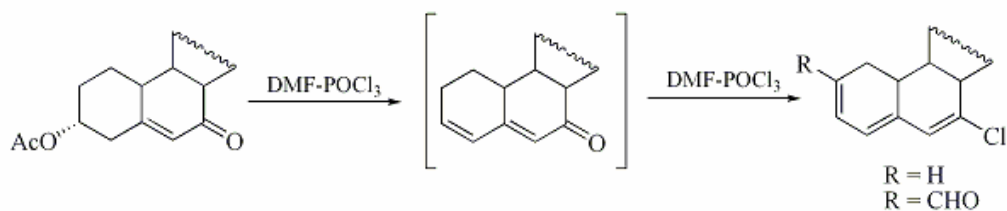


Figura 30 - Reacção de Vilsmeier em cetonas esteróides  $\alpha,\beta$ -insaturadas.

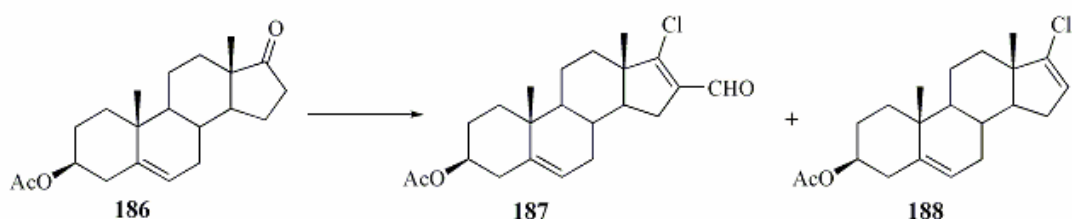
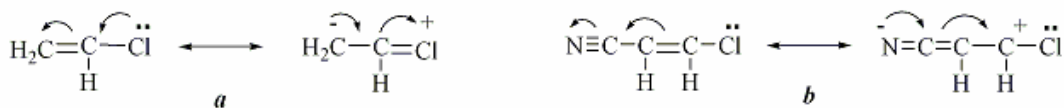


Figura 31 - Primeira etapa de síntese dos derivados do indazole.

### 1.1.2 Introdução do grupo indazolilo em C17 (séries 1 e 2)

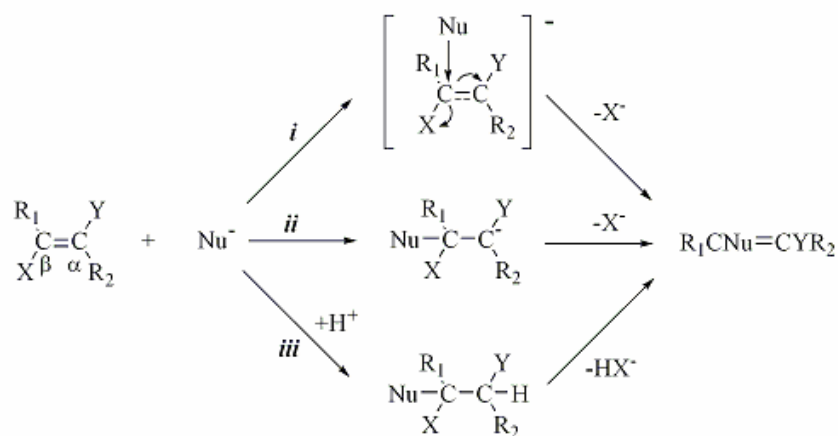
A substituição nucleofílica vinílica nos haletos de vinilo simples dificilmente ocorre, excepto nos casos em que existe um grupo activador ligado a um dos carbonos vinílicos.<sup>6, 7</sup> A fraca reactividade destes sistemas deve-se ao facto de a ligação carbono-halogéneo ter um carácter parcial de dupla ligação causado pela da movimentação de electrões do halogéneo para os carbonos da dupla ligação (Figura 32, *a*). Por outro lado, a existência de grupos electroattractivos ligados ao segundo carbono do sistema vinílico têm o efeito oposto e favorecem assim o ataque nucleofílico no átomo de C que fica com deficiência de carga (Figura 32, *b*).





**Figura 32** - Activação dos haletos de vinilo por grupos electroactivos.

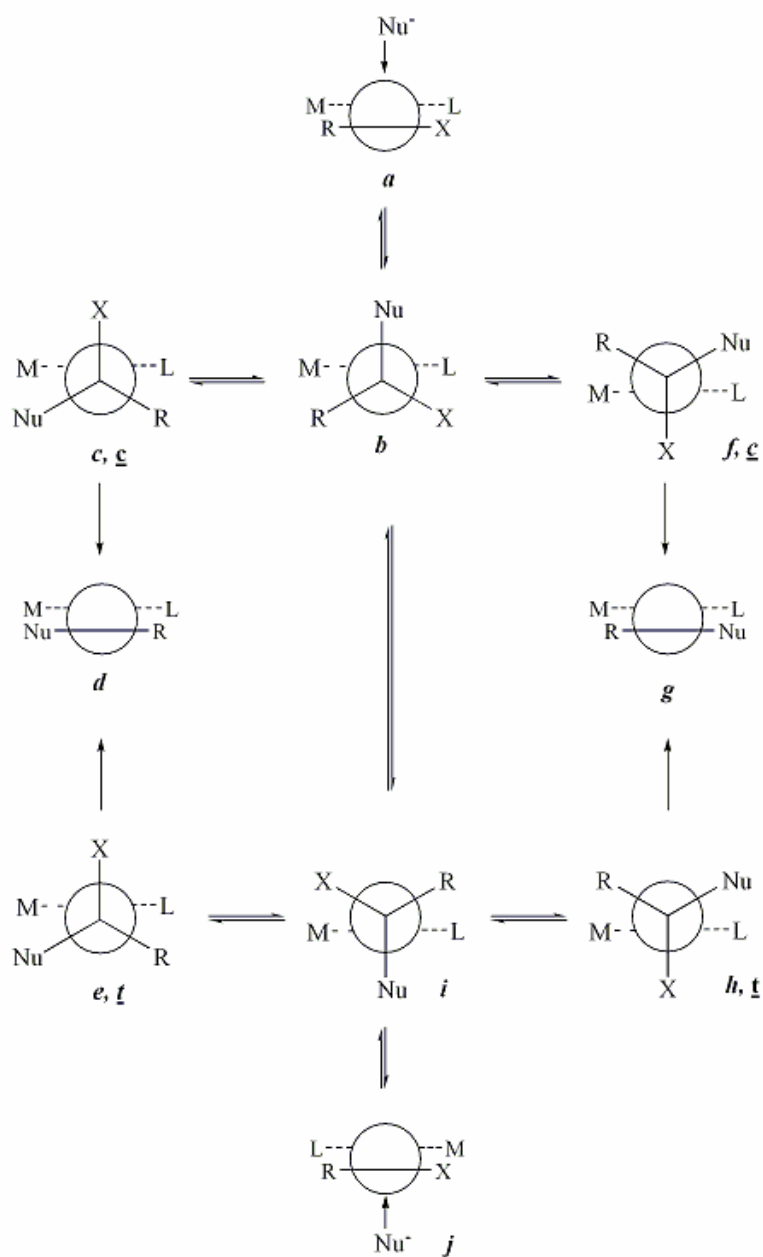
A substituição nucleofílica vinílica pode ocorrer por qualquer uma das vias representadas na Figura 33<sup>7</sup>. De facto, uma vez que a diferenciação de cada uma dessas vias é muitas vezes impossível, elas foram conjuntamente designadas como “adição-eliminação”. O que as distingue é o intermediário de reacção considerando que, no primeiro caso é um estado de transição (*i*), no segundo caso corresponde a um carbanião (*ii*) e no terceiro a um aducto  $\alpha,\beta$  (*iii*).



**Figura 33** - Substituição nucleofílica vinílica (adição-eliminação). **X** = Grupo de saída; **Y** = Grupo activador; **Nu<sup>-</sup>** = Nucleófilo.

A estereoquímica da substituição depende da configuração dos substratos e da via específica envolvida. Na maior parte dos sistemas, a reacção ocorre com retenção da configuração, o que faz

pressupor que o mecanismo de reacção mais provável é o que tem como intermediários os carbaniões (Figura 33, *ii*).<sup>7</sup>



**Figura 34** - Estereoquímica da substituição nucleofílica-vinílica (adição-eliminação).

A Figura 34 representa os vários conformémeros dos carbaníões intermediários formados no ataque nucleofílico a um par de isómeros *cis-trans* (**a-j**), e assenta nos seguintes pressupostos: o ataque do nucleófilo Nu<sup>-</sup> ocorre perpendicularmente ao plano da molécula originando um arranjo tetraédrico dos substituintes ligados ao C $\beta$ , os grupos ligados ao C $\alpha$  permanecem planares no carbaníão e a eliminação do grupo de saída ocorre perpendicularmente ao plano da dupla ligação incipiente do produto de reacção.<sup>7</sup> Os símbolos **c** e **t** diferenciam os conformémeros obtidos a partir dos isómeros *cis* e *trans*, respectivamente. A carga negativa do átomo de C $\alpha$  não está representada. Os grupos M e L representam substituintes em que L é mais volumoso do que M.

Os carbaníões formados em primeira instância após o ataque nucleofílico aos isómeros *cis* e *trans* são o **b** e o **i**, respectivamente. Se X é expulso após uma rotação de 60° que origina os conformémeros **e,t** e **f,c**, o resultado final da reacção é a substituição com completa retenção de configuração. Se a saída se dá após 120° de rotação, ou seja, a partir de **c,c** e **h,t**, há inversão completa da configuração inicial. Uma rotação de 180° seguida de expulsão do Nu<sup>-</sup> das espécies **b** e **i** origina isomerização da olefina inicial.<sup>7</sup>

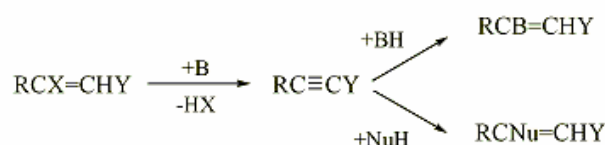
A retenção completa de configuração é controlada pela cinética da reacção e ocorre se a quebra da ligação com X for ligeiramente mais lenta do que a formação da nova ligação. Este fenómeno é esperado para os dois isómeros se a velocidade de expulsão de X for muito superior à velocidade de rotação livre da ligação. Se o contrário ocorrer, a estereoquímica passa a ser determinada por controlo termodinâmico, ou seja, atinge-se um equilíbrio conformacional e é a quantidade relativa de conformémeros gerada que determina a razão de isómeros obtida.

A inversão de configuração obrigaria a disposições mais restritas. Seria necessário que a quebra da ligação com X fosse mais lenta do que a formação da nova ligação e teria que existir uma estabilidade diferenciada entre os conformémeros. Neste caso, as conformações em eclipse que implicassem menor repulsão estérica entre substituintes adjacentes seriam preferidas.<sup>7</sup>

A reacção concorrente mais significativa da substituição nucleofílica vinílica é a  $\alpha,\beta$ -eliminação-adição, caso o C $\alpha$  tenha ligado não só o grupo activador mas também um átomo de

hidrogénio.<sup>6, 7</sup> Nestas condições, a acidez do átomo de hidrogénio está aumentada e, se o nucleófilo for suficientemente básico e o grupo de saída X estiver em geometria favorável para a eliminação, HX é expulso, originando-se um intermediário acetileno. A presença de base B usada na eliminação ou de outro nucleófilo Nu<sup>-</sup> e um próton origina produtos de substituição (Figura 35).

Outras reacções de eliminação menos frequentes foram também reportadas como a β,β-eliminação e β,γ-eliminação.<sup>7</sup>



**Figura 35** - α,β-Eliminação-adição.

No respeitante ao presente trabalho, a reacção de introdução do grupo indazolilo em C17 obedeceu a um esquema geral de substituição nucleofílica vinílica (adição-eliminação)<sup>6-9</sup> em que o nucleófilo é o grupo indazolilo ionizado em meio básico, que ataca o carbono β (Figura 36). O grupo formilo do carbono α funciona como activador da posição β (C17) no composto **187**. Foi demonstrado que esta activação é fundamental visto o derivado clorado sem grupo formilo activador não ser reactivo nas mesmas condições experimentais.<sup>8</sup> A saída de Cl<sup>-</sup> permitiu a obtenção dos produtos finais **189** e **190**, com regeneração da dupla ligação em C16. Uma vez que o indazole dispõe de dois átomos de N, formaram-se dois produtos de reacção distintos originários da formação do anião nucleofílico em N1 (*série 1*) ou N2 (*série 2*), respectivamente.

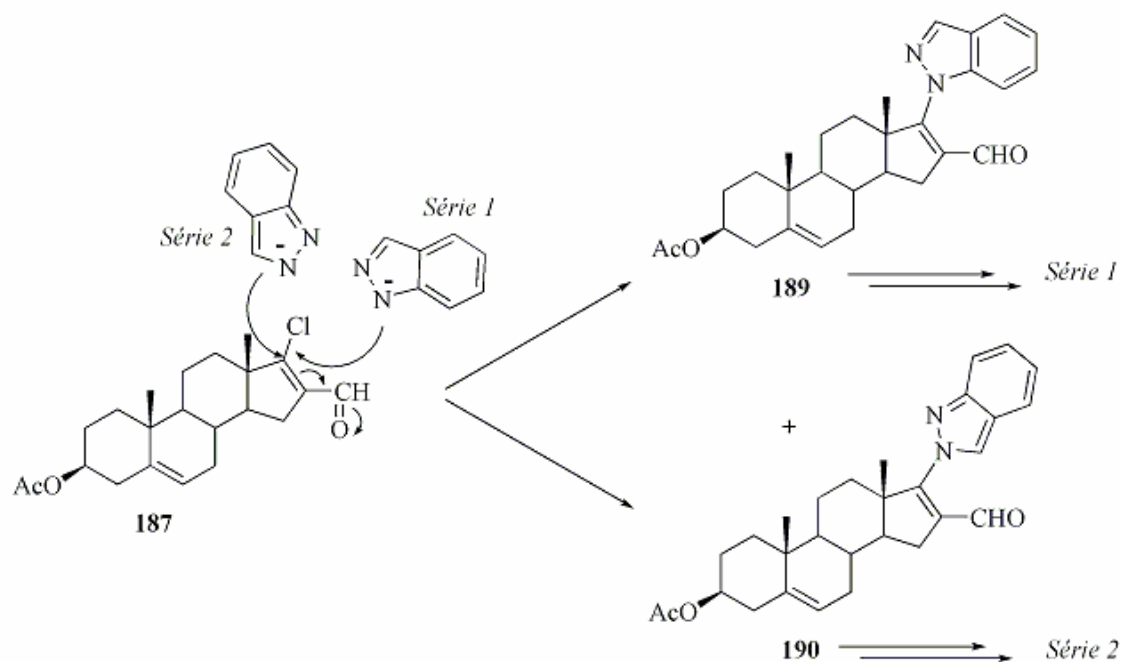
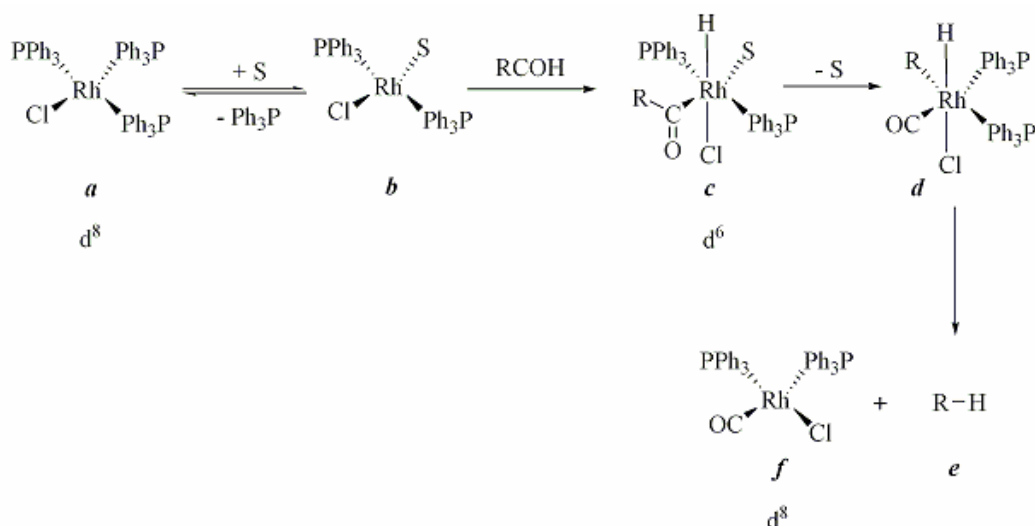


Figura 36 - Segunda etapa de síntese dos derivados do indazole.

### 1.1.3 Desformilação

A descarbonilação estequiométrica de aldeídos em condições homogêneas, usando complexos de metais de transição com ligandos de fosfina monodentados terciários, como o  $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$  (catalisador de Wilkinson),  $[\text{Rh}(\text{PPh}_3)_2(\text{solvente})_n]^+$  e  $[\text{Ru}_2\text{Cl}_3(\text{PEt}_2\text{Ph})_6]^+$  está bem documentada.<sup>10</sup> O catalisador de Wilkinson é o mais estudado e a reacção que promove obedece ao mecanismo geral representado na Figura 37.<sup>2</sup>

Apesar de ser conhecido como catalisador de Wilkinson, na reacção representada na Figura 37 o  $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$  *a* é usado em quantidades estequiométricas.<sup>2, 11, 12</sup> Se a temperatura da reacção for suficientemente elevada (200 °C), esta torna-se catalítica porque o CO é libertado da esfera de coordenação do Rh *f* e o catalisador é regenerado.



**Figura 37** - Mecanismo de descarbonilação com o catalisador de Wilkinson. S = solvente.

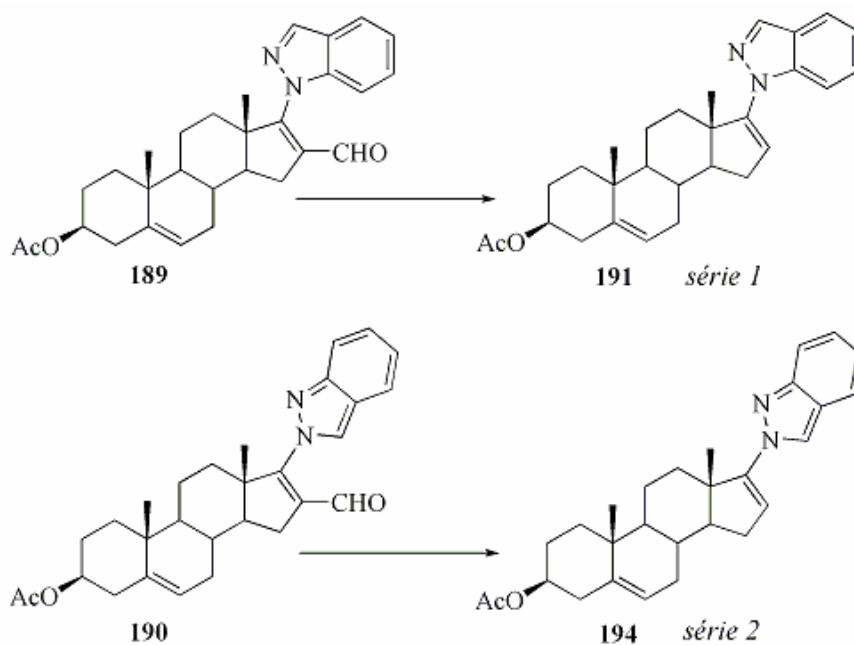
No mecanismo proposto, a espécie **a** é solvatada para originar a espécie **b**, com libertação de uma molécula de trifenilfosfina. Esta espécie é responsável pelo ataque nucleofílico ao grupo carbonilo do substrato RCOH (ou sofre ataque electrófilo deste no átomo do metal) com transferência concomitante do H para a esfera de coordenação do metal **c**. Este processo, que envolve oxidação do Rh(I) a Rh(III), é provavelmente o passo limitante da descarbonilação. De seguida ocorre migração do grupo alquilo R e transferência do H para esse grupo alquilo, com formação do produto final **e** e do complexo de carbonilclororódio **f**.

O mecanismo proposto é semelhante ao da descarbonilação com Pd. A diferença reside no facto de os intermediários de organopaládio serem termicamente instáveis e originarem Pd metálico, sendo por isso o Pd um verdadeiro catalisador, enquanto o RhCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub> não o é.<sup>11</sup>

O substrato da reacção com o catalisador de Wilkinson pode ser um aldeído, haleto de acilo, cianeto de acilo ou uma 1,2-dicetona.<sup>2</sup> A reacção é estereoespecífica, ou seja, a configuração do estereocentro em que o grupo carbonilo está ligado é mantida. No caso da descarbonilação de substratos  $\alpha,\beta$ -insaturados, não há redução da dupla ligação. Nos haletos de acilo, se existirem

átomos de hidrogénio  $\beta$ , o produto final é um alceno e não um alcano devido à ocorrência de  $\beta$ -eliminação.<sup>2</sup>

O uso de complexos catiónicos de ligandos quelantes de difosfina, como o  $[\text{Rh}(\text{dppe})_2]\text{Cl}$  (dppe = difenilfosfinaetano) e o  $[\text{Rh}(\text{dppp})_2]\text{Cl}$  (dppp = difenilfosfinapropano) foi reportado para esta reacção com base na observação de que a expulsão de CO do complexo *f* era fundamental para a regeneração do catalisador.<sup>10</sup> Foi sugerido que estes novos ligandos, por serem menos ricos em electrões e terem maior probabilidade de assumir uma estereoquímica *trans* Rh-fósforo, se ligam ao CO de forma menos efectiva. De facto, verificou-se que a actividade catalítica do  $[\text{Rh}(\text{dppe})_2]\text{Cl}$  e do  $[\text{Rh}(\text{dppp})_2]\text{Cl}$  é bastante superior à conseguida com o catalisador de Wilkinson e que estes catalisadores são muito estáveis, promovendo uma descarbonilação verdadeiramente catalítica de aldeídos, em condições homogéneas, a temperaturas mais baixas.



**Figura 38** - Terceira etapa de síntese dos derivados do indazole.

A descarbonilação catalítica dos substratos **189** e **190** das *séries 1* e *2*, respectivamente, foi conseguida usando  $[\text{Rh}(\text{dppp})_2]\text{Cl}$ . Tanto o uso de Pd como o catalisador de Wilkinson foram ineficazes para esta transformação (Figura 38).

#### 1.1.4 Hidrólise alcalina

A hidrólise do grupo 3 $\beta$ -acetilo dos compostos **191** e **194** das *séries 1* e *2*, respectivamente, corresponde a uma substituição acíclica nucleofílica em que a solução alcalina de KOH em EtOH fornece o íão OH<sup>-</sup>, fortemente nucleofílico, que ataca o carbono carbonílico do grupo 3 $\beta$ -acetilo, originando um intermediário tetraédrico que se decompõe para dar os derivados 3 $\beta$ -hidroxilados finais **192** e **195**, de acordo com o mecanismo já extensamente conhecido (Figura 39).<sup>13</sup> Em alternativa, a hidrólise poderia ter sido realizada em meio ácido.<sup>13</sup>

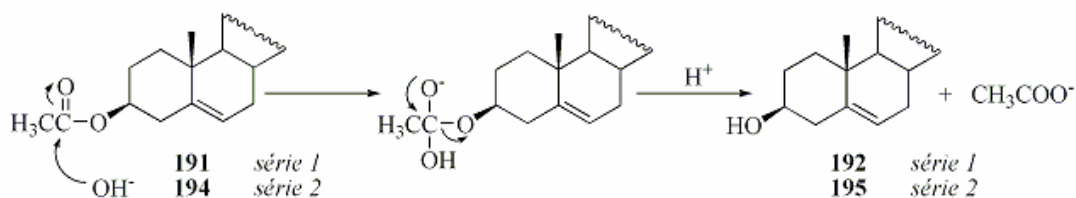


Figura 39 - Quarta etapa de síntese dos derivados do indazole.

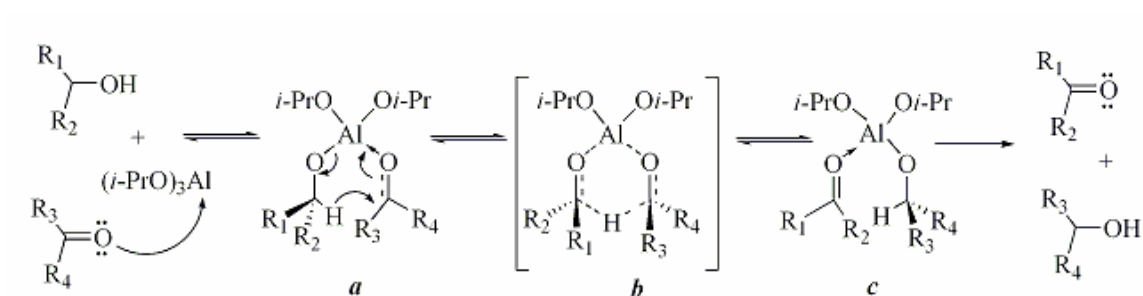
#### 1.1.5 Reacção de Oppenauer

A oxidação de álcoois primários e secundários com cetonas, catalisada por um alcóxido metálico (por exemplo o isopropóxido de Al), é conhecida como reacção de Oppenauer.<sup>2, 14, 15</sup> A oxidação de álcoois de núcleo esteróide é geralmente realizada ao ponto de ebulição de um



solvente inerte (benzeno ou tolueno), com um largo excesso de composto carbonílico aceitador de H (acetona ou ciclo-hexanona).<sup>14</sup> A reacção inversa da Oppenauer, ou seja, a redução da cetona a álcool é conhecida como reacção de Meerwein-Ponndorff-Verley.

É geralmente aceite que a reacção de Oppenauer ocorre através da formação de um complexo cíclico **b** em que tanto o composto carbonílico oxidante (cetona) como o álcool (substrato) estão ligados ao ião metálico (por exemplo o Al). O álcool está ligado como alcóxido, enquanto a cetona está coordenada com o Al, activando-o para a transferência de H (Figura 40).



**Figura 40** - Reacção de Oppenauer.

A necessidade do uso de alcóxidos de alumínio em quantidades estequiométricas deve-se à sua fraca capacidade de troca de ligandos no estado de transição. A reacção de Oppenauer já foi descrita em condições catalíticas usando sistemas com compostos de Al, La, Sm, Zr, Hf, Ir e Ru.<sup>15</sup>

16

São características gerais da reacção<sup>2, 15</sup> a sua reversibilidade (por adição de um largo excesso de cetona pode tornar-se a reacção completa), a tolerância da presença da maior parte dos grupos funcionais, a versatilidade, visto um elevado número de álcoois primários e secundários poder ser oxidado nestas condições, e a quimiosselectividade, uma vez que os álcoois secundários, especialmente os menos impedidos estereoquimicamente, são mais facilmente oxidados do que os primários.<sup>2, 15</sup>

A oxidação é efectuada em condições suaves e o ácido carboxílico nunca é obtido nas condições de Oppenauer.<sup>2, 15</sup> As reacções laterais mais frequentes são a condensação aldólica e a reacção de

Tishchenko dos aldeídos formados na oxidação dos álcoois primários e a migração da dupla ligação na oxidação dos álcoois homoalíficos.<sup>2, 15</sup>

Em química de esteróides, a reacção de Oppenauer é muito útil porque converte facilmente os derivados 3 $\beta$ -hidroxi-5-eno em derivados 3-oxo-4-eno.<sup>14, 17</sup> Reich *et al.* reportaram o uso de *N*-metilpiperidona na reacção de Oppenauer da pregnenolona **2** para evitar a formação de álcoois de elevado ponto de ebulição que seriam difíceis de remover no passo de recuperação do produto final.<sup>18</sup> Esta modificação tornou-se comum desde então e permite a remoção do álcool final na lavagem com solução acídica durante o *work-up*.

A síntese dos compostos **193** e **196** das séries 1 e 2 respectivamente, foi feita com sucesso através da reacção de Oppenauer (Figura 41).

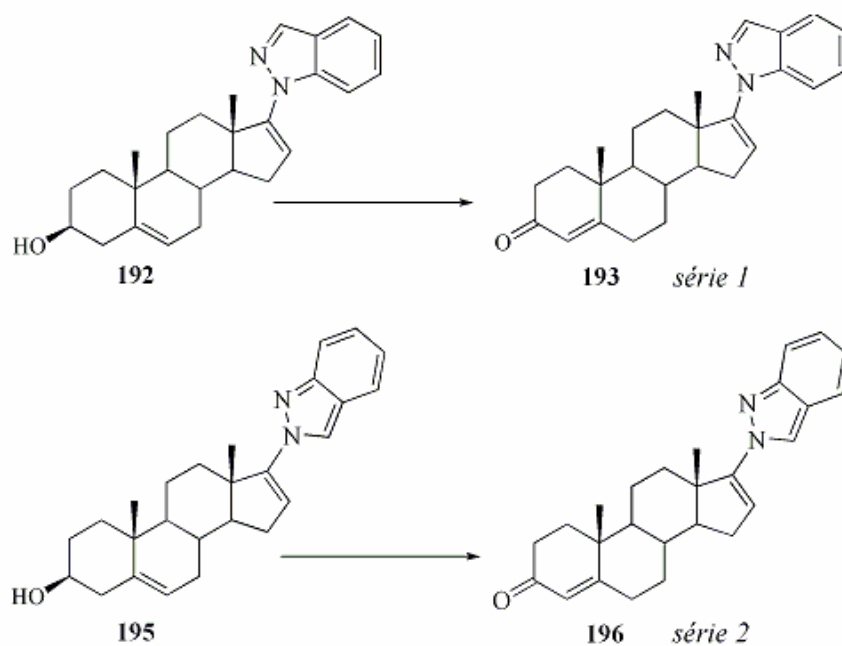
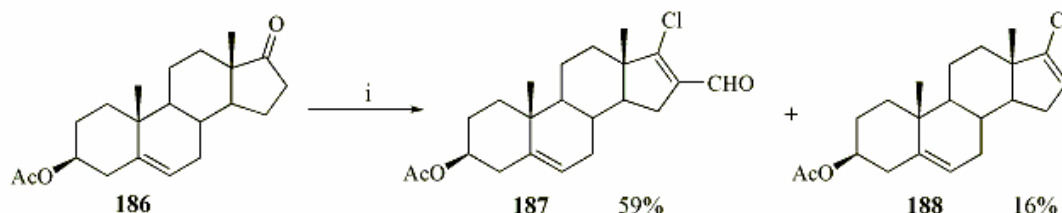


Figura 41 - Quinta etapa de síntese dos derivados do indazole.

## 1.2 Resultados

### 1.2.1 Aplicação da estratégia de síntese

A síntese dos derivados do indazole foi iniciada por reacção do reagente de Vilsmeier com o acetato de DHEA **186**, usando  $\text{POCl}_3$  e DMF em clorofórmio, para obter o composto desejado **187**. Os produtos foram separados por cromatografia *flash* e os rendimentos finais do processo foram de 59% para o composto **187** e 16% para o composto **188** (Figura 42).



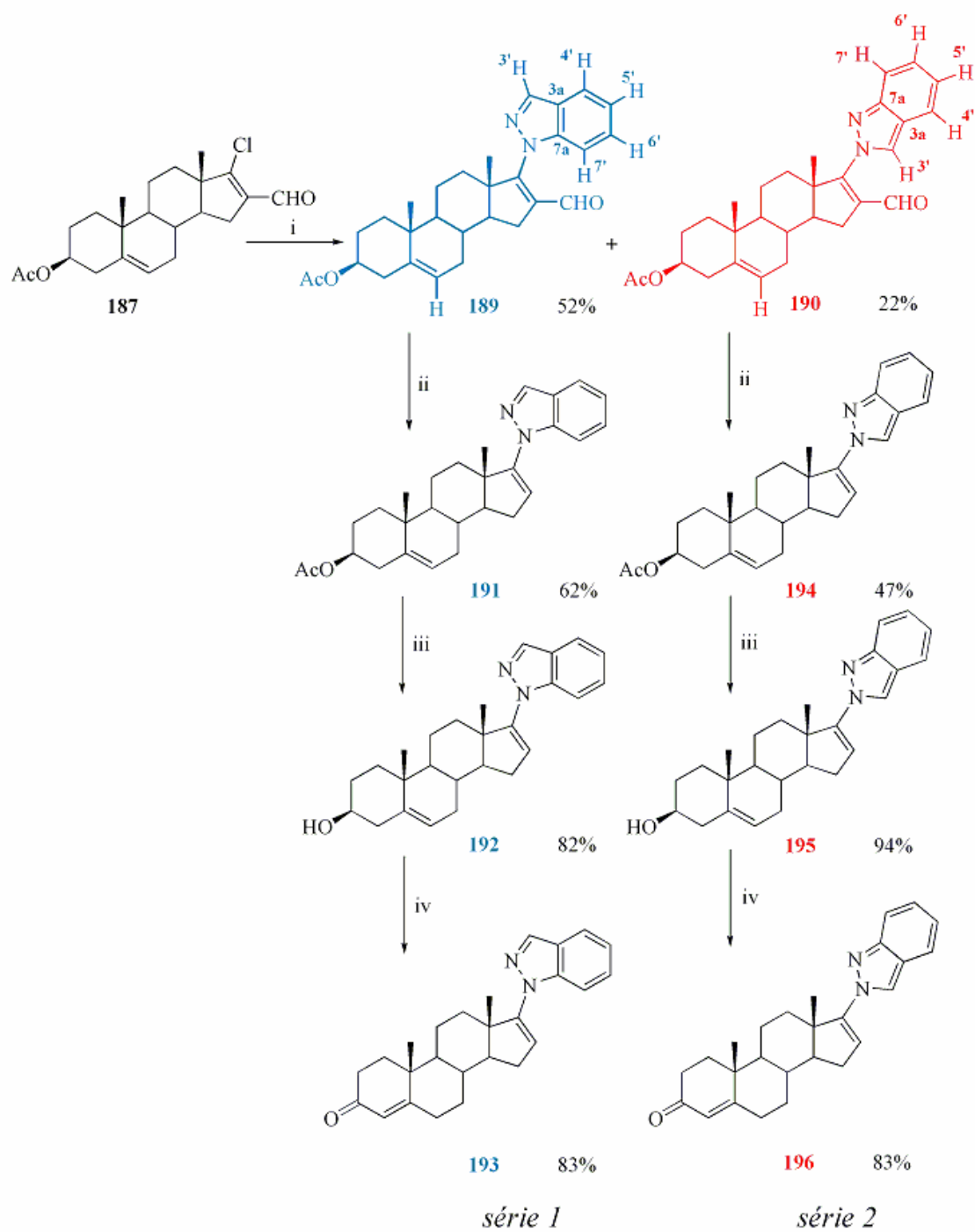
**Figura 42** - Reacção do reagente de Vilsmeier com o composto **186**. **i**  $\text{POCl}_3$ -DMF,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{N}_2$ ,  $80^\circ\text{C}$ .

O produto principal da reacção **187** foi depois tratado com indazole na presença de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  em DMF a  $80^\circ\text{C}$ , sob atmosfera de  $\text{N}_2$  e originou uma mistura de produtos **189** e **190**, de acordo com a discussão apresentada na secção **1.1.2** (Figura 43). O produto principal obtido foi o composto **189**, com 52% de rendimento, da *série 1*. O composto **190**, da *série 2*, foi obtido com 22% de rendimento. A razão da obtenção do isómero *1H* substituído **189** como produto principal prende-se, provavelmente, com o equilíbrio tautomérico estabelecido entre o *1H*-indazole e o *2H*-indazole em solução. Na fase gasosa o *1H*-indazole é mais estável do que o *2H*-indazole, sendo o diferencial energético das duas formas de 4,7 kcal/mol.<sup>19</sup> Na fase aquosa, o *2H*-indazole é

estabilizado pelo elevado momento dipolar da água e o referido diferencial decresce para 2,2 kcal/mol.

Os compostos **189** e **190** foram devidamente isolados por cromatografia *flash* e tratados separadamente com um catalisador de Rh [Rh(dppp)<sub>2</sub>Cl] gerado *in situ* a partir do cloreto de carbonilobis(trifenilfosfina) ródio(I) e do 1,1,3,3-tetrafenilfosfinopropano, em xilenos. Este catalisador mostrou-se eficaz enquanto outros métodos tradicionais de desformilação como o uso de Pd (10%) em carvão activado e o catalisador de Wilkinson não permitiram executar a transformação pretendida. Obtiveram-se os compostos **191** e **194**, com 62 e 47% de rendimento, respectivamente (Figura 43).

A hidrólise do grupo 3β-acetilo destes compostos foi conseguida com KOH (10%) em MeOH, com 82 e 94% de rendimento. A reacção de Oppenauer modificada, usando *N*-metilpiperidona, dos compostos **192** e **195** originou com sucesso os respectivos derivados 3-oxo-4-eno **193** e **196**, ambos com 83% de rendimento (Figura 43).



**Figura 43** - Síntese dos compostos **191-196**. **i.** Indazole,  $K_2CO_3$ , DMF,  $N_2$ , 80 °C **ii.**  $(PPh_3)_2RhCOCl-Ph_2P(CH_2)_3PPh_2$ , xilenos,  $N_2$ , refluxo; **iii.** KOH (10% em MeOH),  $N_2$ , r.t.; **iv.**  $Al(i-PrO)_3$ , *N*-metilpiperidona, tolueno,  $N_2$ , refluxo.

### 1.2.2 Aspectos seleccionados da elucidação estrutural dos derivados do indazole

A elucidação estrutural dos compostos preparados foi feita com base nas análises de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) 1D e 2D, de Infra-vermelho (IR) e de literatura relacionada.<sup>20-22</sup>

Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **189** da *série 1* (Figura 43) estão representados nas Figuras 44 e 45. Os sinais foram atribuídos por análise conjunta da informação das experiências de “*Correlation Spectroscopy*” (COSY), “*Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence*” (HMQC) e *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*” (HMBC).

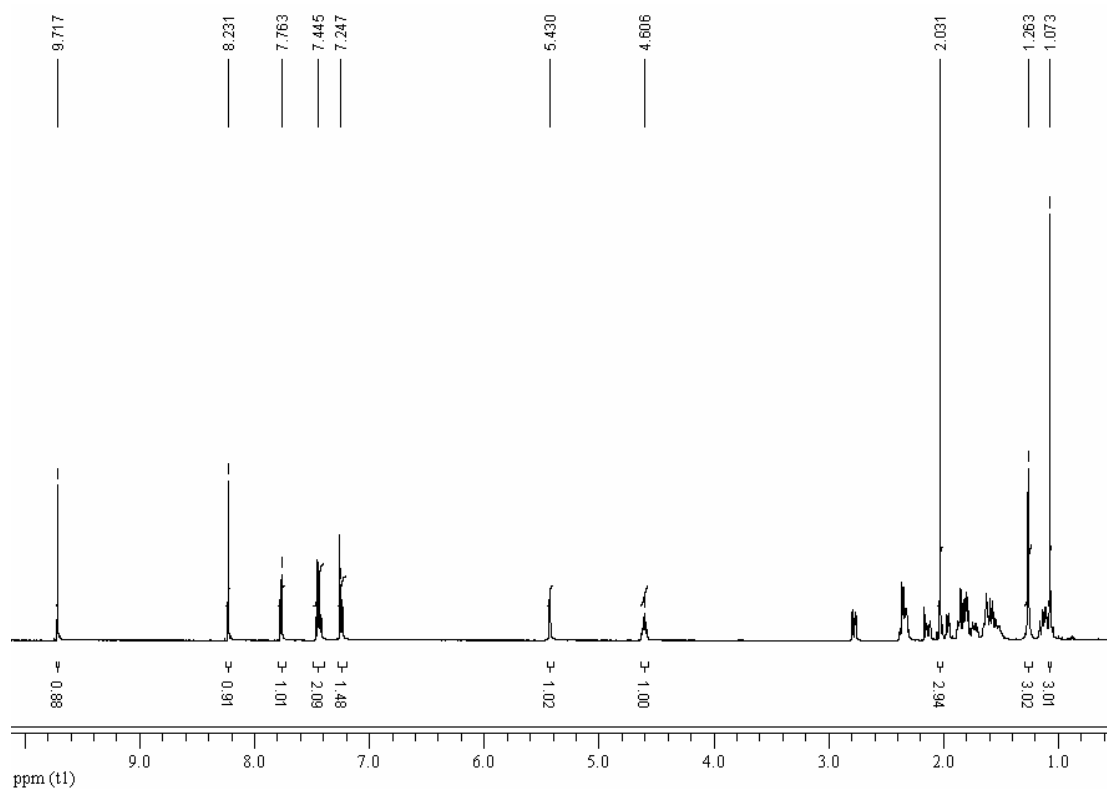
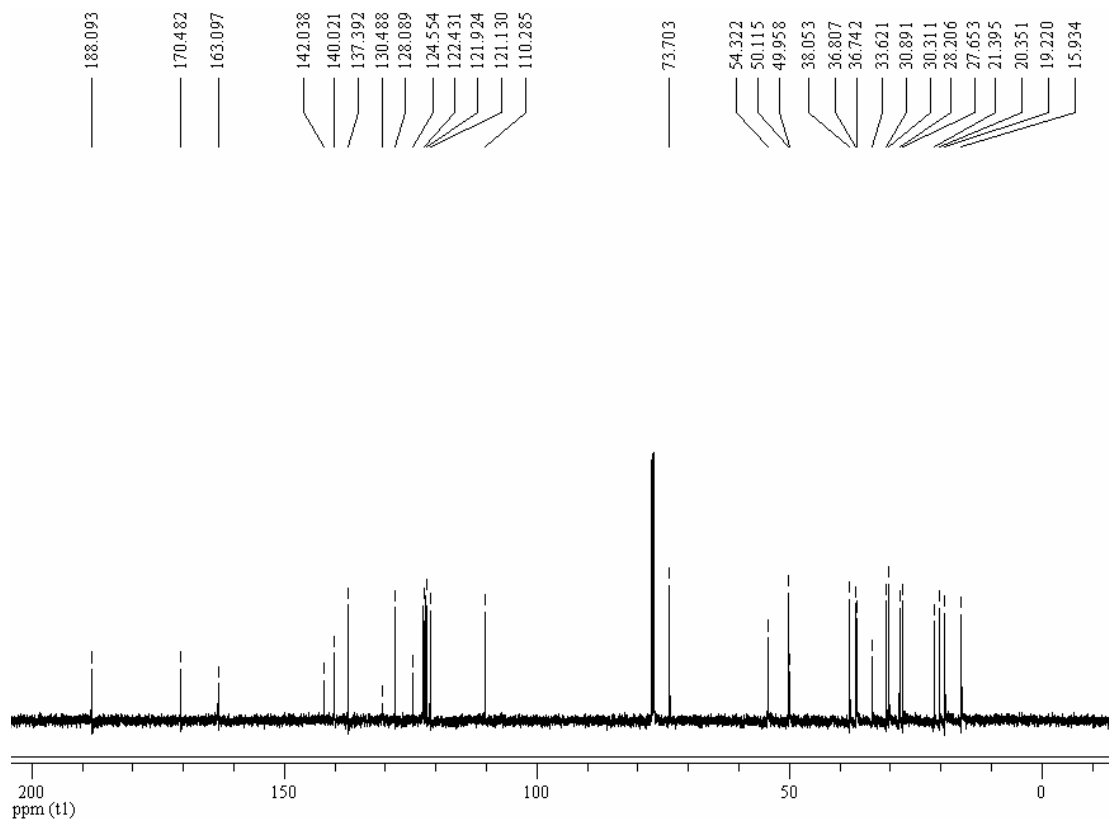


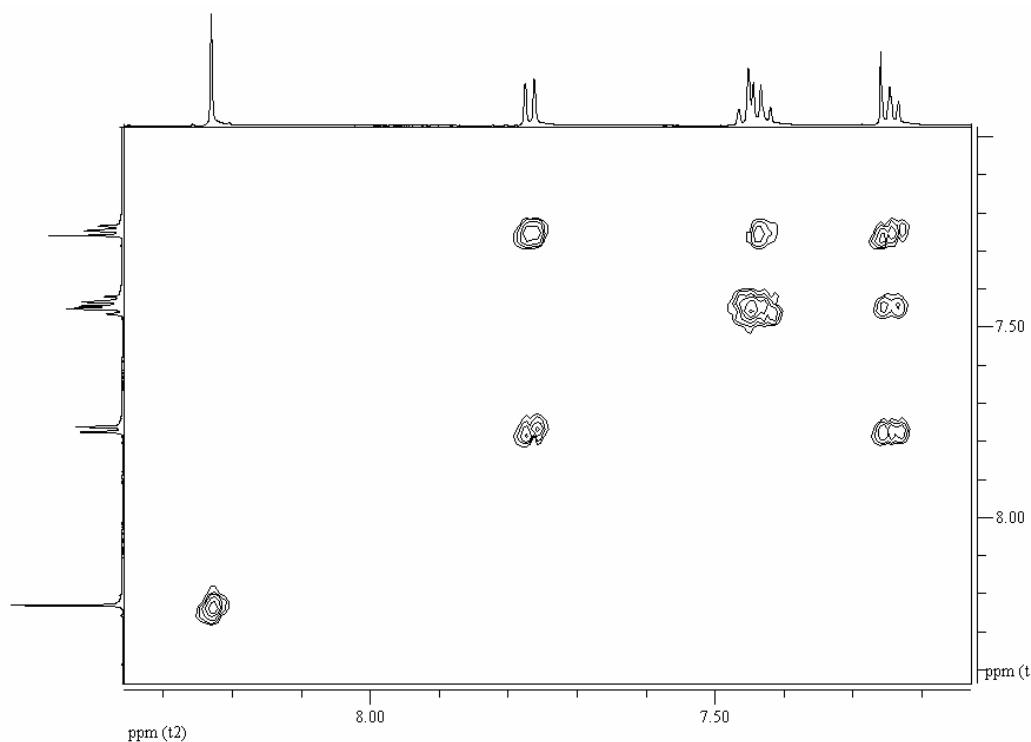
Figura 44 - Espectro de  $^1\text{H}$  NMR do composto **189**.



**Figura 45** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **189**.

A zona aromática do espectro de  $^1\text{H}$  NMR do composto **189**, da *série 1* (Figura 44), é constituída por um conjunto de 4 sinais entre 7,24 e 8,23 ppm, que foram atribuídos com base na experiência de COSY (Figura 46).

O sinal a 8,23 ppm é um singuleto largo e não apresenta correlação com nenhum dos outros sinais dos prótons da zona aromática. Este sinal foi atribuído ao 3'-H do anel de 5 átomos do grupo indazolilo, que é, na estrutura, o próton que esperamos que esteja mais isolado e com menor possibilidade de acoplamento com prótons vizinhos. O sinal que lhe precede, um multipletto a 7,76 ppm que integra 1 próton, mostra correlação apenas com o multipletto a 7,24 ppm. O mesmo ocorre para o multipletto a 7,44 ppm, integrando 2 prótons. O sinal a 7,24 ppm, um multipletto integrando 1 próton, apresenta correlações com os sinais a 7,76 e 7,44 ppm.



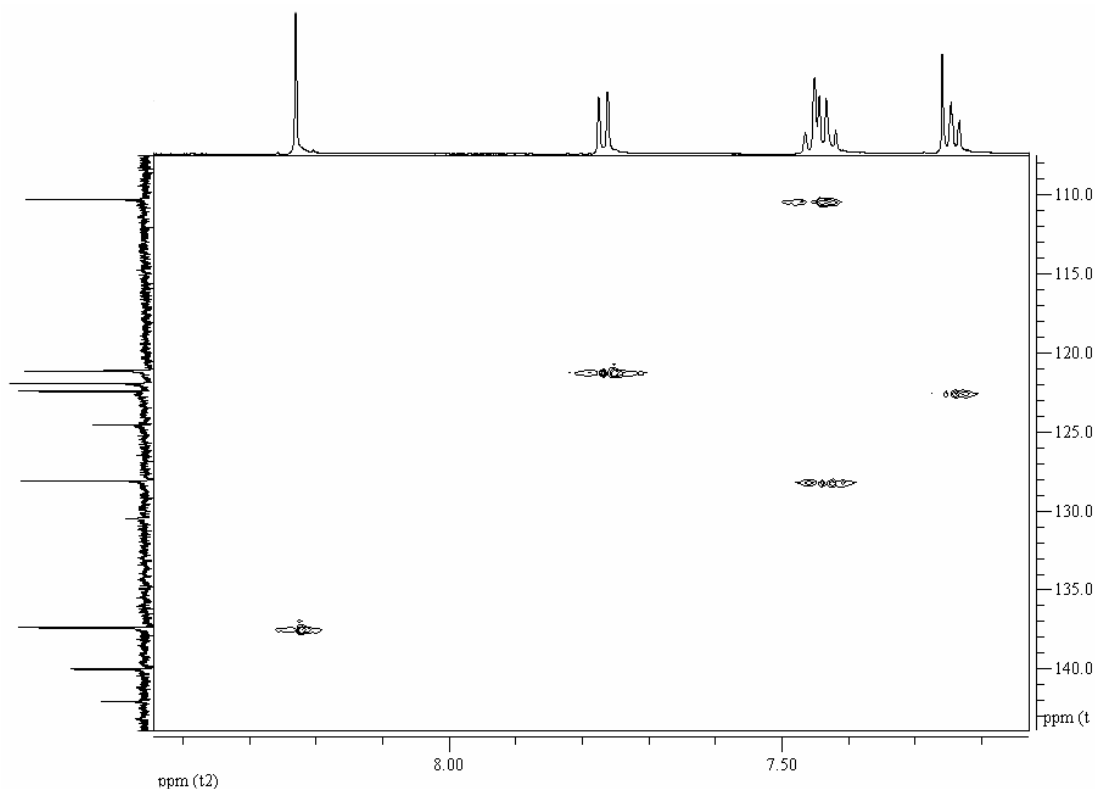
**Figura 46** - Pormenor da zona aromática do composto **189** no espectro de COSY.

O sinal a 7,76 ppm poderia corresponder ao 4'-H ou ao 7'-H. A experiência de HMBC revelou que este sinal é, de facto o 4'-H uma vez que é o único que tem correlação com o sinal de  $^{13}\text{C}$  a 137,3 ppm, que corresponde ao C3' (Tabela 11), conforme se pode avaliar da experiência de HMQC (Figura 47). As principais correlações de HMBC para o composto **189** estão representadas na Tabela 11. Os valores de  $\delta$  dos carbonos quaternários estão assinalados a **negrito** tendo sido devidamente atribuídos usando uma experiência “*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT) DEPT 135.

Os sinais da zona aromática do espectro do composto **189** são então, por ordem crescente de valor de  $\delta$ , 5'-H (7,24 ppm), 6'-H e 7'-H (7,44 ppm), 4'-H (7,76 ppm) e 3'-H (8,23 ppm). Recorrendo à experiência de HMQC atribuíram-se os valores dos carbonos respectivos, não tendo sido possível atribuir inequivocamente os carbonos C6' e C7' porque há sobreposição dos seus



sinais no espectro de  $^1\text{H}$  NMR. Assim, e de acordo com a Figura 47 e a Tabela 11, a 137,3 ppm encontra-se o C3', a 110,2 e 128,0 os C6' e C7', a 122,4 o C5' e a 121,1 o C4'.



**Figura 47** - Pormenor da zona aromática do composto **189** no espectro de HMBC.

Os valores de  $\delta$  dos carbonos quaternários do anel aromático C3a e C7a são 124,5 e 142,0 ppm, respectivamente. O sinal de  $^1\text{H}$  NMR do 5'-H é o único dos sinais da zona aromática que não mostra correlação no HMBC com o sinal do carbono quaternário a 142,0 ppm (Tabela 11). Este sinal tem, contudo, correlação com o sinal de  $^{13}\text{C}$  a 124,5 ppm. É legítimo pensar que o 5'-H deve mostrar preferencialmente correlação como carbono quaternário do anel que lhe fica mais próximo (à distância de 2 ligações), ou seja o C3a, e não o C7a (à distância de 3 ligações). Esta atribuição está de acordo com os valores reportados na literatura.<sup>20</sup>

O singuleto largo a 9,71 ppm corresponde ao protão do grupo formilo e mostrou a correlação HMBC esperada com o sinal de  $^{13}\text{C}$  quaternário a 130,4 ppm, que corresponde ao C16 (Tabela

11). Foi encontrada também uma correlação na experiência “*Nuclear Overhauser effect spectroscopy*” (NOESY) entre o próton do grupo formilo e o multiplete que corresponde aos prótons 6'-H e 7'-H do grupo indazolilo, a 7,44 ppm.

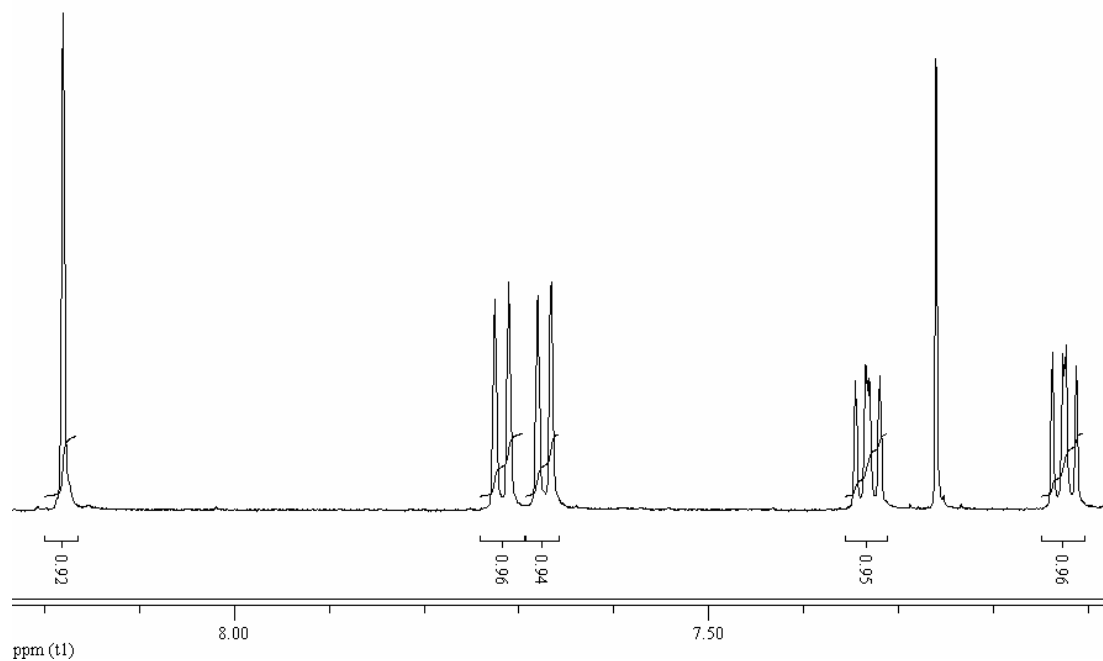
$\delta$ (ppm)		CHO	3'-H	4'-H	6'H e 7'-H	5'-H	6-H	3 $\alpha$ -H	3 $\beta$ - OAc	18-CH <sub>3</sub>	19-CH <sub>3</sub>
		9,71 brs, 1H	8,23 m, 1H	7,76 m, 1H	7,44 m, 2H	7,24 m, 1H	5,43 m, 1H	4,60 m, 1H	2,03 s, 3H	1,26 s, 3H	1,07 s, 3H
C18	15,9										
C19	19,2										
	20,3										
	21,3										
	27,6										
	28,2	•									
	30,3						•				
	30,8										
	33,6									•	
<b>C10</b>	<b>36,7</b>										•
	36,8						•				
	38,0						•				
<b>C13</b>	<b>49,9</b>									•	
	50,1										•
	54,3									•	
C3	73,7										
C6'/C7'	110,2			•		•					
C4'	121,1				•						
C6	121,9										
C5'	122,4				•						
<b>C3a</b>	<b>124,5</b>		•	•	•	•					
C6'/C7'	128,0			•		•					
<b>C16</b>	<b>130,4</b>	•									
C3'	137,3			•							
<b>C5</b>	<b>140,0</b>										•
<b>C7a</b>	<b>142,0</b>		•	•	•						
<b>C17</b>	<b>163,0</b>									•	
CH <sub>3</sub> C=O	170,4							•	•		
C=O	188,0										

Tabela 11 - Principais correlações de HMBC para o composto **189**.

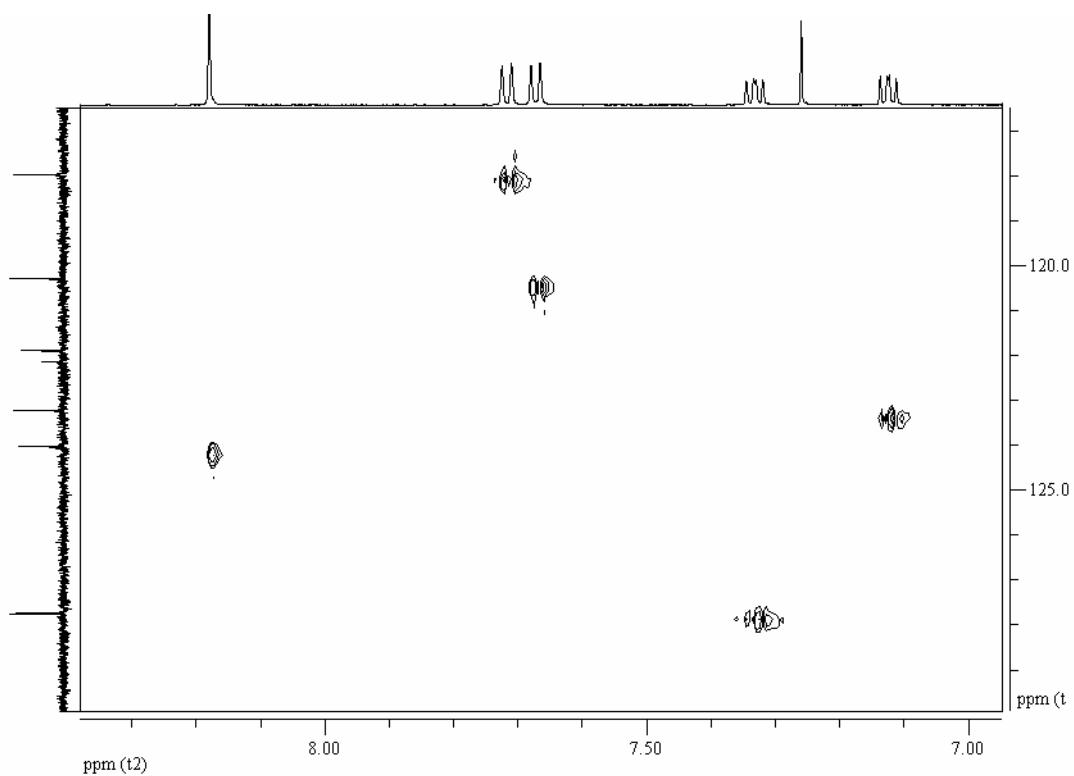
Os sinais a 2,03 e 4,60 ppm, correspondentes aos prótons metílicos do grupo acetilo em C3 e ao 3 $\alpha$ -H, respectivamente, mostraram também a correlação esperada com o sinal do carbono quaternário a 170,4 ppm, atribuído ao carbono carbonílico do grupo acetilo.

Os prótons metílicos em C18 e C19 encontram-se, para este composto, ao contrário da sua ordem habitual, sendo o sinal a 1,07 ppm correspondente aos prótons metílicos do C19 e o sinal a 1,26 ppm correspondente aos prótons metílicos do C18. Assim, o sinal a 1,07 ppm mostra correlação com o sinal do carbono quaternário a 140,0 ppm, no espectro de HMBC, correspondente ao C5. Já o sinal a 1,26 ppm mostra correlação com o sinal do carbono quaternário a 163,0 ppm, atribuído ao C17 (Tabela 11). Depois de atribuídos estes sinais, os valores de  $\delta$  dos carbonos quaternários C10 e C13 foram atribuídos pelas correlações dos seus sinais com os sinais dos prótons metílicos de C19 e C18, respectivamente, como sendo 36,7 e 49,9 ppm.

As principais diferenças nos espectros de NMR entre os compostos das *séries 1 e 2* ocorrem obviamente nos sinais da zona aromática e nos sinais dos carbonos 16 e 17. A análise do composto **190** (Figura 43) revelou que a zona aromática do espectro de  $^1\text{H-NMR}$ , na *série 2*, é composta por um conjunto de 5 sinais, entre 7,12 e 8,18 ppm (Figura 48). O singuleto largo a 8,18 ppm foi atribuído ao 3'-H, por ser o próton com menor probabilidade de acoplamento com prótons vizinhos. A atribuição do próton 4'-H ao multiplete a 7,67 ppm foi feita com base na experiência de HMBC, visto este sinal ser o único que apresenta correlação com o C3', identificado a 124,0 ppm, no espectro de HMQC do composto (Figura 49). As principais correlações de HMBC para o composto **190** estão representadas na Tabela 12.



**Figura 48** - Pormenor da zona aromática do espectro de  $^1\text{H}$  NMR do composto **190**.



**Figura 49** - Pormenor da zona aromática do espectro de HMBC do composto **190**.

$\delta$ (ppm)		CHO	3'-H	7'-H	4'-H	5'H	6'-H	6-H	3 $\alpha$ -H	3 $\beta$ -OAc	18-CH <sub>3</sub>	19-CH <sub>3</sub>
		10,14	8,18	7,71	7,67	7,33	7,12	5,43	4,61	2,03	1,27	1,08
		s, 1H	s, 1H	m, 1H	m, 1H	m, 1H	m, 1H	m, 1H	m, 1H	m, 1H	s, 3H	s, 3H
C18	16,1											
C19	19,2											
	20,4											
	21,3											
	27,6											
	28,6											
	30,1							•				
	30,8											
	34,1										•	
	36,7											
<b>C10</b>	<b>36,8</b>							•				•
	38,0											
<b>C13</b>	<b>49,4</b>										•	
	49,9											•
	54,1										•	
C3	73,6											
C7'	117,6				•		•					
C4'	120,2		•	•		•						
<b>C7a</b>	<b>121,8</b>		•	•	•		•					
C6	122,1											
C6'	123,2			•		•						
C3'	124,0				•							
C5'	127,7				•		•					
<b>C16</b>	<b>133,0</b>	•										
C5	139,9											•
<b>C3a</b>	<b>150,1</b>		•		•	•						
<b>C17</b>	<b>161,3</b>										•	
<u>CH<sub>3</sub>CO</u>	<u>170,4</u>							•	•			
<u>CHO</u>	<u>190,5</u>											

Tabela 12 - Principais correlações de HMBC para o composto 190.

O sinal do 4'-H mostrou ainda correlação com os sinais do C7' (117,6 ppm) e C5' (127,7 ppm) no espectro de HMBC, assim como com dois sinais de carbonos quaternários da zona aromática do espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR, nomeadamente a 121,8 e 150,1 ppm (Tabela 12). A atribuição destes sinais foi feita com base na observação que o multipletto a 7,71 ppm, atribuído ao 7'-H mostrou correlação com apenas um dos sinais dos carbonos quaternários, a 121,8 ppm, o qual deve assim ser o C7a. O sinal do 7'-H mostrou ainda as correlações HMBC esperadas com o C6' (123,2 ppm) e o C4' (120,2 ppm). Os multipletos a 7,33 e 7,12 ppm foram atribuídos aos prótons 5'-H e 6'-H, respectivamente (Tabela 12). O facto de o sinal do 5'-H ser o único que não mostra correlação HMBC com o sinal de carbono quaternário a 121,8 ppm é mais uma evidência experimental para a atribuição deste sinal ao C3a, uma vez que o 5'-H é o próton mais distante deste carbono quaternário (3 ligações). O mesmo ocorre para o 6'-H que apenas mostra correlação com o sinal do C7a. A experiência de COSY confirmou as atribuições dos sinais de  $^1\text{H}$  NMR da zona aromática. A experiência NOESY deste composto mostrou a correlação esperada entre o sinal do próton do grupo formilo a 10,14 ppm e o sinal do próton 3'-H a 8,18 ppm, reflectindo assim a diferente disposição espacial do grupo indazolilo nas duas séries de compostos. Esta diferente disposição espacial é também facilmente visível nas perspectivas ORTEP dos compostos **192** e **195** nas Figuras 50 e 51.

A atribuição dos sinais dos carbonos quaternários do envelope metilénico a 36,8 (C10) e 49,4 ppm (C13) foi feita com base nas suas correlações com os sinais dos prótons metílicos de C19 e C18, a 1,08 e 1,27 ppm, respectivamente, e foi em tudo semelhante ao composto **189** da *série I* (Tabelas 11 e 12). O sinal a 1,27 ppm foi atribuído aos prótons metílicos de C18 em virtude da correlação mostrada com o sinal do C17 a 161,3 ppm. O sinal a 1,08 ppm mostrou correlação com o sinal de carbono quaternário a 139,9 ppm, atribuído ao C5. O sinal do próton do grupo formilo, mostrou a correlação esperada com o sinal do carbono quaternário a 133,0 ppm, atribuído ao C16.

$\delta$ (ppm)		3'-H	7'-H	4'-H	5'-H	6'-H	16-H	4-H	19-CH <sub>3</sub>	18-CH <sub>3</sub>
		8,10	7,70	7,63	7,26	7,06	6,12	5,75	1,23	1,20
		(brs, 1H)	(m, 1H)	(m, 1H)	(m, 1H)	(m, 1H)	(m, 1H)	(brs, 1H)	(s, 3H)	(s, 3H)
C18	15,9									
C19	17,0							•		
	20,5									
	29,7						•			
	31,1									
	32,5							•		
	33,6									
	33,7							•		
	34,6									•
	35,3								•	
<b>C10</b>	<b>38,5</b>							•	•	
<b>C13</b>	<b>46,2</b>						•			•
	53,8								•	
	55,7						•			•
C7'	117,7			•		•				
C16	119,6									
C4'	120,1	•	•		•					
C3'	121,1			•						
<b>C7a</b>	<b>121,7</b>	•	•	•		•				
C6'	122,1		•		•					
C4	124,5									
C5'	126,4			•		•				
<b>C3a</b>	<b>148,9</b>	•		•	•					
<b>C17</b>	<b>151,6</b>	•								•
<b>C5</b>	<b>170,6</b>								•	
<b>C3</b>	<b>199,3</b>									

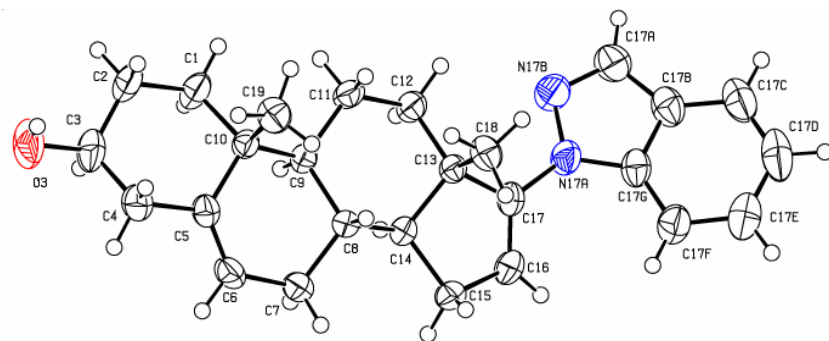
**Tabela 13** - Principais correlações de HMBC para o composto **196**.



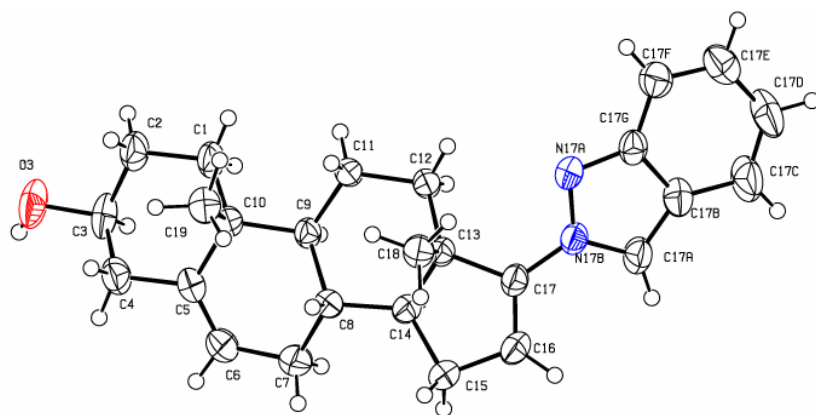
A análise dos espectros de NMR do composto **196** da *série 2* (Figura 43) confirmou a atribuição do sinal do 3'-H a 8,10 ppm, uma vez que no espectro de HMBC, além das correlações esperadas com os dois sinais de carbonos quaternários da zona aromática a 121,7 (C7a) e 148,9 ppm (C3a) e com o C4' (120,1 ppm), tem também correlação com o sinal do C17 a 151,6 ppm (Tabela 13). A ordem dos sinais de  $^1\text{H}$  NMR da zona aromática (entre 7,06 e 8,10 ppm) é a mesma do composto **190**. Os sinais a 6,12 e 5,75 ppm foram atribuídos ao 16-H e ao 4-H, respectivamente. A principal diferença entre os espectros de  $^1\text{H}$  NMR dos compostos **190** e **196** reside na posição dos sinais dos prótons metílicos de C18 e C19. No composto **196** a ordem destes sinais é inversa à do composto **190**, ou seja, o singuleto a 1,23 ppm corresponde aos prótons metílicos de C19 e mostra a correlação HMBC esperada com o sinal do C5 (170,6 ppm) e o singuleto a 1,20 ppm corresponde aos prótons metílicos de C18, com a correlação HMBC esperada com o sinal do C17 (Tabela 13).

A confirmação da estrutura dos compostos **192** e **195** (Figura 43) representativos das *séries 1* e *2*, respectivamente, foi feita por difracção de raios-X (Figuras 50 e 51).<sup>23</sup> Nestes dois compostos, os anéis A/B têm fusão *quasi-trans* e os anéis B/C e C/D têm fusão *trans*. Os substituintes hidroxilo em C3 estão posicionados na face  $\beta$  dos anéis A, com ângulos com a normal ao plano do anel Cremer & Pople<sup>24</sup> 70,3 (16) e 71,51 (10)°, para os compostos **192** e **195**, respectivamente. O anel A exhibe a conformação habitual em cadeira ligeiramente achatada com ângulos médios de torção de 35,6 (1) e 38,0 (1)°, para os compostos **192** e **195**. O anel B, com dois pares de electrões compartilhados entre C5 e C6, assume uma conformação de meia-cadeira, com ângulos médios de torção de 51,77 (15) e 52,63 (8)°, para os compostos **192** e **195**. Mais concretamente, os parâmetros de Cremer&Pople são  $Q = 0,491$  (3) Å,  $\tau = 50,7$  (4)° e  $\phi = 214,2$  (4), para o composto **192** e  $Q = 0,496$  (2) Å,  $\tau = 50,8$  (2)° e  $\phi = 212,4$  (3) para o composto **195**. O anel C exhibe a conformação habitual em cadeira ligeiramente distendida com ângulos médios de torção 56,1 (1) e 54,8 (8)° para os compostos **192** e **195**, respectivamente. A conformação do anel D pode ser descrita como 14-envelope com  $P = 16,3$  (3) e  $\tau = 34,5$  (2)° [ $P = 8,9$  (2) e  $\tau = 36,7$  (2)° para o composto **195**. O substituinte em C17 é equatorial para ambos os compostos. A ligação C17—N17A faz um ângulo de 87,8 (2)° em relação à normal ao plano C&P no composto **192** e para o

composto **195**, a ligação C17—N17B faz um ângulo de 78,36 (11)° em relação à normal ao plano Cremer & Pople. O ângulo de pseudo torção C19—C10...C13—C18 do núcleo esteróide é de 9,55 para o composto **192** e 10,86° para o composto **195**. A distância entre os átomos terminais C3 e C17 é de 8,684 (5) e 8,660 (5) Å, para os compostos **192** e **195**, respectivamente.



**Figura 50** – Perspectiva ORTEP da estrutura molecular do composto **192** obtida por difracção de raios-X.



**Figura 51** – Perspectiva ORTEP da estrutura molecular do composto **195** obtida por difracção de raios-X.

No composto **192**, as moléculas agrupam-se em cadeia com pontes de hidrogénio do tipo O—H...O unindo extremos iguais. As cadeias dispõem-se ao longo do eixo *a* com uma periodicidade pequena de 3 elementos. No composto **195**, as moléculas estão unidas por extremos opostos com o átomo de N1 do grupo indazolilo actuando como aceitador. As cadeias em ziguezague, com uma periodicidade de 14 elementos, dispõem-se ao longo do eixo *b*.

## **2. C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole**

Compostos esteróides contendo uma função carbamato em C17 foram já testados para inibição de enzimas relacionadas com o CP tais como a CYP17<sup>25</sup> e a 5 $\alpha$ -reductase<sup>26</sup> assim como para a inibição de linhas celulares do CP.<sup>27</sup> Com base na reacção de álcoois com reagentes do tipo *N,N'*-carbonildiimidazole, preparou-se uma série de novos compostos esteróides de núcleo androstano contendo uma função carbamato em C17.<sup>28</sup> Os compostos assim preparados obedecem aos princípios gerais de relação estrutura-actividade previamente descritos, com a particularidade de a função carbamato em C17 aumentar a distância entre o anel de 2'-metilimidazole e o C17.

### **2.1 Estratégia de Síntese**

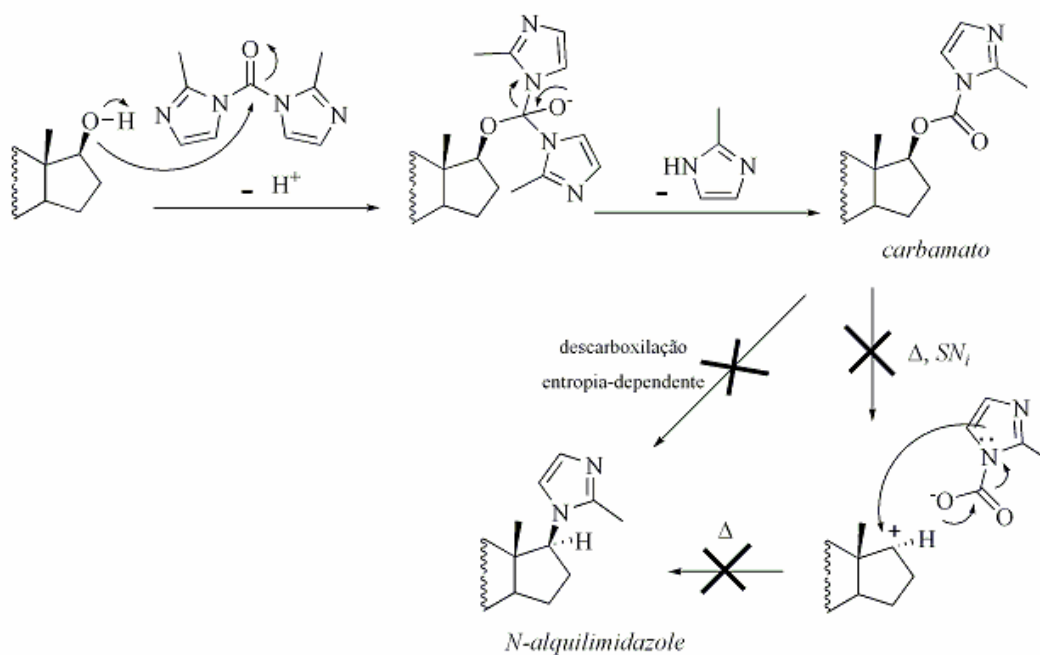
#### **2.1.1 Reacção dos álcoois com compostos do tipo *N,N'*-carbonildiimidazole**

A reacção dos compostos do tipo *N,N'*-carbonildiimidazole com álcoois para formar carbamatos é já conhecida desde 1962.<sup>29</sup> Contudo, trabalhos posteriores demonstraram que, dependendo das características do substrato e das condições da reacção, também é possível a obtenção de *N*-alquilimidazóis e que o processo ocorre com retenção da configuração do álcool de partida.<sup>30, 31</sup>

Para álcoois alifáticos primários e secundários verificou-se apenas a obtenção de carbamatos, independentemente do solvente usado, acetonitrilo ou *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), e da temperatura da reacção.<sup>31</sup> No caso da reacção de álcoois benzílicos primários com o 1,1'-carbonildiimidazole (CDI), o produto obtido depende da natureza do álcool de partida e das condições reaccionais. Em geral, o uso de solventes de ponto de ebulição mais elevado como a NMP, os xilenos ou a diglima, permitem temperaturas de reacção elevadas, as quais favorecem a formação do *N*-alquilimidazole. Verificou-se que sistemas benzílicos ricos em electrões

favorecem a formação de *N*-alquilimidazóis e não de carbamatos. Com álcoois benzílicos secundários obtiveram-se misturas de carbamatos com *N*-alquilimidazóis e produtos de desidratação.

Foi sugerido que o mecanismo mais provável para a reacção envolvia a formação inicial do carbamato que sofria descarboxilação entropia-dependente para originar o *N*-alquilimidazole.<sup>31</sup> Foi também proposto um mecanismo do tipo substituição nucleofílica intramolecular ( $SN_i$ ) para a reacção.<sup>30</sup> No caso particular dos  $\beta$ -aminoálcoois *N,N*-dissubstituídos, a formação de *N*-alquilimidazóis parece ocorrer por via de um intermediário aziridina.<sup>31, 32</sup> A configuração original do substrato é mantida e a reactividade é tanto menor quanto maior for o impedimento estereoquímico do álcool. A participação do grupo amina é fundamental para a obtenção do *N*-alquilimidazole porque assiste na degradação do carbamato inicialmente formado.



**Figura 52** - Mecanismo da reacção de 17 $\beta$ -hidroxiesteróides com o CBMI.

A reacção geral do CDI com álcoois já foi usada com sucesso na preparação de *N*-alquilimidazóis de interesse.<sup>33-36</sup> Nos substratos esteróides usados neste trabalho, a reacção com o 1,1'-carbonilbis(2-metilimidazole) (CBMI) decorreu no sentido da formação dos respectivos carbamatos (Figura 52).<sup>28, 37</sup> A reacção envolve ataque nucleofílico do álcool ao grupo carbonilo do CBMI, com formação de um intermediário tetraédrico que se decompõe para dar o carbamato, com libertação de 2'-metilimidazole. Não se verificou qualquer degradação do carbamato em *N*-alquilimidazole.

## **2.2 Resultados**

### **2.2.1 Aplicação da estratégia de síntese**

Para preparar os compostos pretendidos, fizeram-se reagir de vários substratos esteróides da série androstano com um excesso de CBMI, num solvente apropriado, à temperatura de refluxo, sob atmosfera de N<sub>2</sub> (Tabela 14, Figura 53). Para a síntese dos compostos **206**, **207** (Tabela 14, entradas 5-6) e **211** (Figura 53), o solvente escolhido foi o diclorometano, enquanto para sintetizar o composto **214** (Figura 53) foi usada uma mistura de acetonitrilo e 1,2-dicloroetano para promover a dissolução completa do substrato. Para a reacção com os restantes substratos foi usado acetonitrilo. Os rendimentos obtidos variaram entre os 73 e os 94%. A reacção ocorreu facilmente para os substratos escolhidos e sem necessidade de passos finais de purificação a não ser uma lavagem com água.

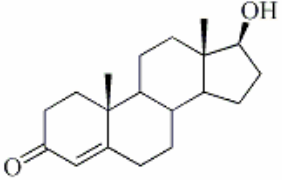
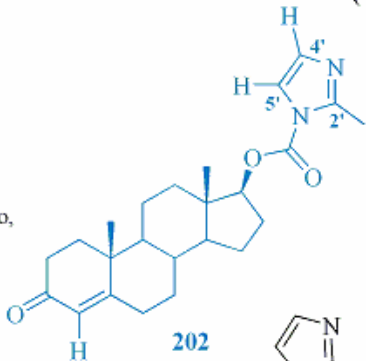
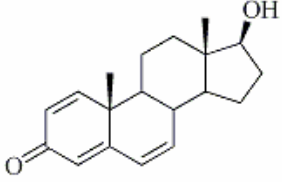
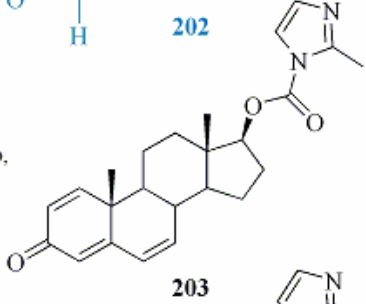
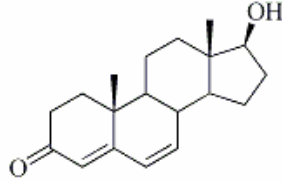
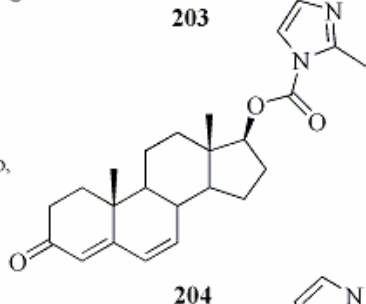
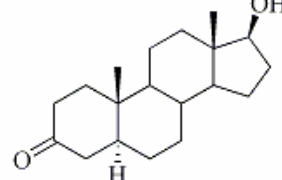
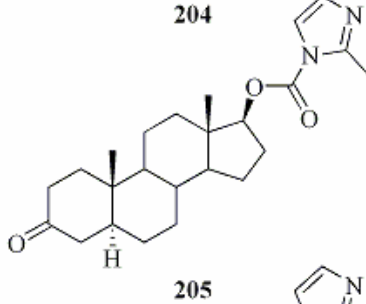
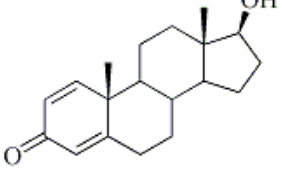
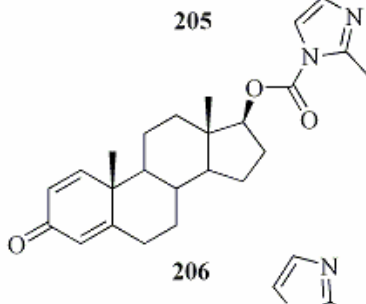
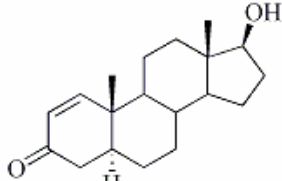
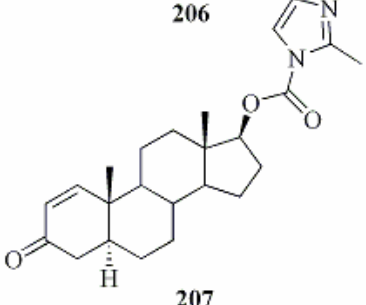
Entrada	Substrato	Condições de Reacção	Produto	Rendimento (%)
1	 6	CBMI (1,6 eq); CH <sub>3</sub> CN seco, refluxo, N <sub>2</sub> , 24 h	 202	82
2	 197	CBMI (2,5 eq); CH <sub>3</sub> CN seco, refluxo, N <sub>2</sub> , 20 h	 203	88
3	 198	CBMI (3,5 eq); CH <sub>3</sub> CN seco, refluxo, N <sub>2</sub> , 37 h	 204	82
4	 199	CBMI (2 eq); CH <sub>3</sub> CN seco, refluxo, N <sub>2</sub> , 60 h	 205	94
5	 200	CBMI (2 eq); CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> seco, refluxo, N <sub>2</sub> , 28 h	 206	73
6	 201	CBMI (2,8 eq); CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> seco, refluxo, N <sub>2</sub> , 5 h	 207	84

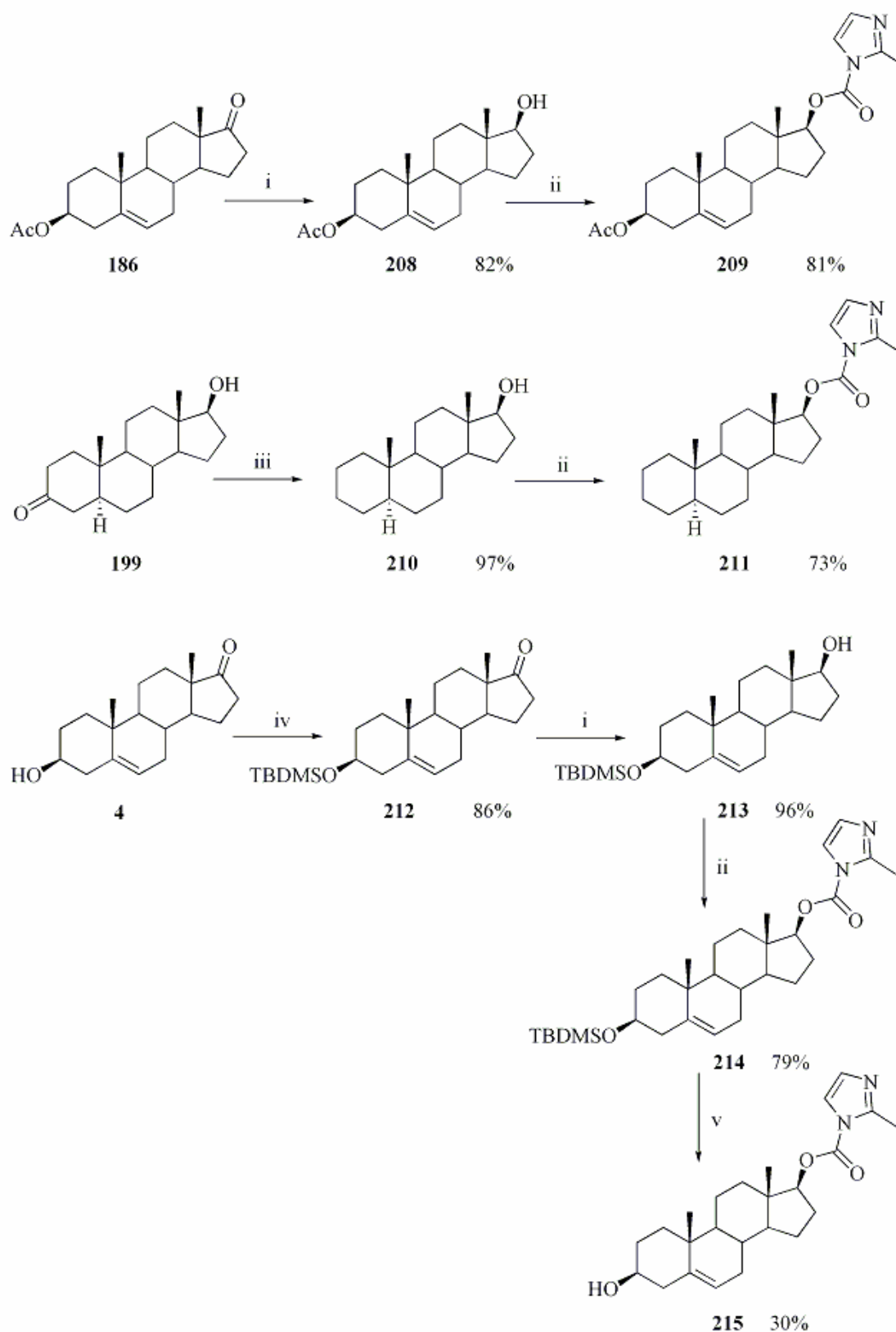
Tabela 14 - Reacção de 17β-hidroxiesteróides com o CBMI.

Para a síntese do composto **209** (Figura 53), antes de usar a reacção geral com o CBMI, o acetato de DHEA **186** foi reduzido com NaBH<sub>4</sub> numa mistura de tetra-hidrofurano (THF)/MeOH 1:1 originando o derivado 17β-hidroxiado **208**, com 82% de rendimento.<sup>14</sup>

A síntese do composto **211** (Figura 53) começou com a redução do composto **199** com pó de zinco em ácido acético glacial.<sup>2, 38</sup> Este processo constitui uma modificação da reacção de Clemmensen clássica, que é feita com HCl (40%) e Zn(Hg) num solvente orgânico, e decorreu de forma quimiosselectiva, visto ter-se conseguido reduzir exclusivamente o grupo carbonilo em C3 deixando-se inalterado o grupo hidroxilo em C17. O composto **210** foi submetido ao procedimento geral com o CBMI, em diclorometano, ao refluxo, para originar o composto **211**, com 73% de rendimento.

Para a síntese do composto **215** (Figura 53), foi necessário proteger o grupo hidroxilo em C3 na forma de éter silílico para se poder preparar o derivado 17β-hidroxiado **213** com vista à introdução da função carbamato. Assim, tratou-se a DHEA **4** com cloreto de *t*-butildimetilsililo (TBDMSCl) em DMF, na presença de 4-dimetilaminopiridina (DMAP),<sup>39, 40</sup> para se obter o composto **212**, que foi reduzido com NaBH<sub>4</sub> numa mistura de THF/MeOH 1:1 para originar o composto desejado **213**. Este foi posteriormente submetido ao procedimento geral com CBMI. A desprotecção selectiva do grupo hidroxilo em C3 foi feita com uma mistura de cloreto de trimetilsililo (TMSCl) e água à temperatura ambiente, que permitiram a geração de HCl *in situ*,<sup>41</sup> criando as condições necessárias para a desprotecção pretendida. O solvente escolhido foi o etanol devido à fraca solubilidade do substrato em acetonitrilo. O composto **215** foi obtido com 30% de rendimento após purificação por cromatografia *flash*.



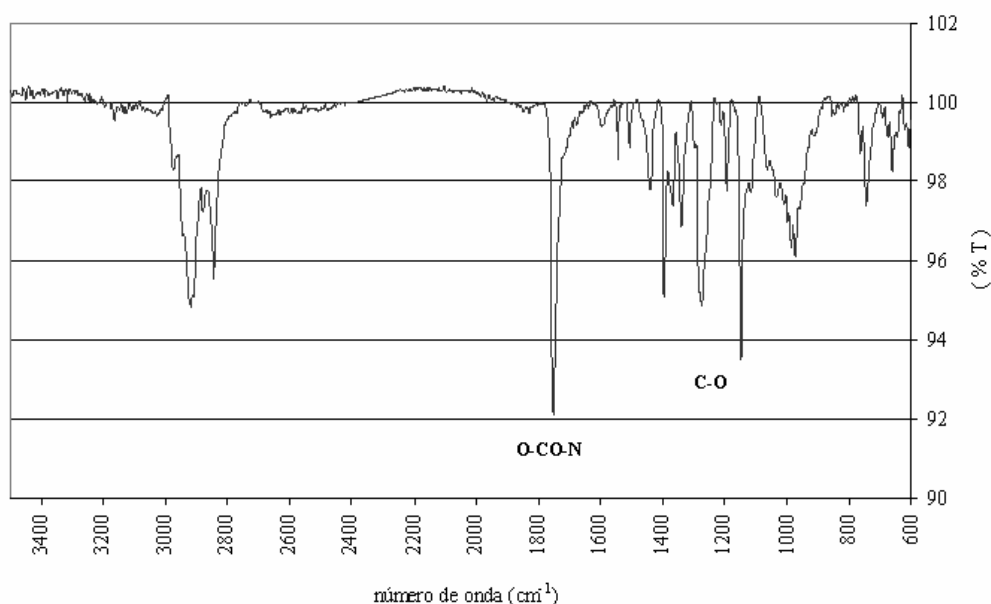


**Figura 53** - Síntese dos compostos **209**, **211** e **215**. **i.** NaBH<sub>4</sub>, THF/MeOH 1:1, r. t.; **ii.** CBMI, solvente, refluxo, N<sub>2</sub>; **iii.** Zn, CH<sub>3</sub>COOH glacial, 70°C; **iv.** TBDMSCl, DMAP, NEt<sub>3</sub>, DMF; r. t.; **v.** TMSCl/H<sub>2</sub>O, EtOH, r. t..

## 2.2.2 Aspectos seleccionados da elucidação estrutural dos C17 carbamatos derivados do 2'-metilimidazole

Os produtos finais de reacção foram caracterizados por IR e NMR 1D e 2D. A elucidação estrutural que se segue foi feita com base nestas técnicas e em literatura relacionada.<sup>20-22, 42</sup>

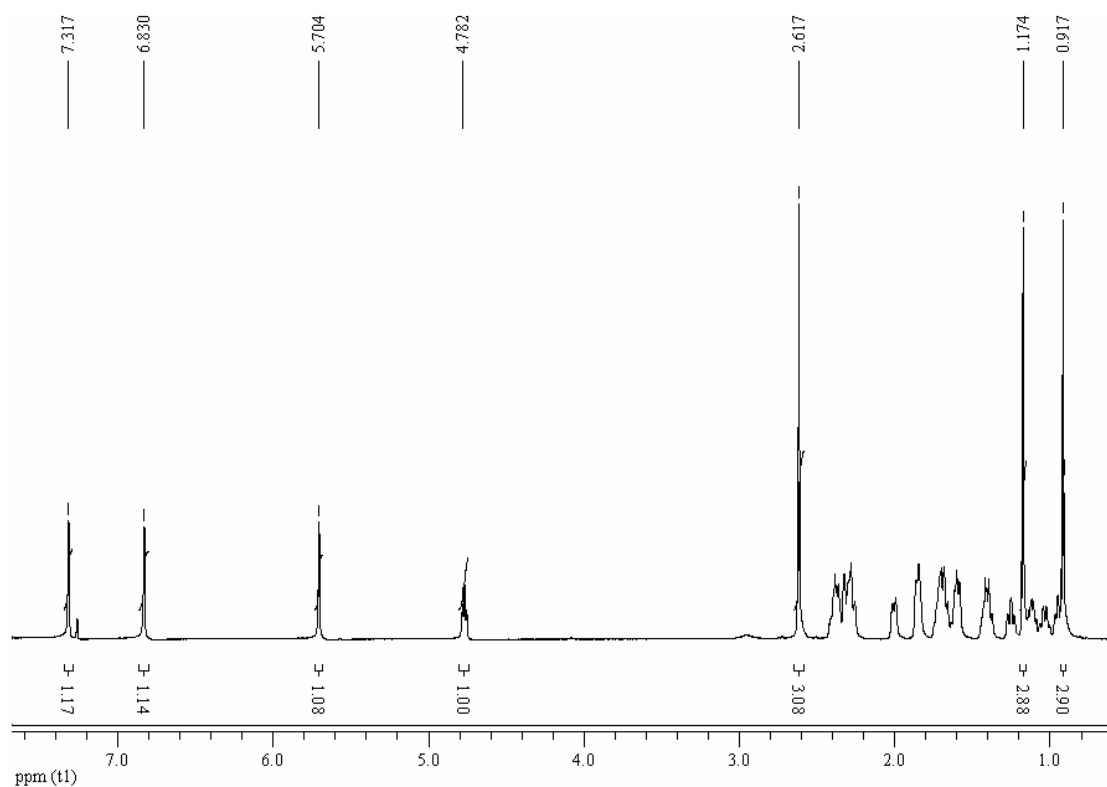
O padrão de IR da função carbamato pode ser facilmente visualizado se atentarmos no espectro do composto **211** (Figura 53). A energia de vibração da ligação C=O aparece como uma banda forte a 1751  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 54). Para a ligação C-O, é visível um par de bandas a 1149 e 1273  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 54** – Espectro IR do composto **211**.

A região aromática do espectro de  $^1\text{H}$  NMR deste tipo de compostos consiste num conjunto de dois sinais, 6,83 (brs, 1H) e 7,31 (brs, 1H), correspondentes aos prótons aromáticos do anel de 2'-metilimidazole, conforme se pode avaliar pela Figura 55 que corresponde ao espectro de  $^1\text{H}$  NMR do composto **202** escolhido como exemplo (Tabela 14, entrada 1). O sinal a 2,61 (s, 3H) ppm corresponde aos prótons metílicos do anel de 2'-metilimidazole. Os singuletos a 0,91 e 1,17 ppm, integrando 3 prótons cada, foram atribuídos aos prótons metílicos de C18 e C19, respectivamente.

Os sinais do próton olefínico 4-H e do 17 $\alpha$ -H encontram-se a 5,70 e 4,78 ppm, respectivamente, e cada um integra 1 próton.



**Figura 55** – Espectro de  $^1\text{H}$  NMR do composto **202**.

O espectro de  $^{13}\text{C}$  do composto **202** mostra 8 sinais de valor de  $\delta$  superior ao do  $\text{CDCl}_3$  que foram convenientemente atribuídos por HMBC (Figura 56, Tabela 15). No total de 24 átomos de carbono da estrutura, 6 correspondem a carbonos quaternários, conforme se pode avaliar pela experiência de DEPT 135 (Figura 57). Estes carbonos estão devidamente assinalados a **negrito** na Tabela 15.

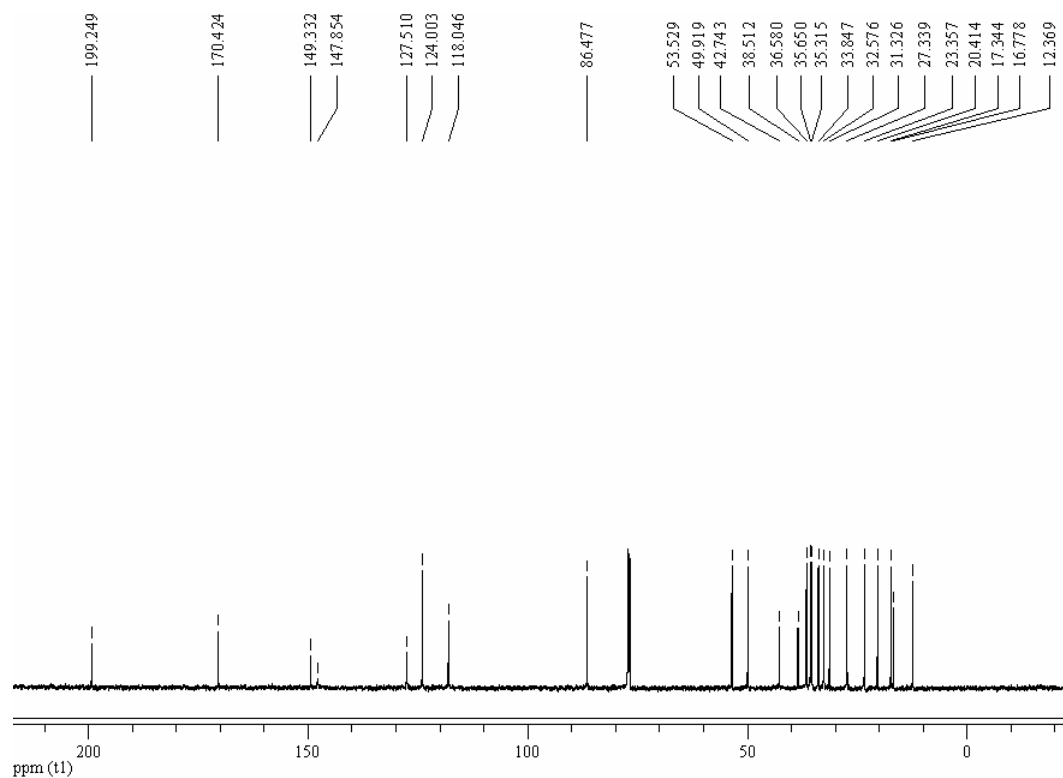


Figura 56 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR do composto **202**.

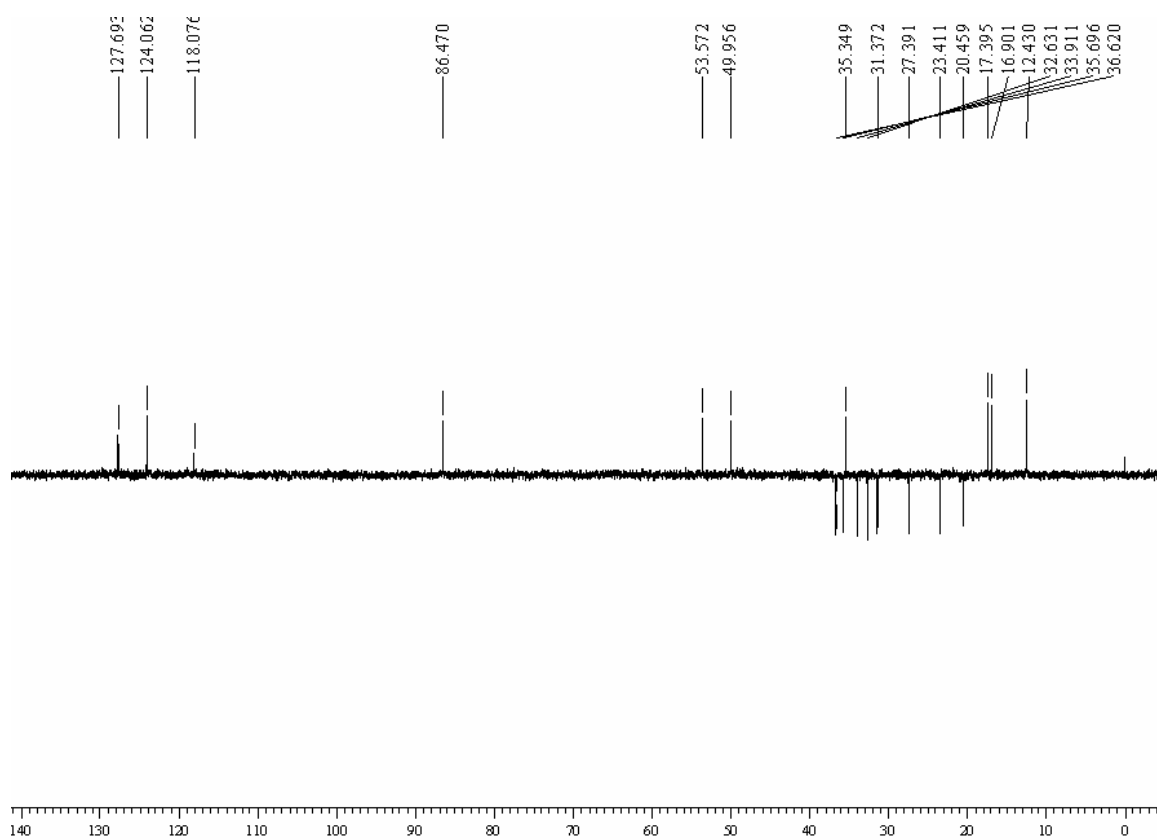


Figura 57 – DEPT 135 do composto **202**.

$\delta$ (ppm)		5'-H	4'-H	4-H	17 $\alpha$ -H	2'-CH <sub>3</sub>	19-CH <sub>3</sub>	18-CH <sub>3</sub>
		7,31 (brs, 1H)	6,83 (brs, 1H)	5,70 (brs, 1H)	4,78 (m, 1H)	2,61 (brs, 1H)	1,17 (brs, 1H)	0,91 (brs, 1H)
C18	12,3				•			
2'-CH <sub>3</sub>	16,7							
C19	17,3			•				
	20,4							
	23,3							
	27,3				•			
	31,3							
	32,5			•				
	33,8							
	35,3							
	35,6							
	36,5							•
C10	38,5			•			•	
C13	42,7				•			•
	49,9							•
	53,5						•	
C17	86,4							•
C5'	118,0					•		
C4	124,0							
C4'	127,5	•				•		
C2'	147,8	•	•			•		
OCO	149,3				•			
C5	170,4			•			•	
C3	199,2			•				

Tabela 15 – Principais correlações de HMBC para o composto 202.

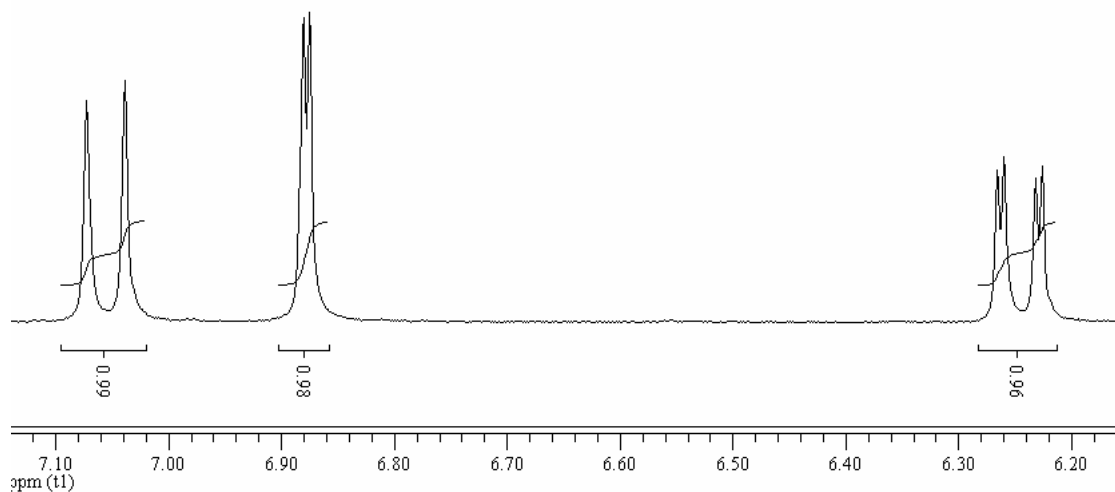
O espectro de HMBC mostrou que ambos os sinais da zona aromática do espectro de <sup>1</sup>H NMR têm correlação com um sinal de um carbono quaternário a 147,8 ppm e que o sinal a 7,31 ppm tem correlação com um sinal de <sup>13</sup>C a 127,5 ppm, que foi atribuído com base em literatura relacionada com sendo o C4' (Tabela 15).<sup>20, 42</sup> Assim sendo, o sinal a 7,31 ppm corresponde ao 5'-H e o sinal a 6,83 ppm corresponde ao 4'-H. O singuleto a 2,61 ppm mostrou correlação com os sinais dos carbonos aromáticos C4' e C5' e o carbono quaternário a 147,8 ppm. Este último foi assim atribuído ao C2' do anel de 2'-metilimidazole. O carbono quaternário a 149,3 ppm mostrou

correlação exclusivamente com o sinal do 17 $\alpha$ -H e foi por isso atribuído ao carbono do grupo carbonilo da função carbamato (OCO).

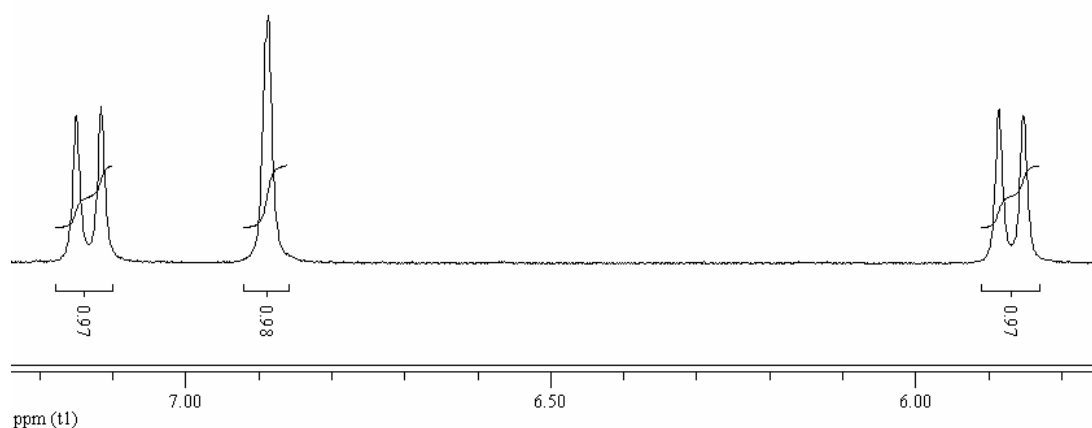
O sinal de  $^{13}\text{C}$  a 170,4 ppm foi atribuído ao C5 em virtude da sua correlação com o sinal de  $^1\text{H}$  NMR a 1,17 ppm, correspondente aos prótons metílicos de C19 (Tabela 15). Por sua vez, o sinal de  $^1\text{H}$  NMR dos prótons metílicos de C18 a 0,91 ppm mostrou a correlação esperada com o sinal de  $^{13}\text{C}$  NMR a 86,4 ppm, atribuído ao C17. Os sinais dos carbonos quaternários a 38,5 e 42,7 ppm foram atribuídos ao C10 e ao C13 em função das suas correlações com os prótons metílicos de C19 e C18, respectivamente. Para o sinal do próton olefínico 4-H obtiveram-se as correlações esperadas com o C19, C10, C5 e C3.

A atribuição dos sinais dos prótons olefínicos dos compostos **203**, **206** e **207** (Tabela 14, entradas 2, 5 e 6) foi feita por análise conjunta dos espectros das estruturas. O espectro  $^1\text{H}$  NMR do composto **206**, um derivado 1,4-dieno, mostra um duplo dubleto a 6,24 ppm, de  $J_1 = 10,2$  Hz e  $J_2 = 1,8$  Hz e um dubleto a 7,05 ppm, com  $J = 10,2$  Hz (Figura 58). O sinal de valor de  $\delta$  mais baixo foi atribuído ao 2-H que tem assim uma constante de acoplamento elevado (10,2 Hz) com o 1-H e um acoplamento mais fraco com o próton mais distante 4-H (1,8 Hz).

O espectro  $^1\text{H}$  NMR do composto **207**, um derivado 1-eno, valida esta atribuição (Figura 59). O duplo dubleto deixa de ser visível no espectro em virtude de não haver próton 4-H olefínico e este passar a exibir dois dubletos (5,85 e 7,11 ppm) de constante de acoplamento vicinal 10,2 Hz. No caso do composto anterior, a dupla ligação em C4 provavelmente provoca uma distorção no anel A que adquire uma disposição espacial que permite o acoplamento entre o 2-H e o 4-H. O mesmo já não acontece no composto **207**.



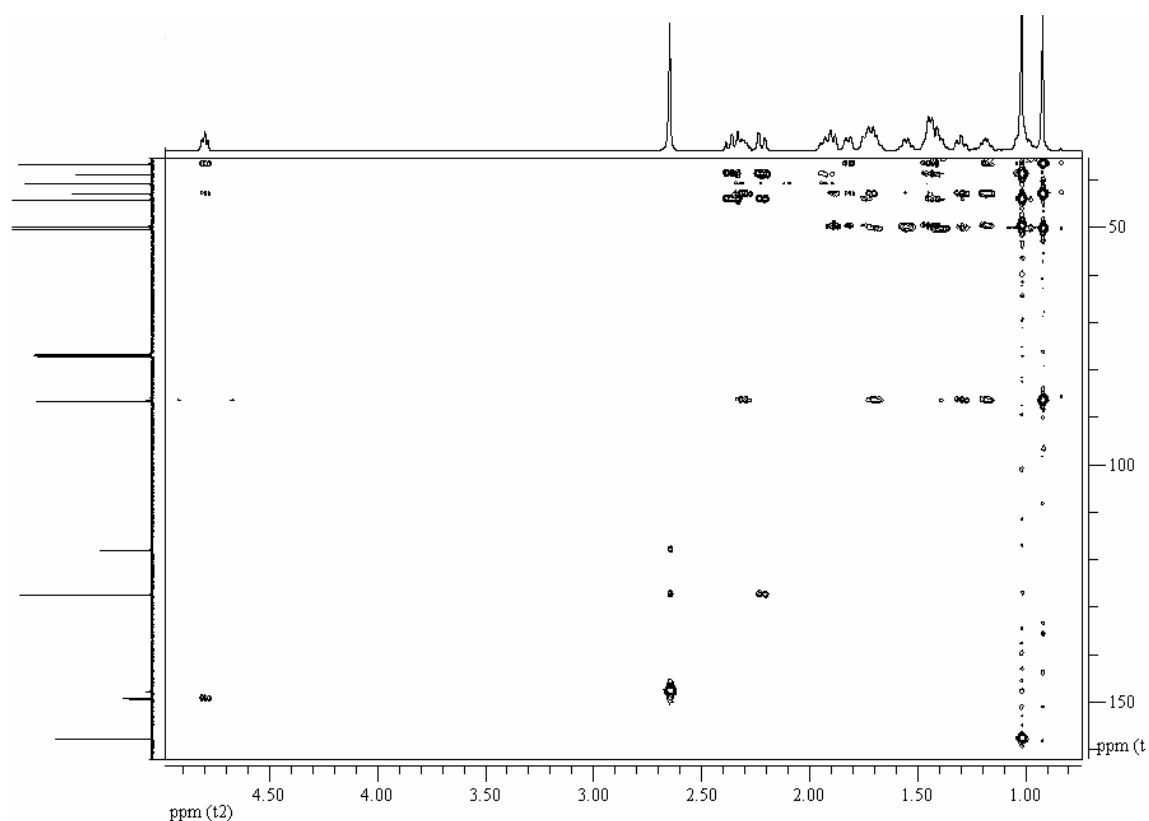
**Figura 58** – Pormenor do espectro de  $^1\text{H}$  NMR do composto **206**.



**Figura 59** – Pormenor do espectro de  $^1\text{H}$  NMR do composto **207**.

A atribuição do sinal a 7,11 ppm no espectro de  $^1\text{H}$  NMR do composto **207** ao 1-H (Figura 59) foi confirmada na experiência de HMBC (Figura 60). O singuleto a 1,02 ppm, integrando os 3 prótons metílicos de C19 mostra correlação com o sinal de  $^{13}\text{C}$  NMR a 158,0 ppm, identificado como o C1 que está à distância de 2 ligações, mas não mostra correlação com o sinal a 127,8 ppm, que corresponde ao C2 a 3 ligações de distância. Esta atribuição está de acordo com literatura relacionada.<sup>22</sup>

O singuleto a 0,92 ppm corresponde aos prótons metílicos de C18 e mostra a correlação esperada com o sinal do C17 a 86,8 ppm (Figura 60). O valor de  $\delta$  dos carbonos 10 e 13 foi atribuído em virtude da correlação dos sinais dos prótons metílicos de C19 e C18, respectivamente, como sendo 38,9 e 43,0 ppm. É ainda visível na Figura 60 a correlação do multipletto a 4,80 ppm, correspondente ao 17 $\alpha$ -H com o sinal de  $^{13}\text{C}$  do carbono carbonílico da função carbamato a 149,6 ppm e com o sinal do C13. O sinal dos prótons metílicos do anel de 2'-metilimidazole a 2,65 ppm mostra as correlações esperadas com os sinais a 118,3 127,7 e 147,1 ppm, correspondentes a C5', C4' e C2'.

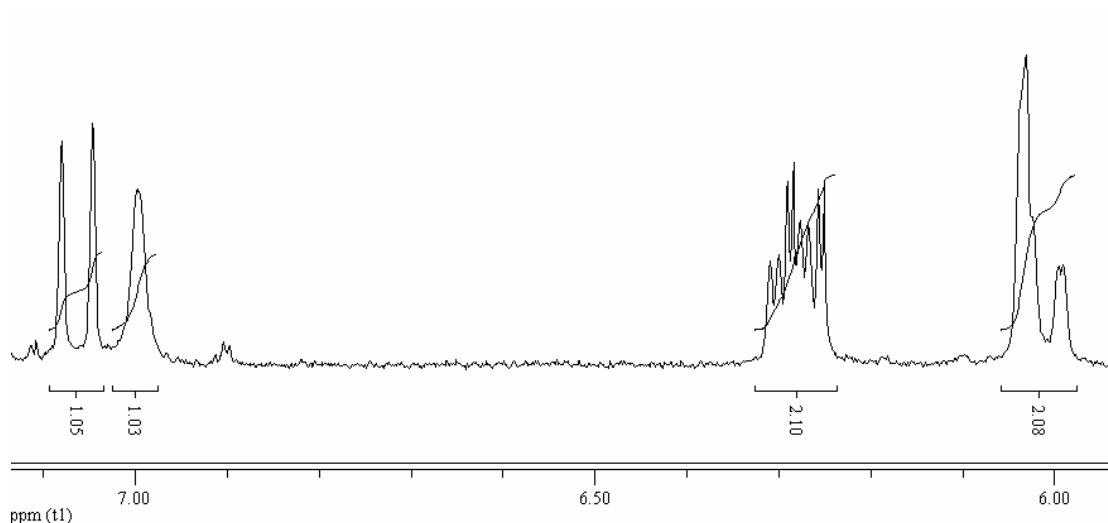


**Figura 60** – Pormenor do espectro de HMBC do composto **207**.

As posições dos sinais dos prótons 1-H e 2-H mantêm-se no espectro de  $^1\text{H}$  NMR do composto **203** (Figura 61). Neste caso, o duplo dubleto do 2-H a 6,01 ppm sobrepõe-se ao sinal do 4-H. O



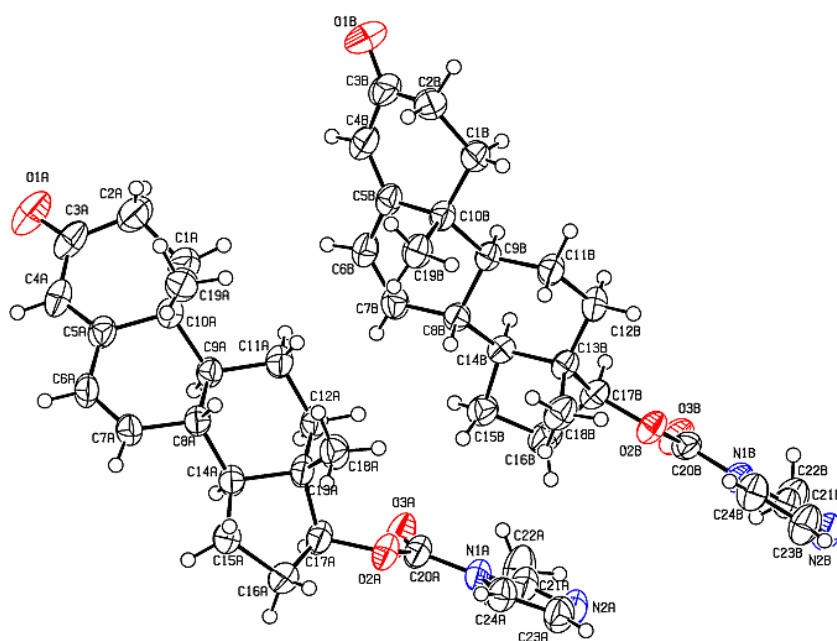
sinal do 1-H é um duplete a 7,06 ppm, com  $J = 10,2$  Hz. Os sinais dos prótons 6-H e 7-H aparecem sobrepostos como um multipletto a 6,28 ppm.



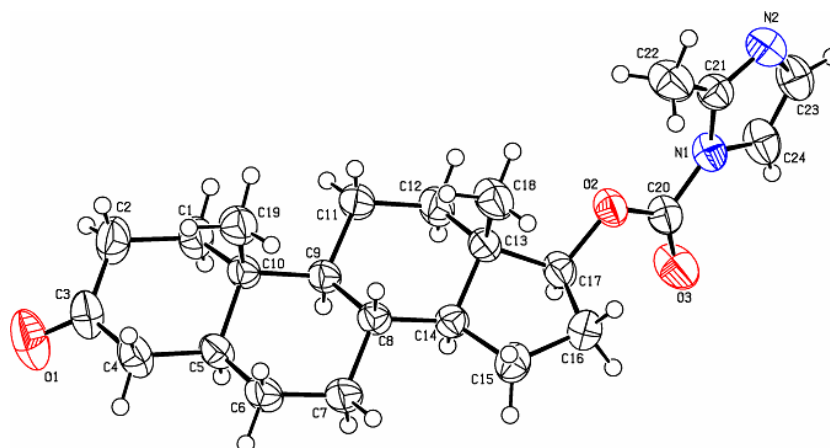
**Figura 61** – Pormenor do espectro de  $^1\text{H}$  NMR do composto **203**.

A confirmação da estrutura dos compostos **204** e **205** (Tabela 14, entradas 2-3) foi realizada por difracção de raios-X (Figuras 62 e 63). No composto **204** existem duas moléculas independentes, cujos átomos são designados respectivamente pelos índices A e B enquanto no composto **205** existe apenas uma molécula independente.

Em ambos os compostos, os anéis A/B têm fusão *quasi-trans*, e os anéis B/C e C/D têm fusão *trans*. Os átomos O1 (O1A e O1B) ligados a C3 (C3A e C3B) estão posicionados na face  $\alpha$  dos anéis A, com ângulos de Cremer & Pople<sup>24</sup> de  $66,3(1)^\circ$  no composto **205**, e  $79,8(2)^\circ$  (C3A–O1A) e  $79,8(2)^\circ$  (C3B–O3B) no composto **204**. No composto **204** o anel A, com 2 pares de electrões partilhados entre C4 e C5, adopta uma configuração em meia-cadeira, o mesmo acontecendo no anel B, em que C6 e C7 partilham também 2 pares de electrões. A configuração do anel C, por sua vez, é em cadeira distendida, e a do anel D é em envelope. No composto **205**, as configurações dos vários anéis são semelhantes às do composto **204**.



**Figura 62** – Perspectiva ORTEP da estrutura molecular do composto **204** obtida por difração de raios-X.



**Figura 63** – Perspectiva ORTEP da estrutura molecular do composto **205** obtida por difração de raios-X.

A função carbamato na molécula B do composto **204** apresenta uma conformação muito semelhante à do mesmo grupo no composto **205**. Os ângulos de torção da função carbamato no composto **204** são, para a molécula A C16A–C17A–O2A–C20A 143,1(2)° e C13A–C17A–O2A–C20A -99,4(3)°, e para a molécula B C16B–C17B–O2B–C20B 73,1(3)° e C13B–C17B–O2B–C20B -168,9(2)°, mais parecidos com os ângulos de torção equivalentes do composto **205**, C16–C17–O2–C20 86,6(2)° e C13–C17–O2–C20 -155,2(1)°.

No composto **204** cada molécula A liga-se a uma molécula B vizinha por pontes de H do tipo C–H···O, em que os átomos O2A e O2B não estão envolvidos. No composto **205**, os átomos O1 e O3 estão envolvidos em pontes de H do tipo C–H···O, respectivamente com os átomos C24 e C19 das moléculas vizinhas, formando uma rede complexa de ligações hidrogénio.

### **3. Conclusões**

As estratégias de síntese escolhidas inicialmente foram bem sucedidas permitindo a preparação de uma série de 15 novos compostos esteróides de núcleo androstano, funcionalizados em C17. As suas estruturas foram elucidadas por recurso a várias técnicas entre as quais se destacam o IR, a NMR 1D e 2D e a difracção de raios-X.

A reacção chave na preparação dos derivados do indazole **191-196** foi a substituição nucleofílica vinílica de um derivado cloroformilado **187** o qual se obteve através da reacção do reagente de Vilsmeier com o composto **186**. A reacção permitiu a obtenção de dois produtos que diferiram entre si no átomo de N que se liga ao C17 do núcleo esteróide, os quais originaram em reacções subsequentes os compostos da *série 1* **191-193** e *série 2* **194-196**. Entre as estratégias de desformilação disponíveis, apenas o uso de um complexo catiónico com ligandos de fenilfosfina  $[Rh(dppp)_2]Cl$  permitiu a obtenção dos produtos desejados **191** e **194**. A hidrólise alcalina do grupo 3 $\beta$ -acetilo originou os compostos 3 $\beta$ -hidroxilados **192** e **195**. A reacção de Oppenauer permitiu preparar os derivados 3-oxo-4-eno **193** e **196**.

Para a síntese dos carbamatos derivados do 2'-metilimidazole **202-207**, **209**, **211** e **215**, foi explorada a reacção do CBMI com vários substratos esteróides 17 $\beta$ -hidroxilados. A reacção originou invariavelmente como produto final um carbamato, com bons rendimentos e facilidade de recuperação dos produtos obtidos.

#### 4. Referências

1. Moreira, V. M.; Vasaitis, T. S.; Njar, V. C.; Salvador, J. A. R. Synthesis and evaluation of novel 17-indazole androstene derivatives designed as CYP17 inhibitors. *Steroids* **2007**, *72*, 939-948.
2. Kurti, L.; Czako, B. *Strategic applications of named reactions in organic synthesis*, Elsevier Academic Press: Burlington - San Diego - London, **2005** e referências aí citadas.
3. Marson, C. M. Reactions of carbonyl compounds with (monohalo) methyleneiminium salts (vielsmeir reagents). *Tetrahedron* **1992**, *48*, 3659-3726 e referências aí citadas.
4. Sciaky, R.; Pallini, U. On the action of the Vilsmeier-Haack reagent on steroidal ketones and derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1964**, *28*, 1839-1845.
5. Siddiqui, A. U.; Rao, V. U. M.; Maimirani, M.; Siddiqui, A. H. Heterocyclic Steroids: Synthesis of Androsteno[17,16-*d*]Pyrazoles and Androsteno[17,16-*e*]Pyrimidines. *J. Heterocyclic Chem.* **1995**, *32*, 353-354.
6. Modena, G. Reactions of nucleophiles with ethylenic substrates. *Acc. Chem. Res.* **1971**, *4*, 73-80.
7. Rappoport, Z. Nucleophilic Vinylic Substitution. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1969**, *7*, 1-114 e referências aí citadas.
8. Njar, V. C.; Klus, G. T.; Brodie, A. M. H. Nucleophilic Vinylic "Addition-elimination" Substitution Reaction of 3 $\beta$ -Acetoxy-17-chloro-16-formylandrosta-5,16-diene: A Novel and General Route to 17-Substituted Steroids. Part 1 - Synthesis of Novel 17-Azoly- $\Delta^{16}$ -steroids; Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (17 $\alpha$ -Lyase). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2777-2782.
9. Njar, V. C.; Kato, K.; Nnane, I. P.; Grigoryev, D. N.; Long, B. J.; Brodie, A. M. Novel 17-Azoly Steroids, Potent Inhibitors of Human Cytochrome 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> ): Potential Agents for the Treatment of Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 902-912.

10. Doughty, D. H.; Pignolet, L. H. Catalytic decarbonylation of aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 7083-7085 e referências aí citadas.
11. Baird, M. C.; Nyman, C. J.; Wilkinson, G. The decarbonylation of aldehydes by tris(triphenylphosphine)chlororhodium(I). *J. Chem. Soc. A* **1968**, 348-351.
12. Ohno, K.; Tsuji, J. Organic Syntheses by means of noble metal compounds. XXXV. Novel decarbonylation reactions of aldehydes and acyl halides using rhodium complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 99-107.
13. Morrison, R.; Boyd, R. *Química Orgânica*, Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, **1996**.
14. Fried, J.; Edwards, J. A. *Organic Reactions in Steroid Chemistry*, Van Nostrand Reinhold Company: New York - Cincinnati - Toronto - London - Melbourne, **1972**.
15. Graauw, C. F.; Peters, J. A.; van Bekkum, H.; Huskens, J. Meerwein-Ponndorf-Verley Reductions and Oppenauer Oxidations: An integrated approach. *Synthesis* **1994**, 1007-1017 e referências aí citadas.
16. Salvador, J. A. R.; Silvestre, S. M.; Moreira, V. M. Catalytic oxidative processes in steroid chemistry: allylic oxidation,  $\beta$ -selective epoxidation, alcohol oxidation and remote functionalization reactions. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 2227-2257 e referências aí citadas.
17. Kocovsky, P.; Baines, R. S. Synthesis of estrone via thallium(III)-mediated fragmentation of a 19-hydroxyandrost-5-ene precursor. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6139-6140.
18. Reich, R.; Keana, J. F. Oppenauer Oxidations Using 1-Methyl-4-Piperidone as the Hydride Acceptor *Synth. Commun.* **1972**, 323.
19. Katritzky, A. R.; Pozharskii, A. F. *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, Pergamon: Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, **2000**.
20. Begtrup, M.; Elguero, J.; Faure, R.; Camps, P.; Estopa, C.; Ilavsky, D.; Fruchier, A.; Marzin, C.; Mendoza, J. NMR Studies in the Heterocyclic Series. Part 31. Effect of *N*-Substituents on the  $^{13}\text{C}$  NMR Parameters of Azoles. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26*, 134-151.


21. Blunt, J. W.; Stothers, J. B.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of steroids - A survey and Commentary. *Org. Magn. Res.* **1977**, *9*, 439-464.
22. Kirk, D. N.; Toms, H. C.; Douglas, C.; White, K. A.; Smith, K. E.; Latif, S.; Hubbard, R. W. P. A survey of the high-field  $^1\text{H}$  NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives, and related compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* **1990**, 1567-1594.
23. Silva, M. R.; Moreira, V. M.; Cardoso, C.; Matos Beja, A.; Salvador, J. A. R. 1*H*- and 2*H*-indazole derivatives of androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ol. *Acta Cryst. C* **2008**, *C64*, doi:10.1107/S0108270108005842..
24. Cremer, D.; Pople, J. A. General Definition of Ring Puckering Coordinates. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354-1358.
25. Arth, G. E.; Patchett, A. A.; Jefopoulos, T.; Bugianesi, R. L.; Peterson, L. H.; Ham, E. A.; Kuehl, F. A.; Brink, N. G. Steroidal Androgen Biosynthesis Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 675-679.
26. Bratoeff, E.; Sainz, T.; Cabeza, M.; Heuze, I.; Recillas, S.; Pérez, V.; Rodríguez, C.; Segura, T.; González, J.; Ramírez, E. Steroids with a carbamate function at C-17, a novel class of inhibitors for human and hamster steroid 5 $\alpha$ -reductase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *107*, 48-56.
27. Bubert, C.; Leese, M. P.; Mahon, M. F.; Ferrandis, E.; Regis-Lydi, S.; Kasprzyk, P. G.; Newman, S. P.; Ho, Y. T.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. 3,17-disubstituted 2-Alkylestra-1,3,5(10)-trien-3-ol derivatives: Synthesis, *in vitro* and *in vivo* anticancer activity. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4431-4443.
28. Moreira, V. M.; Vasaitis, T. S.; Guo, Z.; Njar, V. C.; Salvador, J. A. R. Synthesis of Novel C17 Steroidal Carbamates. Studies on CYP17 Action, Androgen Receptor Binding and Function, and Prostate Cancer Cell Growth. **2008**, submetido para publicação.
29. Staab, H. A. New methods of preparative organic chemistry IV. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *1*, 351-367.

30. Totleben, M. J.; Freeman, J. P.; Szmuszkovicz, J. Imidazole transfer from 1,1'-carbonyldiimidazole and 1,1'-(thiocarbonyl)diimidazole to alcohols. A new protocol for the conversion of alcohols to alkylheterocycles. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7319-7323.
31. Tang, Y.; Dong, Y.; Vennerstrom, J. L. The reaction of carbonyldiimidazole with alcohols to form carbamates and *N*-alkylimidazoles. *Synthesis* **2004**, 2540-2544 e referências aí citadas.
32. Mulvihill, M. J.; Cesario, C.; Smith, V.; Beck, P.; Nigro, A. Regio- and stereospecific syntheses of *syn*- and *anti*-1,2-imidazolylpropylamines from the reaction of 1,1'-carbonyldiimidazole with *syn*- and *anti*-1,2-amino alcohols. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5124-5127.
33. Freyne, E.; Raeymaekers, A.; Venet, M.; Sanz, G.; Wouters, W.; De Coster, R.; Van Wauwe, J. Synthesis of liazal,<sup>TM</sup> a retinoic acid metabolism blocking agent (RAMBA) with potential clinical applications in oncology and dermatology. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 267-272.
34. Njar, V. C. O.; Nnane, I. P.; Brodie, A. M. H. Potent inhibition of retinoic acid metabolism enzyme(s) by novel azolyl retinoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1905-1908.
35. Tafi, A.; Costi, R.; Botta, M.; Di Santo, R.; Corelli, F.; Massa, S.; Ciacci, A.; Manetti, F.; Artico, M. Antifungal agents. 10. New derivatives of 1-[(aryl)[4-aryl-1*H*-pyrrol-3-yl]methyl]-1*H*-imidazole, synthesis, anti-*Candida* activity, and quantitative structure-analysis relationship studies. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2720-2732.
36. Pouget, C.; Fagnere, C.; Basly, J. P.; Habrioux, G.; Chulia, A. J. Design, synthesis and evaluation of 4-imidazolylflavans as new leads for aromatase inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2859-2861.
37. Silva, M. R.; Beja, A. M.; Moreira, V. M.; Santos, R. C.; Salvador, J. A. R. 3-Oxoandrost-4-en-17 $\beta$ -yl 1*H*-imidazole-1-carboxylate. *Acta Cryst. E* **2007**, *E63*, o4824.
38. Salvador, J. A. R.; Melo, M. L. S.; Neves, A. S. C. Ultrasound Assisted Zinc Reactions in Synthesis 2. A New Clemmensen-type Reduction. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 361-362.



39. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective groups in organic synthesis*, John Wiley & Sons, Inc.: New York - Chichester - Brisbane - Toronto - Singapore, **1991**.
40. Burkhardt, J. P.; Gates, C. A.; Laughlin, M. E.; Resvick, R. J.; Peet, N. P. Inhibition of Steroid C<sub>17(20)</sub>-Lyase With C17-Heteroaryl Steroids. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1411-1420.
41. Grieco, P. A.; Markworth, C. J. Selective deprotection of alkyl *t*-butyldimethylsilyl ethers in the presence of aryl *t*-butyldimethylsilyl ethers. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 665-666.
42. Herbez, V.; Fischer, F. Macromolecular imidazole-tenside conjugates with carbamate linkage. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6797-6799.

# **CAPÍTULO III**



## **AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS NOVOS COMPOSTOS SINTETIZADOS**

## 1. Inibição da CYP17

Para avaliar o potencial inibitório dos compostos sintetizados sobre a actividade da CYP17 utilizou-se o “*Acetic Acid Releasing Assay*” (AARA). Como padrões de comparação foram usados o cetoconazol **11** e o VN/85-1 **46**. O ensaio foi realizado em células humanas de rim (293T) transfectadas, de forma não permanente, para expressarem a CYP17 humana, usando [21-<sup>3</sup>H]-17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona como substrato. O valor de IC<sub>50</sub> dos compostos mais promissores foi determinado.<sup>1,2</sup>

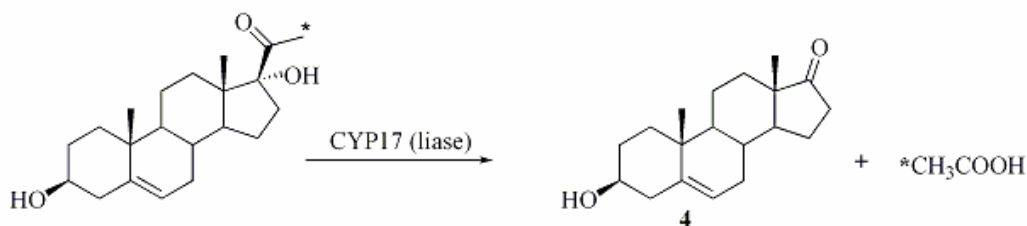
### 1.1 O “*Acetic Acid Releasing Assay*” ou AARA

A avaliação prospectiva de inibidores da CYP17 tem sido feita essencialmente por técnicas diferentes que incluem o uso de substratos radioactivos entre os quais se destacam a [1,2-<sup>3</sup>H]-,<sup>3-5</sup> [7 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-,<sup>6</sup> [4-<sup>14</sup>C]-<sup>7-13</sup> progesterona ou pregnenolona e a [1,2-<sup>3</sup>H]-,<sup>14-19</sup> [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-,<sup>11-13, 20</sup> [7 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-,<sup>18, 21-31</sup> [4-<sup>14</sup>C]-<sup>32</sup> 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona ou 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona. Nos primeiros métodos reportados, os substratos marcados eram adicionados a um tampão fosfato e a um sistema gerador de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). A reacção era iniciada por adição da enzima microsomal e incubação na presença e/ou ausência dos compostos a avaliar, por um período de tempo adequado, a 34°C, ao ar, e terminava com a extracção dos esteróides com solvente orgânico. Para a separação dos produtos finais da reacção enzimática usava-se cromatografia em camada fina (TLC),<sup>8, 11-14, 16, 17, 20, 28, 33, 34</sup> cromatografia em coluna<sup>9, 32, 35, 36</sup> ou cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)<sup>3-6, 10-12, 15, 18, 21, 23-27, 29-31, 37-50</sup> e a radioactividade das fracções assim recolhidas era lida no final do ensaio. Foi também reportado o uso de HPLC sem recurso a substratos radioactivos.<sup>51-68</sup> A absorvância característica da dupla ligação em C4 conjugada com o grupo carbonilo em C3 dos substratos esteróides gerados a partir da progesterona

**8**, a 240 nm, revelou-se suficiente para a sua quantificação. Foi também reportado o uso de radioimunoensaios.<sup>69-71</sup>

Consoante o substrato inicial, assim era determinada a actividade da CYP17 pretendida. A actividade 17 $\alpha$ -hidroxilase podia ser calculada a partir da progesterona **8** como substrato, correspondendo à produção de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona **9**, AD **10** e testosterona **6** enquanto a actividade C<sub>17,20</sub>-liase corresponderia à produção de AD **10** e testosterona **6**. Se o substrato usado fosse a pregnenolona **2**, a actividade 17 $\alpha$ -hidroxilase era calculada com base na produção de 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona **3**, DHEA **4** e androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol enquanto a actividade C<sub>17,20</sub>-liase corresponderia à produção de DHEA **4** e androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (este último metabolito é gerado nas condições do ensaio em presença de um grande excesso de NADPH).<sup>18</sup> Quando se usava 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona **3** ou 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona **9** como substratos, a actividade C<sub>17,20</sub>-liase podia ser calculada a partir da produção de DHEA **4** e androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, ou AD **10** e testosterona **6**, respectivamente.

Uma alternativa rápida e simples a estes ensaios é o AARA. O princípio do AARA foi reportado inicialmente com a [21-<sup>14</sup>C]-17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona<sup>32</sup> e a [21-<sup>14</sup>C]-progesterona como substratos<sup>9</sup> para analisar exclusivamente a actividade C<sub>17,20</sub>-liase nos microssomas testiculares de rato, pela quantidade de [21-<sup>14</sup>C] ácido acético formado. Mais recentemente, Brodie *et al.* estabeleceram um novo protocolo para o AARA que usa [21-<sup>3</sup>H]-17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona como substrato e a actividade C<sub>17,20</sub>-liase é medida pela quantidade de [<sup>3</sup>H] ácido acético libertada durante a clivagem da cadeia lateral do substrato para dar DHEA **4** (Figura 64).<sup>47, 72-82</sup>



**Figura 64** – Reacção fundamental do AARA.

O substrato radioactivo não está disponível comercialmente mas pode ser preparado conforme descrito por Akhtar *et al.*<sup>83</sup> Este ensaio é comparável em termos de precisão e fiabilidade à técnica de HPLC.<sup>72, 75</sup> Apesar de considerar apenas a actividade C<sub>17,20</sub>-liase, o AARA é um bom indicador da inibição da actividade enzimática total. A análise cinética da CYP17 de microsomas testiculares humanos mostrou que a actividade C<sub>17,20</sub>-liase caracteriza a totalidade da inibição da enzima. Nas condições usadas, verificou-se ainda que a actividade C<sub>17,20</sub>-liase foi mais susceptível aos inibidores testados do que a actividade 17 $\alpha$ -hidroxilase.<sup>75</sup>

Idealmente, deveria usar-se enzima humana na avaliação de inibidores da CYP17. Contudo, o facto de apenas se poder usar tecido pós-cirúrgico imediato para isolamento dos microsomas (geralmente de pacientes orquidectomizados) e de estes microsomas apresentarem grande variabilidade na concentração de enzima após o isolamento, fez com que CYP17 de outras fontes fosse usada para o efeito. Assim, além da enzima humana<sup>3-7, 11-14, 16, 17, 20-23, 26, 27, 37, 39-41, 43-47, 49, 53, 56, 57, 59, 61-65, 67, 68, 70, 72, 74-76, 78-82</sup> foram também usadas a de rato,<sup>5, 11-17, 19, 23, 28, 32-38, 40, 42, 51, 54, 55, 57, 59, 60, 64-69, 71-73, 82, 84</sup> macaco,<sup>22, 24-27, 29-31</sup> cão,<sup>23</sup> boi<sup>48</sup> e porco.<sup>8, 10, 52</sup> Os resultados obtidos em modelos de estudo não humanos não podem, contudo, ser extrapolados directa e inequivocamente para a enzima humana. Conforme referido anteriormente, apesar do elevado grau de homologia entre a CYP17 das diferentes espécies e a do Homem, elas apresentam diferenças enzimáticas importantes tais como a actividade preferencial para um dos dois substratos possíveis.<sup>85-89</sup> O isolamento do cDNA da CYP17 humana<sup>90, 91</sup> e a sua expressão em sistemas heterólogos como células

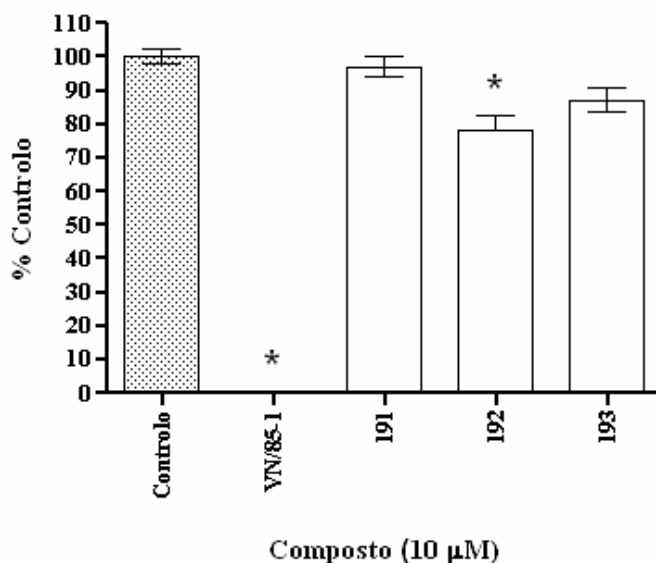
eucarióticas e estirpes de bactérias como a *E. coli* foram passos muito importantes para a melhoria das técnicas de avaliação de inibidores da CYP17.<sup>3-5, 16, 17, 75, 76, 80, 81</sup> Hoje em dia, a combinação do uso do AARA com a expressão da CYP17 humana nos sistemas acima descritos, constitui provavelmente a forma mais rápida e eficiente para o efeito.

Para este trabalho, o sistema de expressão escolhido foi a linha celular 293T, originária de rim humano. Estas células têm rápido crescimento em meio de cultura, além de uma elevada taxa de transfecção com o plasmídeo recombinante *pCDNA3Hmod17(His)<sub>4</sub>*, que inclui o cDNA da CYP17 humana.<sup>75</sup> As células foram transfectadas com este plasmídeo (de forma não permanente) usando o método do fosfato de cálcio.<sup>92, 93</sup> Este tipo de transfecção envolve a preparação de uma solução aquosa do plasmídeo e CaCl<sub>2</sub> a qual é adicionada a uma solução de tampão salino à base de fosfatos, de forma controlada, e de maneira a permitir a gradual incorporação de oxigénio na mistura. Após incubação à temperatura ambiente forma-se um precipitado constituído por DNA coprecipitado com fosfato de cálcio, que é adicionado às células e é por elas endocitado ou fagocitado. Uma vez dentro das células, o DNA é transcrito em mRNA e traduzido em proteína funcional, neste caso CYP17. O substrato radioactivo escolhido foi a [21-<sup>3</sup>H]-17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona. Neste ensaio, o controlo representa a conversão total do substrato tritiado adicionado inicialmente em DHEA **4** com libertação de [<sup>3</sup>H] ácido acético. Se houver inibição da actividade desencadeada pelos compostos a testar, será produzida uma quantidade inferior de [<sup>3</sup>H] ácido acético, o que se traduzirá em menor radioactividade associada. Como padrões internos foram usados o cetoconazol **11** e o VN/85-1 **46**. O valor de IC<sub>50</sub> dos compostos mais promissores foi determinado.

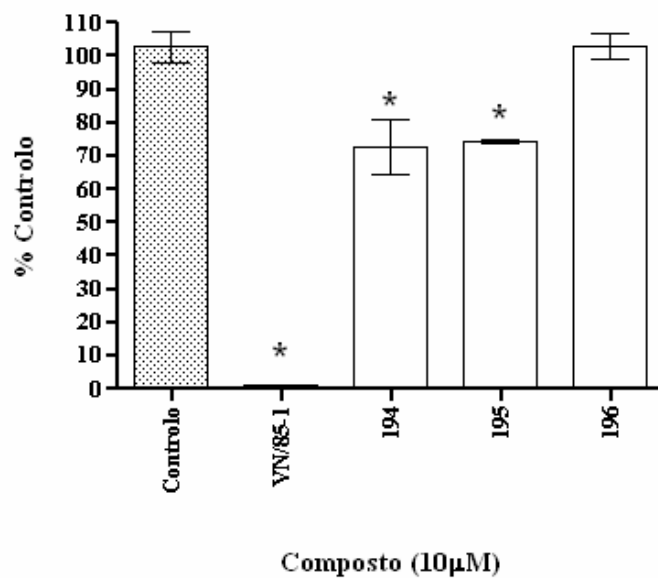
## 1.2 Resultados

### 1.2.1 Derivados do indazole

Os compostos **191-196** foram inicialmente testados na concentração de 10  $\mu\text{M}$  para a inibição da CYP17 humana expressa por células 293T. Os compostos não inibiram eficazmente a enzima, ou seja, não foi obtida inibição da actividade enzimática de pelo menos 30%, em relação ao controlo, a esta concentração (Figura 65 e 66). Como tal, não foram seleccionados para cálculo posterior do valor de  $\text{IC}_{50}$ . Como padrão interno usou-se o VN/85-1 **46** que à mesma concentração inibiu totalmente a actividade da CYP17.



**Figura 65** – Efeitos dos compostos **191-193** na inibição da CYP17 em células 293T. Os resultados foram analisados por ANOVA (Dunnett): \*  $p < 0,01$  relação ao controlo. As barras representam o erro padrão da média (SEM).

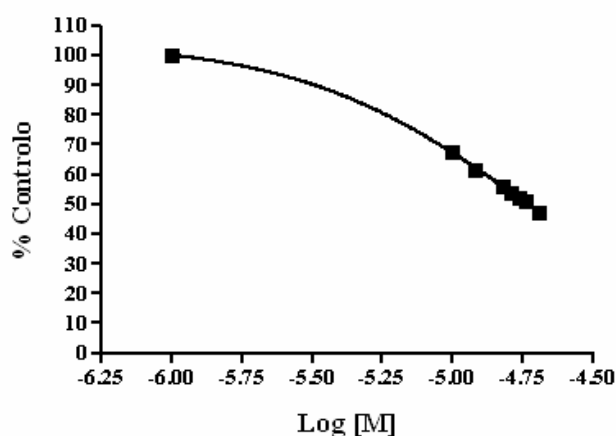
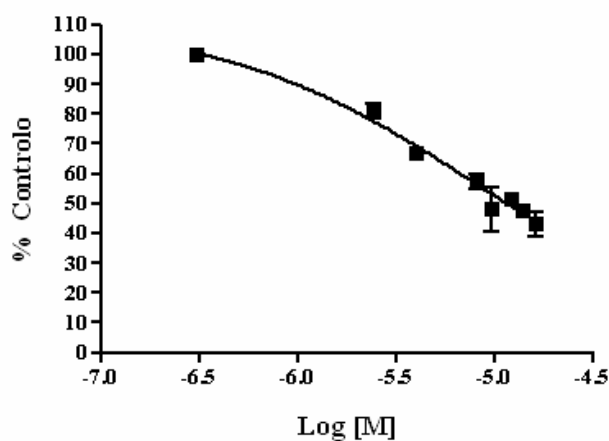


**Figura 66** – Efeitos dos compostos **194-196** na inibição da CYP17 em células 293T. Os resultados foram analisados por ANOVA (Dunnett): \*  $p < 0,01$  relação ao controle. As barras representam o SEM.



### 1.2.2 C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole

Os compostos **202-207**, **209**, **211** e **215** foram inicialmente testados na concentração de 10  $\mu\text{M}$  para a inibição da CYP17 humana expressa por células 293T. Os compostos **206** e **215** inibiram actividade enzimática em mais do que 30% em relação ao controlo a esta concentração, e foram por isso seleccionados para cálculo dos respectivos valores de  $\text{IC}_{50}$  (Figura 67). O composto **215** foi o mais potente com um valor de  $\text{IC}_{50}$  de 11,5  $\mu\text{M}$  seguido do composto **206** com um valor de  $\text{IC}_{50}$  de 17,1  $\mu\text{M}$ .



**Figura 67** – Curvas de  $\text{IC}_{50}$  para os compostos **206** e **215** (células 293T-CYP17). A análise foi feita por regressão não-linear usando o GraphPad Prism v.4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As barras representam o SEM.

## **2. Ligação ao receptor de androgénio**

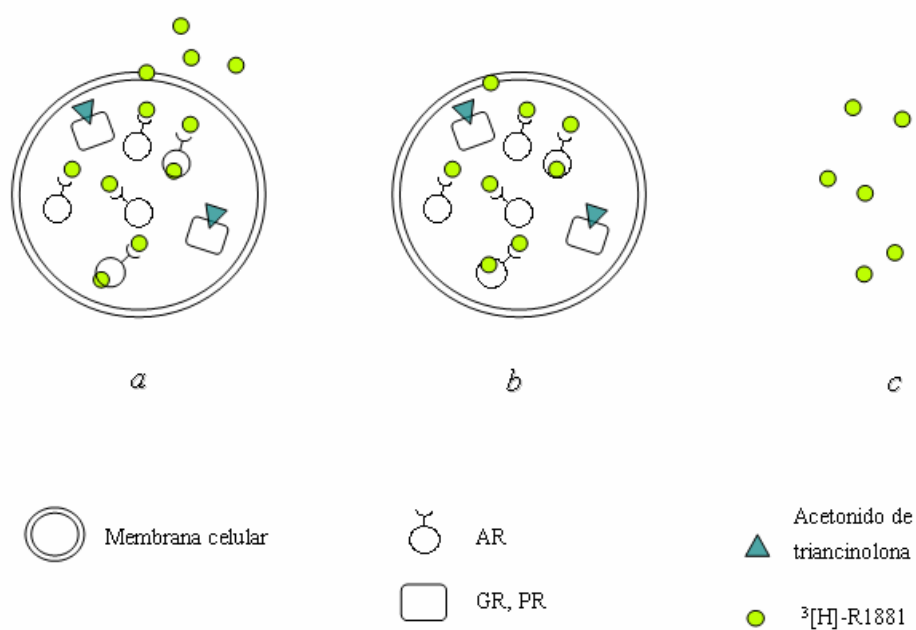
Para avaliar a capacidade de os compostos sintetizados se ligarem ao AR, foi realizado um ensaio de ligação competitiva com o androgénio tritiado metiltrienolona [<sup>3</sup>H]R1881. Para o efeito, foram escolhidas as células LAPC4 e LNCaP, que expressam o AR original e mutado, respectivamente. A afinidade dos compostos para o AR foi comparada com a do antiandrogénio bicalutamida (Casodex<sup>®</sup>).<sup>1,2</sup>

### **2.1 Ensaio de ligação competitiva ao receptor de androgénio**

Os ensaios de ligação competitiva a um receptor avaliam a sua afinidade para um determinado composto na presença do seu ligando natural. O ensaio é realizado com concentrações crescentes do composto a testar em presença de uma concentração constante de ligando natural radioactivo, previamente calculada como sendo suficiente para saturar os receptores em causa, numa determinada linha celular. Um dos aspectos mais críticos deste tipo de ensaio é a possibilidade de ocorrer ligação não específica. Diz-se que a ligação é específica se o composto se ligou ao receptor em estudo. A ligação do composto a outros locais que não o receptor (membrana das células, outros receptores ou transportadores na célula, material de ensaio) diz-se não específica.

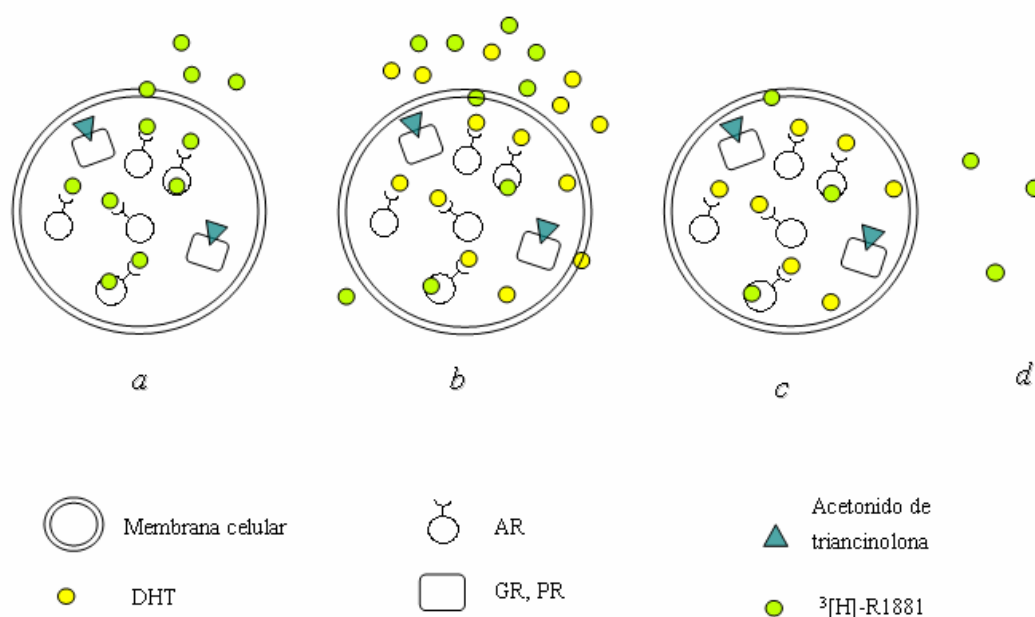
Para determinar a afinidade dos compostos sintetizados para o AR, escolheram-se as células LAPC4 e LNCaP, derivadas de metástases de CP humano, do nódulo linfático.<sup>94-96</sup> Estas linhas celulares diferem no tipo de AR que expressam. As células LAPC4 contêm o AR original<sup>95</sup> enquanto as LNCaP contêm um AR mutado que é promíscuo, ou seja, pode ligar-se e ser estimulado por outros ligandos que não apenas a DHT 7, graças a uma mutação associada à região de ligação a esteróides.<sup>94, 97, 98</sup> A mutação consiste na troca de um resíduo de treonina (Thr877) por alanina (T877A).

Para o ensaio, o substrato radioactivo escolhido foi o  $[^3\text{H}]\text{R1881}$ , um androgénio sintético tritiado comercial. A concentração de saturação a usar tinha sido já previamente determinada como sendo 5 nM.<sup>81, 99</sup> Para saturar os receptores de glucocorticóides (GR) e progesterona **8** (PR) usou-se o acetónico de triancinolona na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Para determinar a ligação não específica foi usada DHT **7** não radioactiva. Nas condições do ensaio, a radioactividade lida corresponde a uma radioactividade remanescente (após remoção do excesso de meio radioactivo) resultante da lise celular. Em presença do substrato tritiado  $[^3\text{H}]\text{R1881}$  e acetónico de triancinolona, a radioactividade lida no final do ensaio é o somatório das ligações específica e inespecífica (Figura 68).



**Figura 68** – Determinação da ligação específica e não específica no ensaio de ligação ao AR. *a.* Saturação; *b.* Eliminação do excedente de composto radioactivo; *c.* Lise celular e leitura da radioactividade remanescente (ligação específica e não específica).

Quando a DHT 7 está também presente e uma vez que a sua concentração corresponde a um grande excesso em relação à de  $[^3\text{H}]\text{R1881}$ , virtualmente todos os receptores disponíveis estarão ligados à DHT 7, sendo a radioactividade remanescente lida correspondente à ligação não específica de  $[^3\text{H}]\text{R1881}$  (Figura 69).

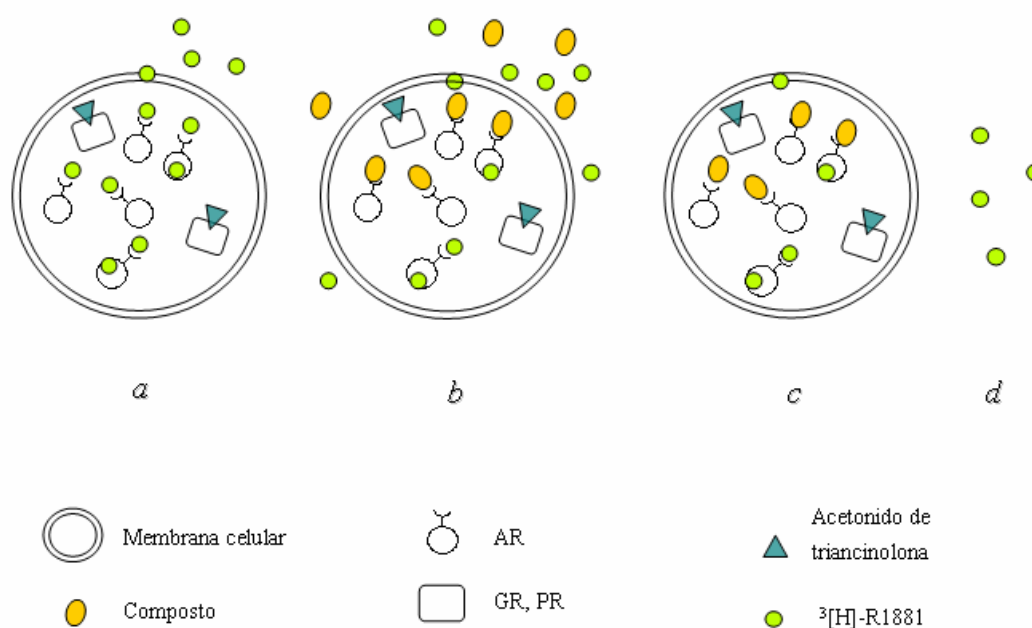


**Figura 69** – Determinação da ligação não específica no ensaio de ligação ao AR. *a.* Saturação; *b.* Competição com o ligando natural DHT 7; *c.* Eliminação do excedente de composto radioactivo; *d.* Lise celular e leitura da radioactividade remanescente (ligação não específica).

Em presença dos compostos a testar, há competição entre o composto e o  $[^3\text{H}]\text{R1881}$  para ligação ao AR pelo que, se o composto mostrar boa afinidade para o receptor, conseguirá deslocar uma maior quantidade de  $[^3\text{H}]\text{R1881}$  do receptor, que é removida com a lavagem (Figura 70). Valores mais baixos de radioactividade final estão, assim, associados a uma maior capacidade de remoção do androgénio natural do seu receptor e boa afinidade do composto teste.

A subtração do valor obtido no ensaio com a DHT 7 permite obter os valores de ligação específica associados ao composto a testar e ao controlo.

A afinidade da bicalutamida (Casodex®) para o AR em ambas as linhas celulares foi também avaliada. Para os compostos mais promissores foram determinados os valores de EC<sub>50</sub>.



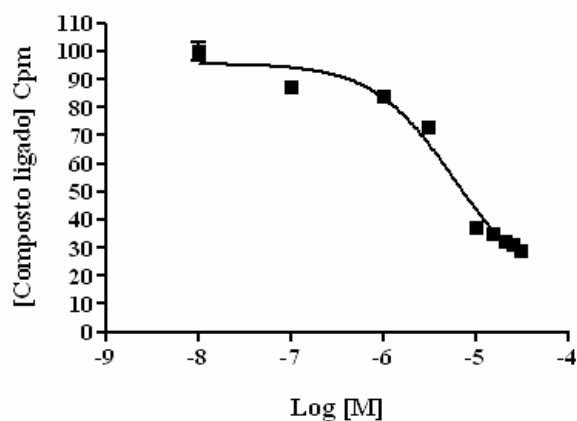
**Figura 70** – Ligação ao AR, ensaio de competição entre o composto e o radioligando. *a.* Saturação; *b.* Competição como composto teste; *c.* Eliminação do excedente de composto radioactivo; *d.* Lise celular e leitura da radioactividade remanescente.

## 2.2 Resultados

### 2.2.1 Derivados do indazole

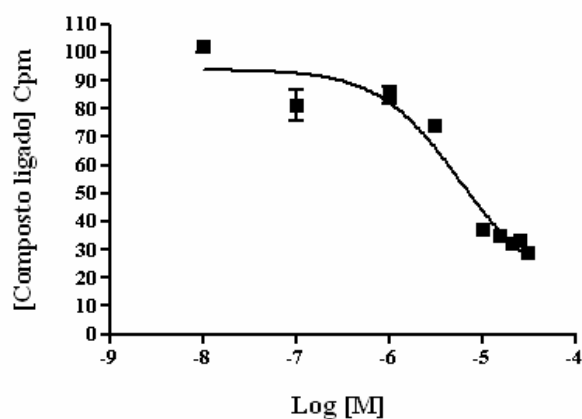
#### 2.2.1.1 Células LAPC4

Entre os derivados do indazole **191-196** testados para ligação ao AR das células LAPC4, os compostos **193** e **196** mostraram valores de  $EC_{50}$  de 5,7 e 5,6  $\mu$ M, respectivamente (Figura 71).



Composto **193**

$$EC_{50} = 5,7 \mu\text{M}; R^2 = 0,97$$



Composto **196**

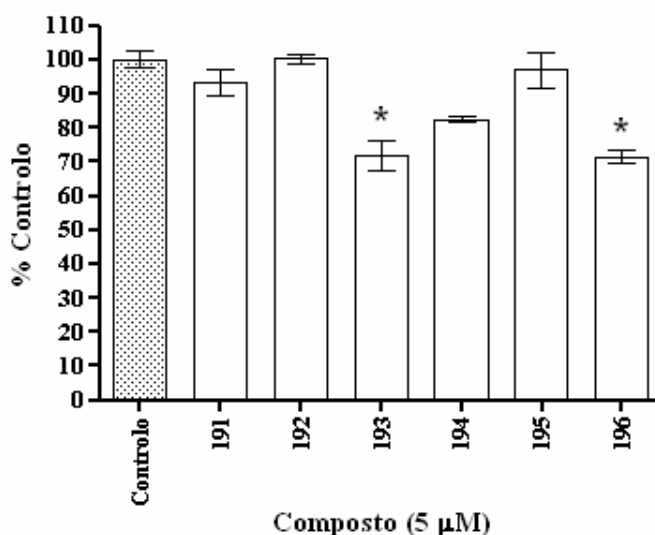
$$EC_{50} = 5,6 \mu\text{M}; R^2 = 0,94$$

**Figura 71** – Curvas de  $EC_{50}$  para os compostos **193** e **196** (células LAPC4). A análise foi feita por regressão não-linear usando o GraphPad Prism v.4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As barras representam o SEM.

O deslocamento do [<sup>3</sup>H]R1881 do AR obtido em presença dos restantes compostos na concentração de 5 μM não foi de, pelo menos, 30% quando comparado com o valor do controlo.

### 2.2.1.2 Células LNCaP

Nenhum dos compostos **191-196** foi seleccionado para determinação dos valores de EC<sub>50</sub> na ligação ao AR das células LNCaP. O deslocamento do [<sup>3</sup>H]R1881 do AR obtido em presença destes compostos na concentração de 5 μM, não foi de, pelo menos, 30% em relação ao valor do controlo (Figura 72).



**Figura 72** – Ligação dos compostos **191-196** ao AR das células LNCaP. Os resultados foram analisados por ANOVA (Dunnett): \* p < 0,01 relação ao controlo. As barras representam o SEM.

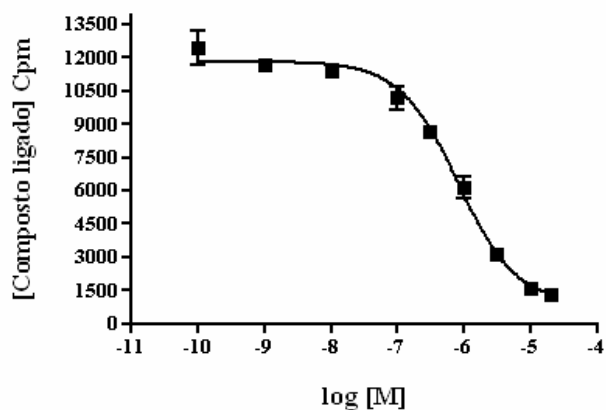
## **2.2.2 C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole**

### **2.2.2.1 Células LAPC4**

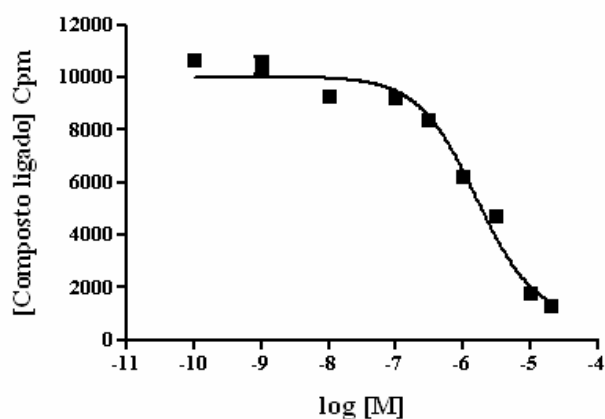
Entre os compostos **202-207**, **209**, **211** e **215** testados para ligação ao AR das células LAPC4 apenas o composto **211** não foi seleccionado para cálculo do valor de EC<sub>50</sub> uma vez que, o deslocamento do [<sup>3</sup>H]R1881 do AR que se obteve em presença de 5 µM de composto **211**, não foi de, pelo menos, 30% em relação ao valor do controlo. Os valores de EC<sub>50</sub> foram calculados para os restantes compostos de acordo com as Figuras 73-75.

Entre os compostos com maior afinidade para o AR das células LAPC4 destacam-se o composto **205** e o composto **209** com valores de EC<sub>50</sub> de 0,2 e 0,3 µM, respectivamente (Figuras 74 e 75).

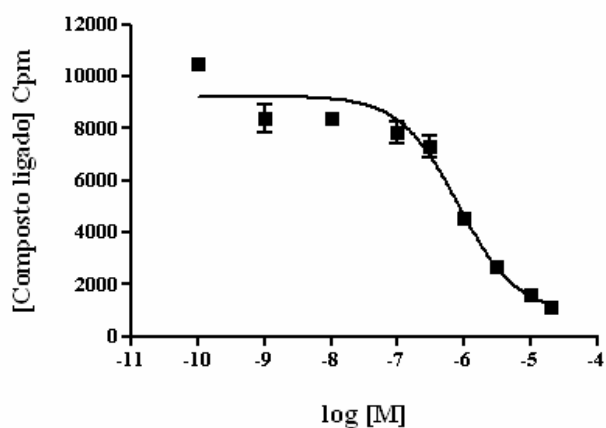




Composto **202**  
 $EC_{50} = 0,8 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,97$

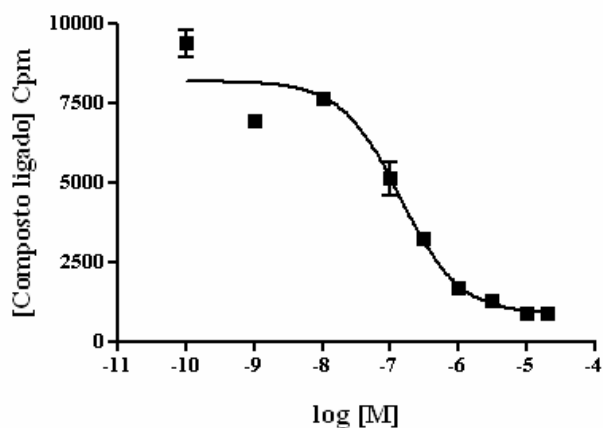


Composto **203**  
 $EC_{50} = 1,6 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,97$



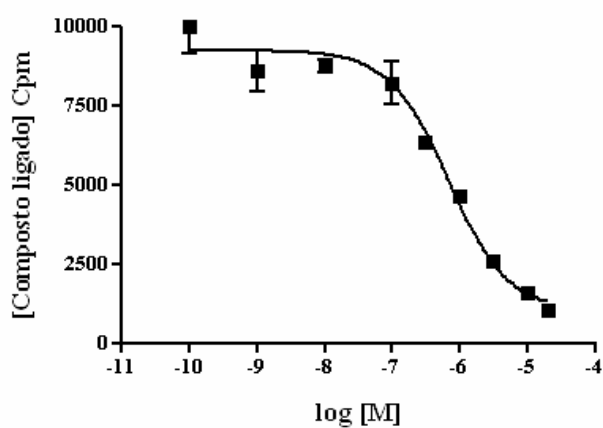
Composto **204**  
 $EC_{50} = 0,8 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,95$

**Figura 73** – Curvas de  $EC_{50}$  para os compostos **202-204** (células LAPC4). A análise foi feita por regressão não-linear usando o GraphPad Prism v.4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As barras representam o SEM.



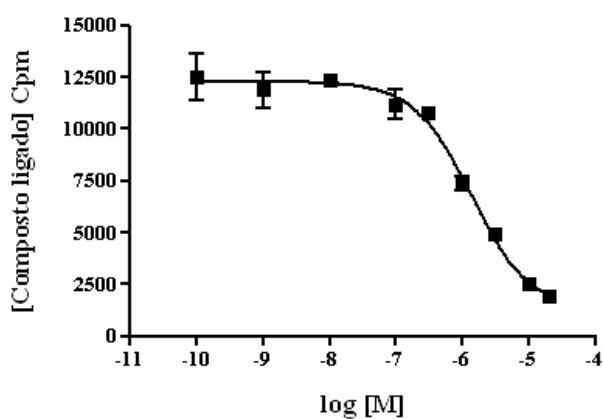
Composto **205**

$EC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,96$



Composto **206**

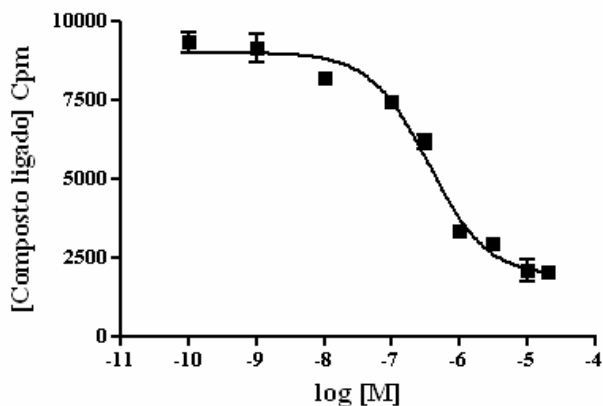
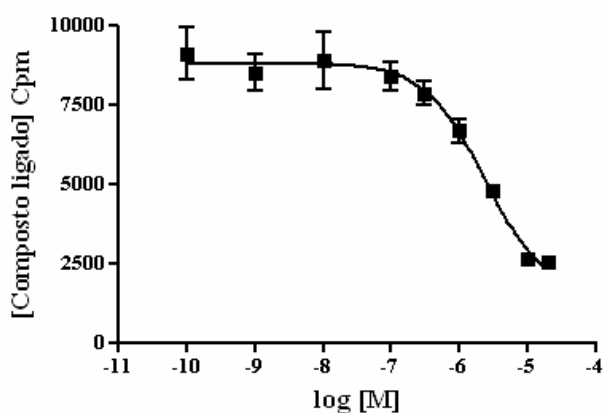
$EC_{50} = 0,7 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,95$



Composto **207**

$EC_{50} = 1,4 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,96$

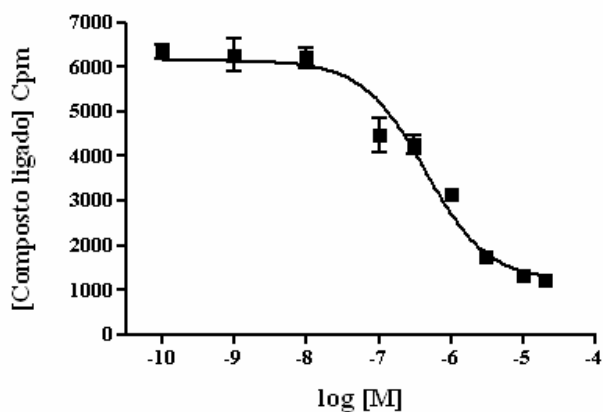
**Figura 74** – Curvas de  $EC_{50}$  para os compostos **205-207** (células LAPC4). A análise foi feita por regressão não-linear usando o GraphPad Prism v.4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As barras representam o SEM.

Composto **209** $EC_{50} = 0,3 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,97$ Composto **215** $EC_{50} = 2,3 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,95$ 

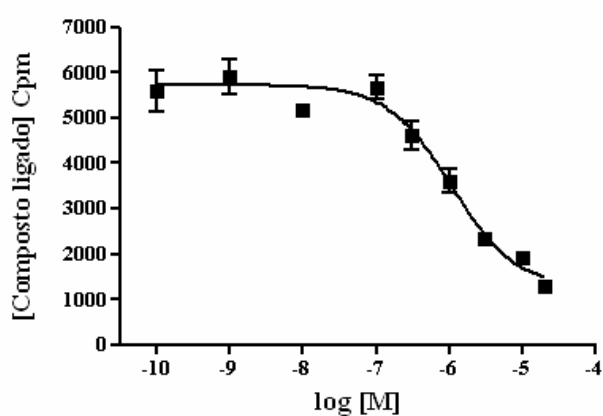
**Figura 75** – Curvas de  $EC_{50}$  para os compostos **209** e **215** (células LAPC4). A análise foi feita por regressão não-linear usando o GraphPad Prism v.4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As barras representam o SEM.

### 2.2.2.2 Células LNCaP

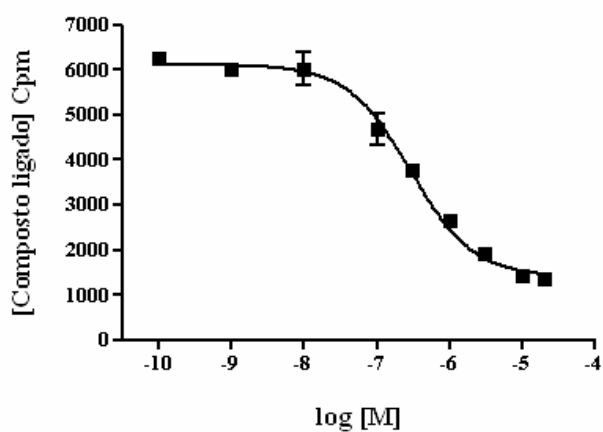
A afinidade dos compostos **202** e **205** para o AR mutado das células LNCaP foi a melhor na série com valores de  $EC_{50}$  de 0,4 e 0,3  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 76). O deslocamento do  $[^3\text{H}]\text{R1881}$  do AR que se obteve em presença de 5  $\mu\text{M}$  dos compostos **203**, **209** e **211**, não foi de, pelo menos, 30% em relação ao valor do controle. Os resultados para os compostos **202**, **204-207** e **215** estão representados nas Figuras 76 e 77.



Composto **202**  
 $EC_{50} = 0,4 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,95$

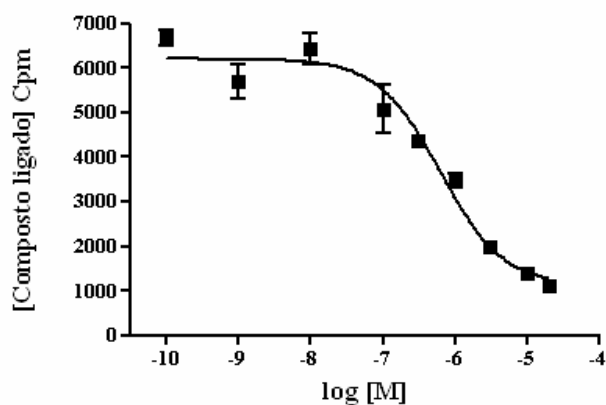


Composto **204**  
 $EC_{50} = 1,1 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,97$



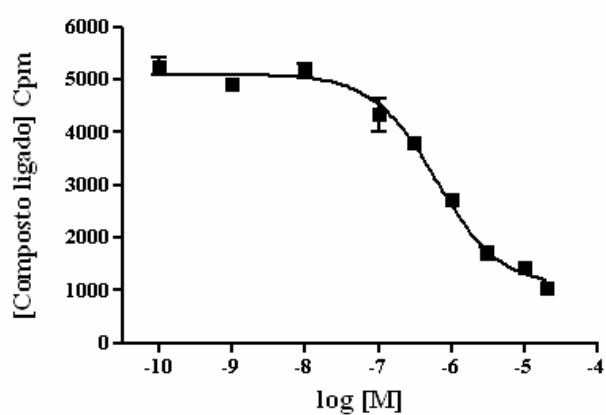
Composto **205**  
 $EC_{50} = 0,3 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,94$

**Figura 76** – Curvas de  $EC_{50}$  para os compostos **202**, **204** e **205** (células LNCaP). A análise foi feita por regressão não-linear usando o GraphPad Prism v.4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As barras representam o SEM.



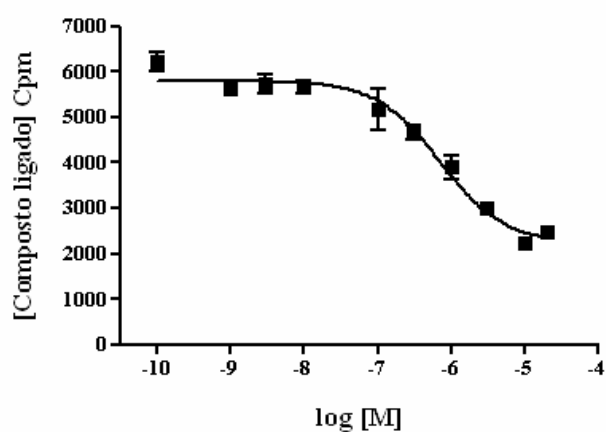
Composto **206**

$EC_{50} = 0,6 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,94$



Composto **207**

$EC_{50} = 0,6 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,97$



Composto **215**

$EC_{50} = 0,7 \mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,95$

**Figura 77** – Curvas de  $EC_{50}$  para os compostos **206**, **207** e **215** (células LNCaP). A análise foi feita por regressão não-linear usando o GraphPad Prism v.4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As barras representam o SEM.

### **3. Transcrição mediada pelo receptor de androgénio mutado**

Para avaliar o efeito dos compostos que demonstraram capacidade de ligação ao AR das células LNCaP sobre a transcrição por este mediada, usou-se o ensaio da luciferase. A actividade da luciferase foi usada para medir a actividade transcripcional do AR ou, mais especificamente, foi usada para estudar a resposta do promotor ARR<sub>2</sub> à presença dos compostos referidos em presença e na ausência do substrato natural DHT 7.<sup>2</sup>

#### **3.1 O ensaio da luciferase**

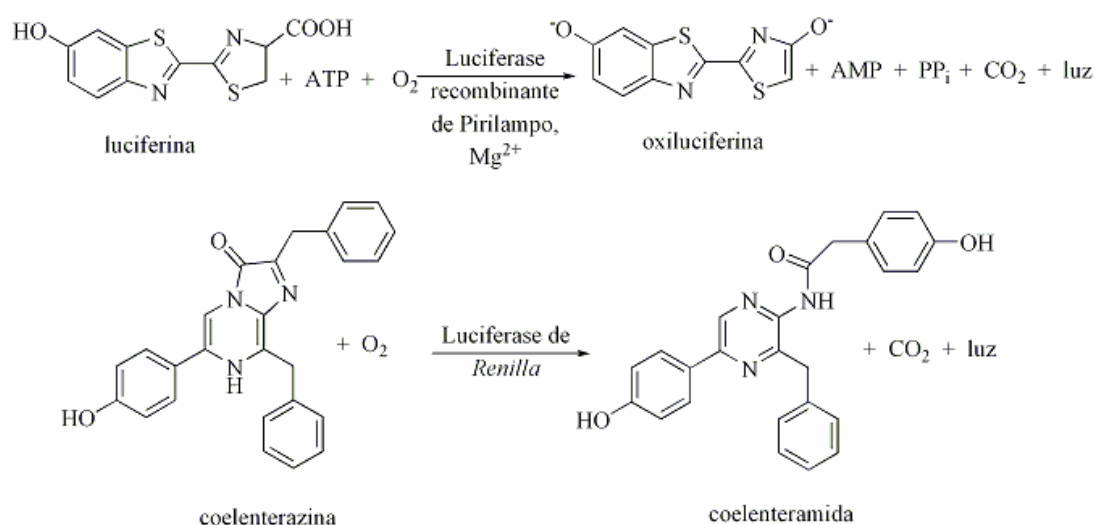
O uso de genes reportadores é um método conveniente de identificar e analisar a actividade transcripcional de sequências regulatórias de interesse (especialmente promotores) em células em cultura.<sup>93</sup> A sequência regulatória a estudar é acoplada, através de métodos clássicos de recombinação, ao gene reportador num mesmo vector de expressão. O recombinante resultante é depois introduzido numa linha celular adequada onde a sua expressão é detectada por medição do mRNA reportador ou da proteína reportadora, ou em caso de reportadores para enzimas, por determinação da actividade catalítica relevante.<sup>93</sup>

O gene da luciferase é um gene reportador de eleição porque é mais sensível do que outros genes reportadores também habitualmente usados, como a acetiltransferase do cloranfenicol (CAT), permitindo a análise de promotores fracos e o uso de pequenas quantidades de DNA e de células em estudos que envolvem transfecções.<sup>93</sup> A actividade da luciferase pode ser medida por leitura de luminescência produzida a 560 nm e é facilmente executável em placas de 96 poços, permitindo testar uma grande quantidade de compostos em simultâneo.

É a actividade da luciferase que faz brilhar os pirilampos no escuro. Com a excepção do pirilampo e de alguns organismos marinhos, o gene da luciferase não se encontra nas células

eucarióticas e é por isso um excelente reportador neste tipo de ensaios. O gene da luciferase original pertence ao *Photinus pyralis*. Desde que a sua utilidade foi estabelecida por de Wet *et al.*<sup>100</sup> em 1987, este gene tem sido modificado de forma ter características desejáveis como maiores níveis de expressão, diferente cinética de produção de luz e maior estabilidade da actividade enzimática. Existem hoje disponíveis comercialmente vectores contendo um cDNA de luciferase altamente optimizado, entre os quais a série pGL da Promega.<sup>®</sup>

Em presença de  $Mg^{2+}$  e oxigénio, a luciferase cataliza a reacção da luciferina com o ATP para produzir uma forma oxidada de luciferina (a oxiluciferina) e adenosina monofosfato (AMP), com emissão de luz, que pode ser lida a 560 nm (Figuras 78 e 79). O Dual-Glo Luciferase Assay System da Promega<sup>®101</sup> usa a luciferase do pirilampo e uma outra luciferase de um organismo marinho (*Renilla reniformis*) de uma forma integrada, o que permite que a primeira sirva de reportadora da sequência em estudo, e a segunda sirva de controlo interno, com a dupla função de permitir normalizar as diferenças na transfecção entre poços da mesma placa e de distinguir se a resposta celular é ou não específica. Para tal, as células escolhidas são duplamente transfectadas com um plasmídeo que tem a sequência regulatória de interesse acoplada ao gene da luciferase do pirilampo, e com um outro plasmídeo que expressa uma actividade constitutiva, neste caso a actividade luciferase de *Renilla*.



**Figura 78** – Reacção de bioluminescência catalisada pela luciferase.

As duas luciferases têm origens evolucionárias distintas e as enzimas que codificam são muito díspares assim como os substratos que usam. Ambas ficam imediatamente activas após translação porque não requerem modificações pós-translacionais. As actividades enzimáticas das duas luciferases podem ser lidas de forma sequencial sendo que a actividade da luciferase de pirilampo é estimulada por um reagente e praticamente inibida na totalidade por outro, que simultaneamente despoleta a actividade da luciferase de *Renilla*. Esta última usa a coelenterazina que converte em coelenteramida na presença de oxigénio, com libertação de CO<sub>2</sub> (Figura 78). Desta forma, um aumento na actividade da sequência regulatória em estudo é acompanhado por expressão do gene da luciferase do pirilampo, que imediatamente se manifesta pela actividade da luciferase e produção de luz. Neste ensaio, se ocorrer diminuição de actividade da luciferase mas a luminescência associada à *Renilla* se mantiver constante, o efeito pode considerar-se específico, ou seja, justificado pela inibição da transcrição mediada pelo factor em estudo. Em contrapartida, se houver diminuição concomitante das duas actividades, o efeito é inespecífico (morte celular, inibição do crescimento celular, número inicial de células variável). A normalização das leituras



em relação à actividade da luciferase de *Renilla* é ainda uma forma de garantir que as diferenças nos resultados obtidos não dependem da eficiência de transfecção de cada poço.

Neste estudo, usou-se o vector pGL3 da Promega,<sup>®</sup> contendo o cDNA de luciferase. Neste vector foi introduzido o promotor a estudar ARR<sub>2</sub>, cuja função é iniciar a transcrição de genes específicos da próstata.<sup>102, 103</sup> Desta forma criou-se o plasmídeo recombinante ARR<sub>2</sub>-Luc com o qual se transfectaram as células LNCaP, usando lipossomas catiónicos. Neste tipo de transfecção, o DNA a ser introduzido nas células é complexado pelos lipossomas catiónicos graças às interacções com os grupos fosfato carregados negativamente que possui, e é depois captado pelas células ou por interacção com as cargas negativas da membrana ou por endocitose.<sup>93</sup> Conjuntamente com este plasmídeo, as células foram também transfectadas com o vector pRL-null contendo o cDNA de *Renilla reniformis*, usado como controlo interno.

O efeito dos compostos sobre a transcrição mediada pelo AR das células LNCaP foi estudado na presença e na ausência de DHT 7. A luminescência foi medida de forma sequencial, primeiro para a actividade da luciferase e depois para a actividade da luciferase de *Renilla*. Os valores obtidos foram normalizados em relação à actividade da luciferase de *Renilla* e expressos em percentagem do controlo. O aumento de “Relative Light Units” (RLU) em relação ao controlo representa, neste ensaio, estimulação da actividade transcripcional do AR com conseqüente expressão da luciferase e produção de luz. Esta resposta ocorre sempre que o composto a testar tenha actividade agonista do AR, ou seja, por ligação ao AR origine a dissociação deste das HSP, a sua dimerização e translocação para o núcleo, iniciando assim a transcrição por activação do promotor ARR<sub>2</sub> (Figura 79).

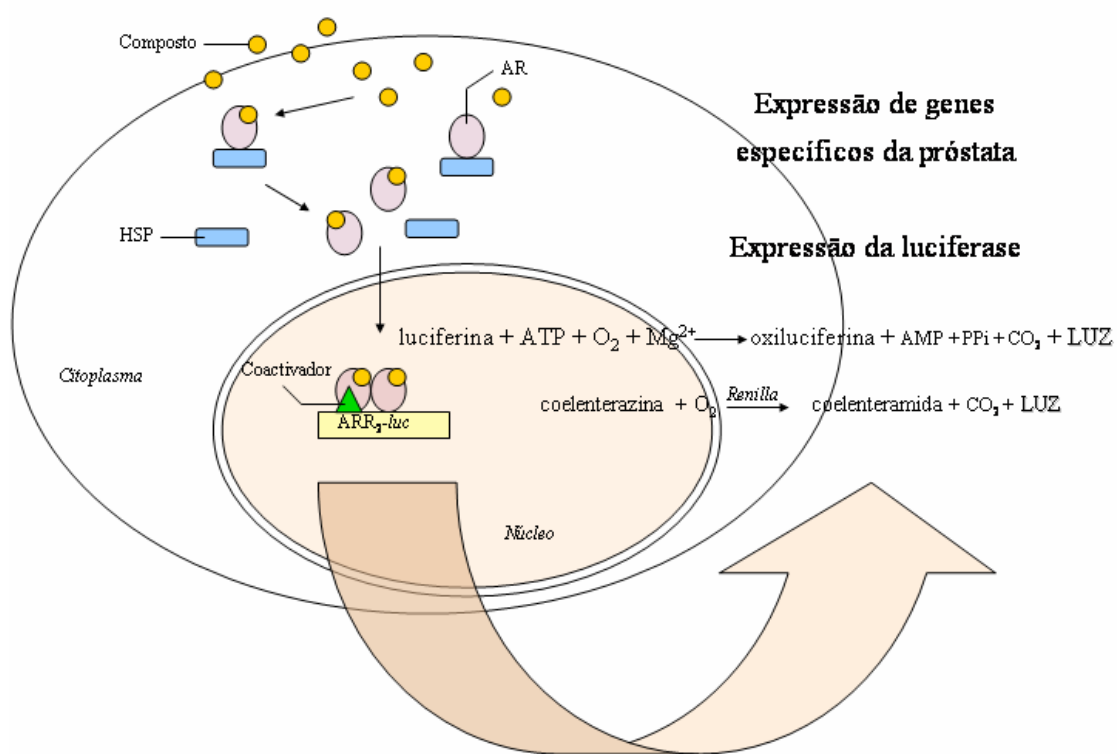


Figura 79 – Fundamento do ensaio da luciferase.

## 3.2 Resultados

### 3.2.1 Derivados do indazole

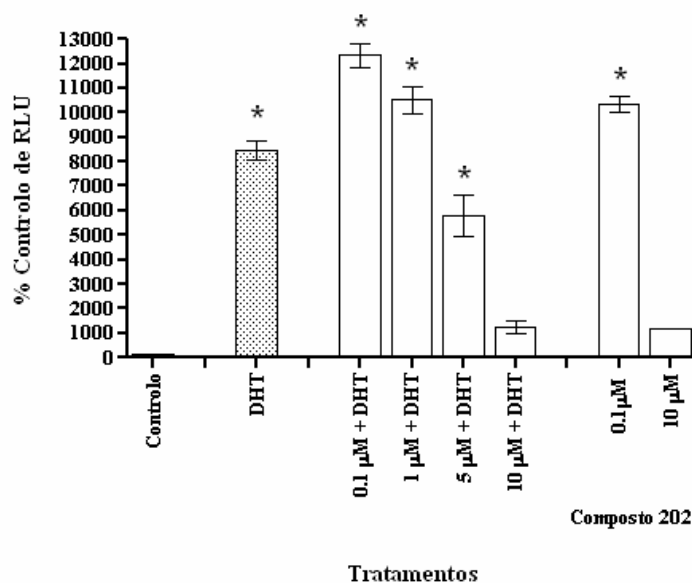
Uma vez que os compostos **191-196** não demonstraram capacidade de ligação ao AR mutado das células LNCaP, não foi estudado o seu efeito na transcrição mediada por este receptor.

### 3.2.2 C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole

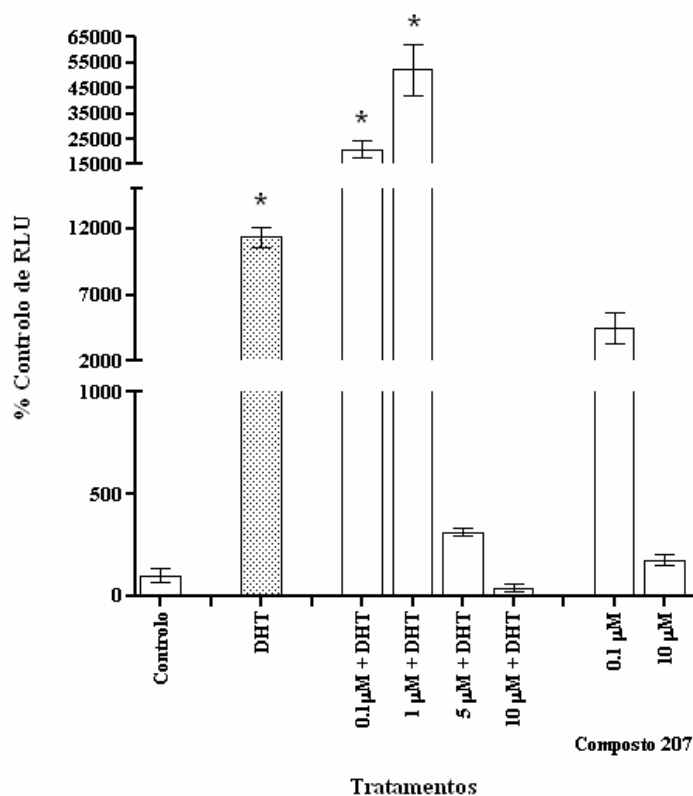
As Figuras 80 e 81 representam os resultados obtidos no ensaio da luciferase, com dois dos compostos desta classe **202** e **207**, a título de exemplo.

Quando comparada com o controlo, a estimulação da transcrição mediada pelo AR nas células LNCaP pela DHT **7** na concentração de 5 nM foi de cerca de 87 e 114 vezes superior, nos ensaios com os compostos **202** e **207**, respectivamente (Figuras 80 e 81).

Nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{M}$ , em presença de DHT **7**, a transcrição mediada pelo AR foi 123 e 105 vezes superior quando comparada com o controlo, para o composto **202** (Figura 80). No caso do composto **207**, a transcrição aumentou de 208 e 395 vezes em relação ao controlo, nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{M}$  de composto, respectivamente, em presença de DHT **7** (Figura 81).



**Figura 80** – Efeito do composto **202** na transcrição mediada pelo AR nas células LNCaP. Os resultados foram analisados por ANOVA (Dunnett): \*  $p < 0,01$  relação ao controlo. As barras representam o SEM.



**Figura 81** – Efeito do composto **207** na transcrição mediada pelo AR nas células LNCaP. Os resultados foram analisados por ANOVA (Dunnett): \*  $p < 0,01$  relação ao controle. As barras representam o SEM.

Contudo, nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  e em presença de DHT **7**, o efeito observado foi o oposto e ambos os compostos bloquearam a transcrição por esta mediada (Figuras 80 e 81).

Na ausência de DHT **7**, ambos os compostos estimularam a transcrição mediada pelo AR das células LNCaP a 0,1  $\mu\text{M}$ , sendo essa estimulação 103 e 88 vezes superior, quando comparada com o controle, nos compostos **202** e **207**, respectivamente (Figuras 80 e 81). Não se verificou, contudo, estimulação significativa da transcrição usando concentrações elevadas (10  $\mu\text{M}$ ) destes compostos.

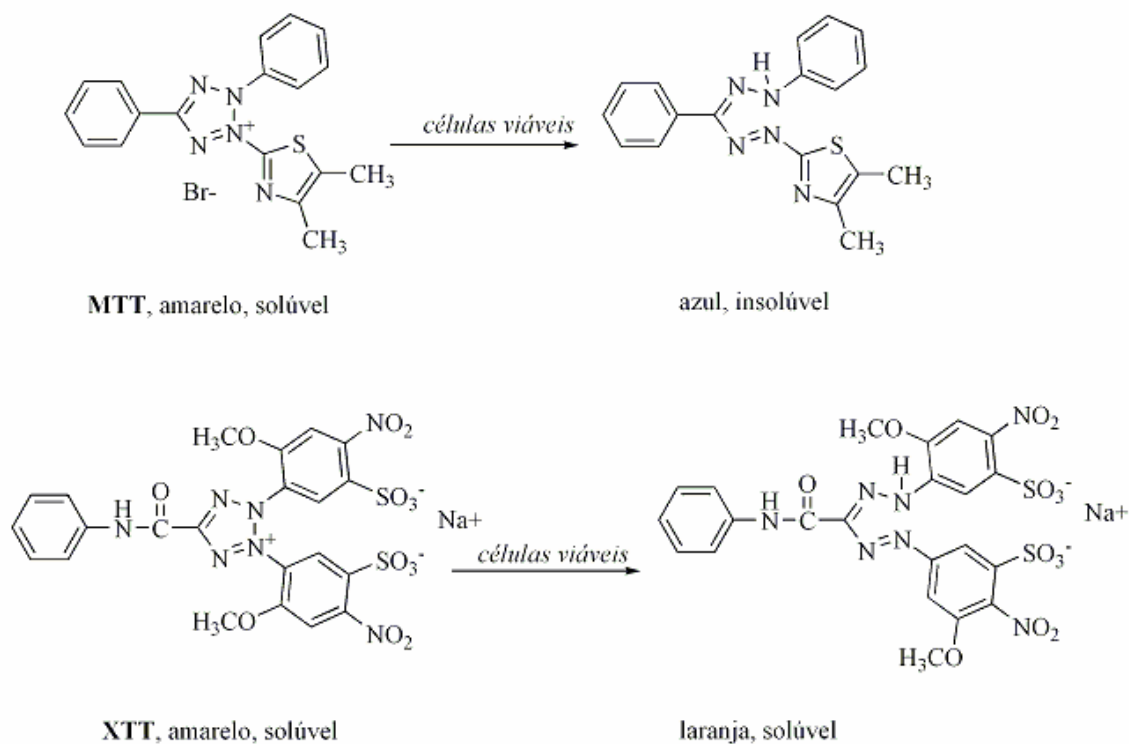
O efeito dos compostos sobre a transcrição mediada pelo AR das células LNCaP parece assim ser concentração-dependente. Os compostos têm actividade agonista sobre o receptor a baixas concentrações e a concentrações mais elevadas essa capacidade é perdida.

## 4. Ensaios de proliferação celular

O potencial dos compostos sintetizados para inibirem a proliferação das células LNCaP, LAPC4 e PC-3 foi estudado recorrendo a ensaios de proliferação celular baseados em sais de formazana. Os compostos foram testados a 0,1, 1, 10 e 20  $\mu\text{M}$  e os melhores foram escolhidos para cálculos dos  $\text{EC}_{50}$ . Os C17 carbamatos derivados do 2'-metilimidazole foram apenas avaliados nas células PC-3.<sup>1,2</sup>

### 4.1 Os sais de formazana

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um sal que quando reduzido pelas células viáveis origina um produto insolúvel (formazana), de cor azul (Figura 82).<sup>104-109</sup>



**Figura 82** – Reacções de redução do MTT e do XTT pelas células viáveis.

Tem sido aceite na generalidade que o MTT é reduzido pela succinato-reductase da cadeia respiratória mitocondrial das células viáveis.<sup>110</sup> Desta forma, o produto da redução do MTT gerado pelas células é directamente proporcional ao número de células metabolicamente activas, ou seja, o MTT é usado como medida de proliferação ou viabilidade celular.

Apesar de a redução do MTT ser geralmente atribuída à reductase mitocondrial, também foi sugerido que ela poderia ocorrer por meio de enzimas não mitocondriais<sup>111</sup> e, por isso, o verdadeiro mecanismo de redução celular do MTT não está ainda bem esclarecido.<sup>112</sup> Em células de medula óssea foi reportado que a maior parte da redução do MTT era extra-mitocondrial e que envolvia mecanismos nicotinamida adenina dinucleótido (NADH-) e NADPH-dependentes que não eram afectados por inibidores da cadeia respiratória.<sup>111</sup> Num outro estudo usando células derivadas de tumores cerebrais do rato, verificou-se que o MTT não era exclusivamente reduzido na mitocôndria mas também em vesículas intracelulares identificadas como endossomas e lisossomas.<sup>113</sup> Também foi reportado que o MTT não se difunde livremente pela membrana plasmática e que é, em vez disso, endocitado, enquanto o sal reduzido se acumula no compartimento endossomal/lisossomal e é depois transportado para a superfície da célula e exocitado.<sup>113</sup>

Entre os sais de formazana disponíveis comercialmente encontra-se, além do MTT, o 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-benzenossulfonato) de tetrazólio-5-carboxanilida e sódio (XTT) que tem a vantagem de originar um produto de redução solúvel, ao contrário do que acontece para o MTT (Figura 82). O XTT é particularmente útil no caso de células pouco aderentes, como as LNCaP e as LAPC4, que se destacam das placas muito facilmente após a formação dos cristais de formazana insolúveis.

Para a avaliação dos compostos foram usadas as já referidas células LNCaP e LAPC4 e também as células PC-3. Estas últimas derivam de metástases ósseas do CP e não expressam o AR,<sup>94, 114</sup> representando assim um modelo de estudo do CP em estadios mais avançados. O efeito dos

compostos na proliferação celular foi avaliado por leitura da absorvância (570 nm com o MTT e 450 nm com o XTT) após tratamento com 0,1, 1, 10 e 20  $\mu\text{M}$  de composto, em relação ao controlo.

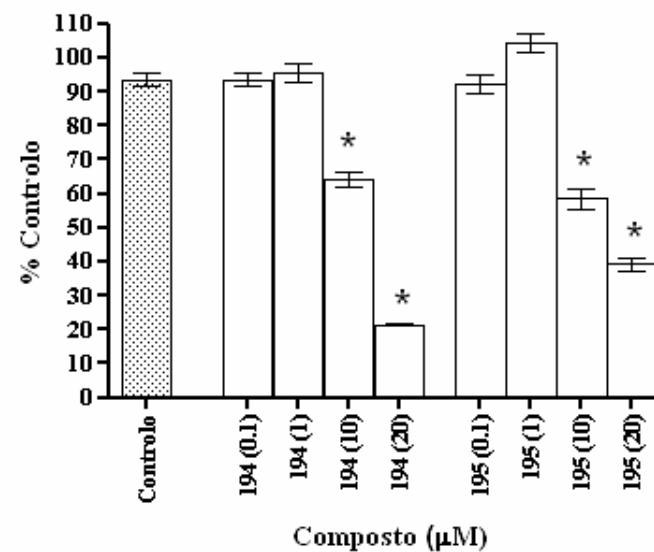
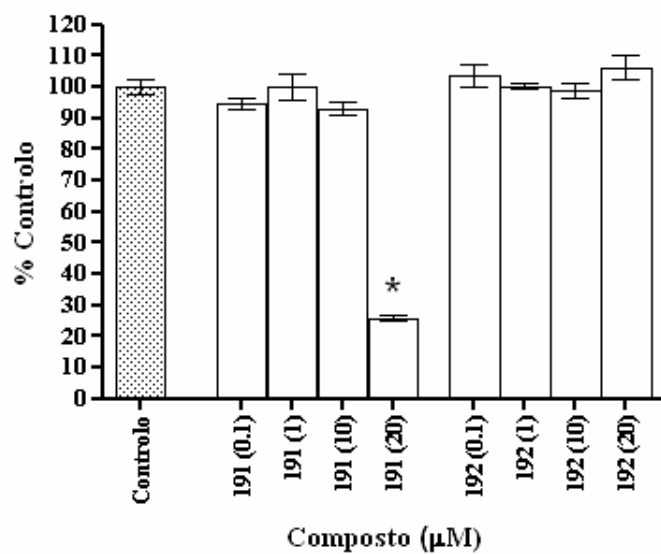
## **4.2 Resultados**

### **4.2.1 Derivados do indazole**

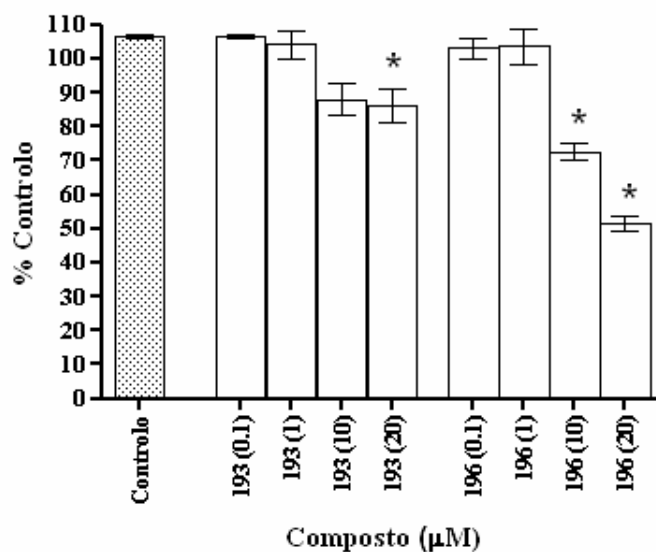
#### **4.2.1.1 Células LAPC4**

Os compostos **194-196** (*série 2*) foram mais eficazes na inibição da proliferação das células LAPC4 (Figuras 83 e 84). O composto **192** da *série 1* não demonstrou actividade enquanto os compostos **191** e **193** inibiram a proliferação das células LAPC4 na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , rondado a percentagem de inibição os 80% em relação ao controlo, para o composto **191** (Figura 83).





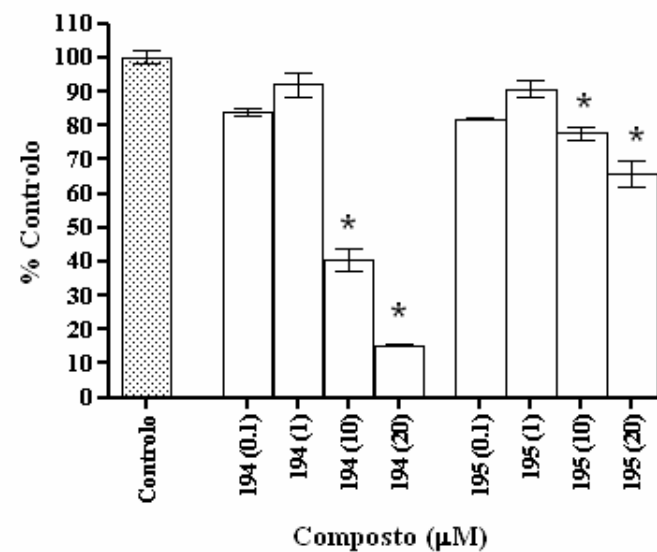
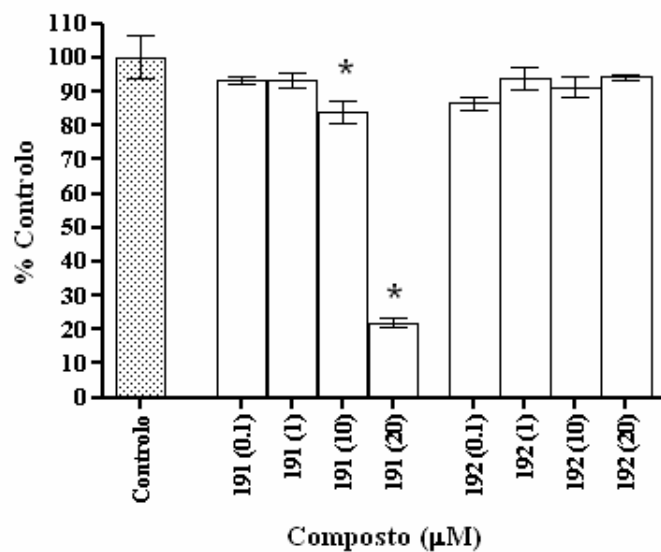
**Figura 83** – Efeito dos compostos 191, 192, 194 e 195 na proliferação das células LAPC4. Os resultados foram analisados por ANOVA (Dunnett): \*  $p < 0,01$  relação ao controle. As barras representam o SEM.



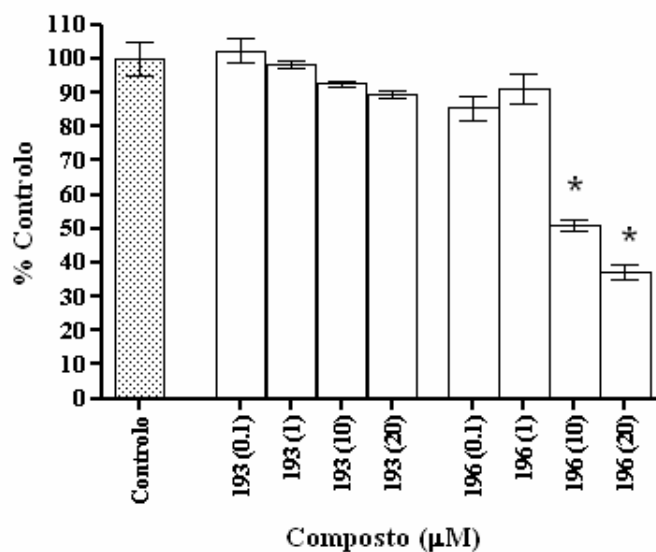
**Figura 84** – Efeito dos compostos **193** e **196** na proliferação das células LNCaP. Os resultados foram analisados por ANOVA (Dunnett): \*  $p < 0,01$  relação ao controle. As barras representam o SEM.

#### 4.2.1.2 Células LNCaP

Os compostos **194-196** (*série 2*) inibiram também a proliferação das células LNCaP nas concentrações de 10 e 20 µM. Na *série 1*, os compostos **192** e **193** não mostraram actividade (Figuras 85 e 86).



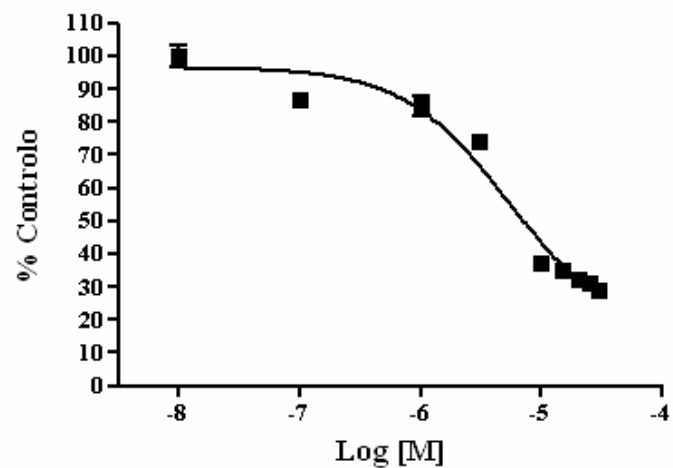
**Figura 85** – Efeito dos compostos **191**, **192**, **194** e **195** na proliferação das células LNCaP. Os resultados foram analisados por ANOVA (Dunnett): \*  $p < 0,01$  relação ao controle. As barras representam o SEM.



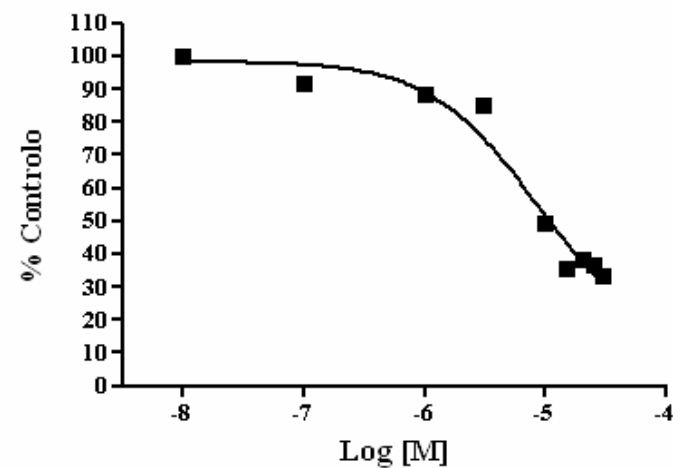
**Figura 86** – Efeito dos compostos **193** e **196** na proliferação das células LNCaP. Os resultados foram analisados por ANOVA (Dunnett): \*  $p < 0,01$  relação ao controle. As barras representam o SEM.

#### 4.2.1.3 Células PC-3

Os compostos **194-196** da *série 2* foram escolhidos para determinação do valor de  $EC_{50}$  no ensaio de inibição da proliferação das células PC-3, uma vez que, na concentração de 1  $\mu M$ , se conseguiu mais do que 30% de inibição da proliferação celular, em relação ao controle, com estes compostos (Figura 87 e 88).

Composto **194**

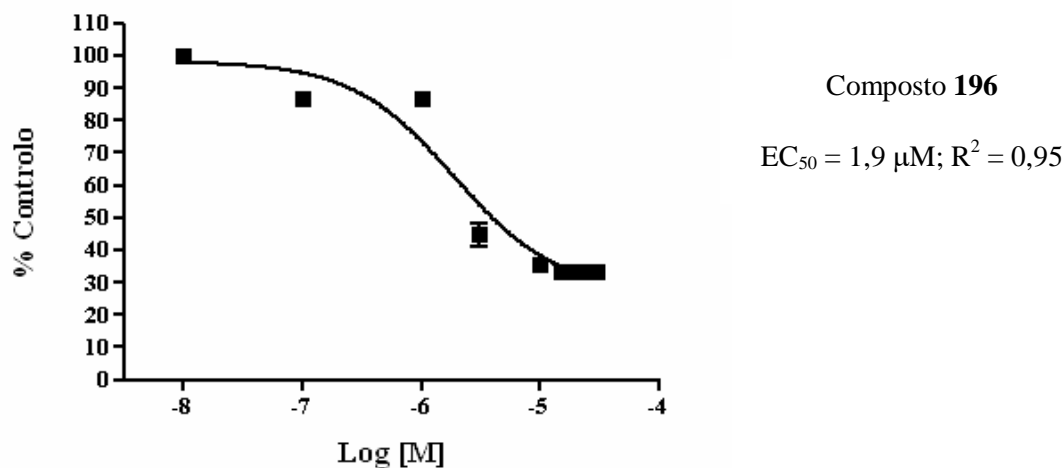
$$EC_{50} = 5,4 \mu\text{M}; R^2 = 0,97$$

Composto **195**

$$EC_{50} = 8,3 \mu\text{M}; R^2 = 0,97$$

**Figura 87** – Curva de  $EC_{50}$  para os compostos **194** e **195** (células PC-3). A análise foi feita por regressão não-linear usando o GraphPad Prism v.4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As barras representam o SEM.

Os valores de  $EC_{50}$  determinados foram de 5,4, 8,3 e 1,9  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Os compostos **191-193** da *série 1* não inibiram a proliferação das células PC-3 em pelo menos 30% quando comparados com o valor do controlo, na concentração de 1  $\mu\text{M}$ .



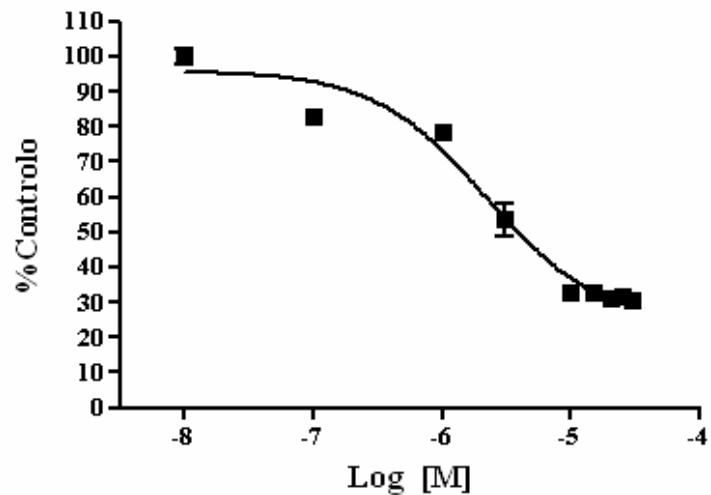
**Figura 88** – Curva de  $EC_{50}$  para o composto **196** (células PC-3). A análise foi feita por regressão não-linear usando o GraphPad Prism v.4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As barras representam o SEM.

## 4.2.2 C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole

### 4.2.2.1 Células PC-3

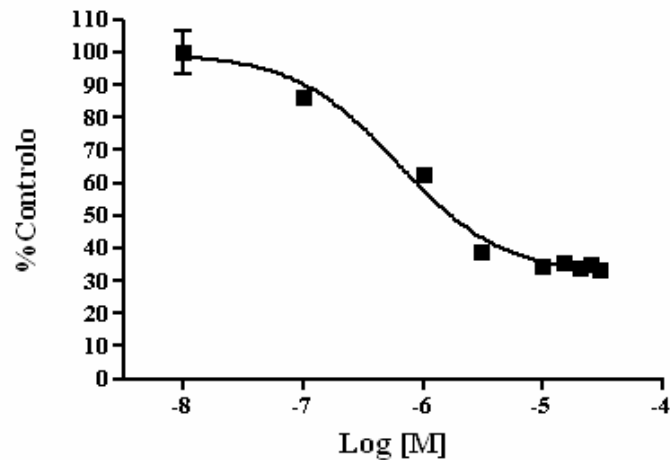
O valor de  $EC_{50}$  para a inibição da proliferação das células PC-3 foi calculado para os compostos **203** e **207** como sendo 2,2 e 0,2  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 89). Os restantes compostos testados **202**, **204-206**, **209** e **211**, na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , não inibiram a proliferação das células PC-3

em pelo menos 30%, em relação ao controlo (Figuras 90 e 91). O composto **215** não revelou potencial inibitório da proliferação celular nas concentrações testadas (Figura 91).



Composto **203**

$EC_{50} = 2,2 \mu\text{M}; R^2 = 0,97$

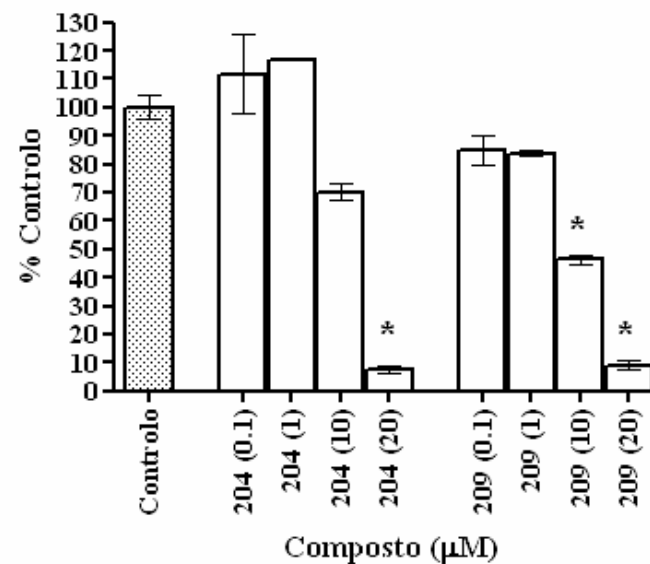
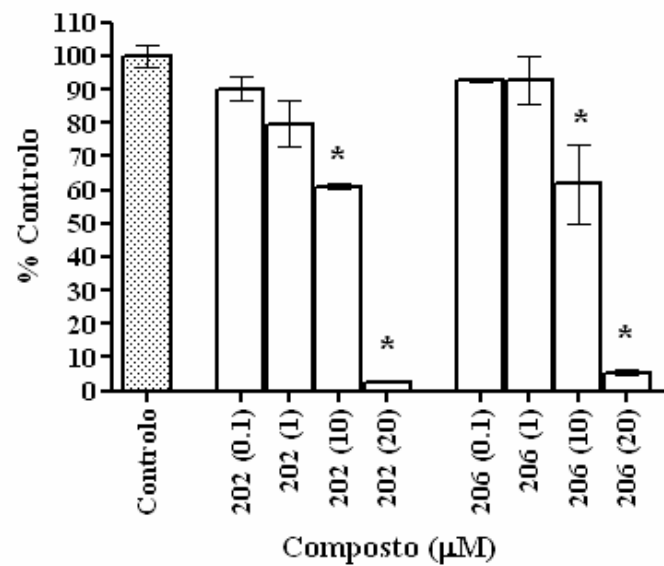


Composto **207**

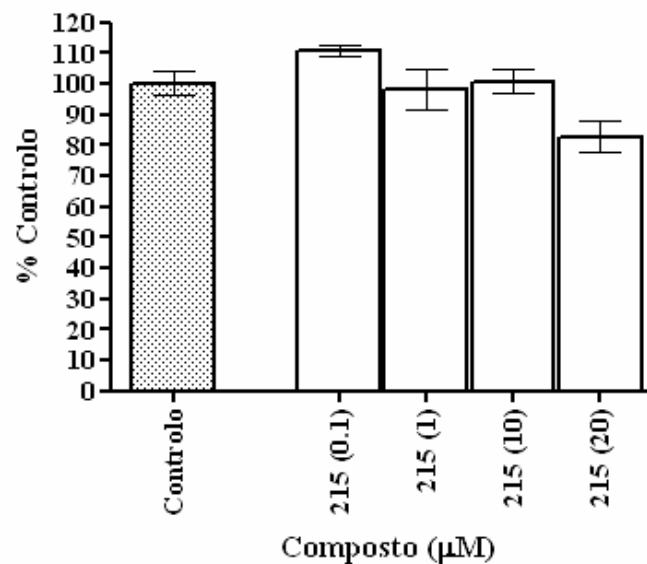
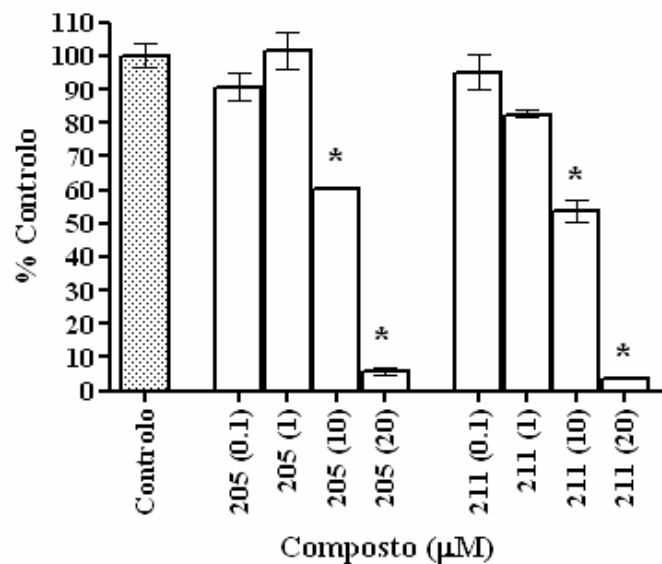
$EC_{50} = 0,2 \mu\text{M}; R^2 = 0,97$

**Figura 89** – Curvas de  $EC_{50}$  para os compostos **203** e **207** (células PC-3). A análise foi feita por regressão não-linear usando o GraphPad Prism v.4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As barras representam o SEM.





**Figura 90** – Efeito dos compostos **202**, **204**, **206** e **209** na proliferação das células PC-3. Os resultados foram analisados por ANOVA (Dunnett): \*  $p < 0,01$  relação ao controle. As barras representam o SEM.



**Figura 91** – Efeito dos compostos **205**, **211**, e **215** na proliferação das células PC-3. Os resultados foram analisados por ANOVA (Dunnett): \*  $p < 0,01$  relação ao controle.

As barras representam o SEM.

## 5. Conclusões

Os principais resultados da avaliação biológica dos compostos sintetizados estão sumariados na Tabela 16. Os compostos sintetizados não inibiram significativamente a CYP17 quando comparados com o cetoconazol **11** e o VN/85-1 **46** (Tabela 16, entradas 16-17). Os compostos mais promissores foram os carbamatos **206** e **215** com valores de  $IC_{50}$  de 17,1 e 11,5  $\mu$ M, respectivamente (Tabela 16, entradas 11 e 15). No caso dos derivados do indazole **191-196**, a falta de actividade poderá ser devida ao posicionamento dos átomos de N no anel heterocíclico que pode não permitir uma boa coordenação com o Fe heme da enzima, de acordo com os princípios gerais de relação estrutura-actividade já mencionados previamente. Nos carbamatos derivados do 2'-metilimidazole **202-207**, **209**, **211** e **215** as razões que podem contribuir para a falta de actividade inibitória da CYP17 incluem a presença da função carbamato em C17, que actua como um espaçador entre o C17 e o anel heterocíclico, o que pode impedir um bom encaixe no local activo da enzima, e a ausência de uma dupla ligação em C16.

No ensaio de ligação ao AR, os derivados do indazole **193** e **196**, dois derivados 3-oxo-4-eno, mostraram afinidade para o receptor não mutado expresso pelas células LAPC4 (Tabela 16, entradas 3 e 6). A sua afinidade é próxima da demonstrada pelo Casodex<sup>®</sup> (bicalutamida). Contudo, como o efeito na transcrição mediada por este receptor não foi alvo de estudo, fica por determinar que tipo de actividade exercem sobre ele. De uma forma geral, os carbamatos derivados do 2'-metilimidazole **202**, **204-207** e **215** ligaram-se com boa afinidade a ambos os tipos de receptores quando comparados com o Casodex<sup>®</sup>. A excepção ocorreu para o composto **211** que não tem afinidade para nenhum dos receptores (Tabela 16, entrada 14). Esta observação parece sugerir que a presença de um grupo capaz de estabelecer pontes de H na posição 3 do núcleo esteróide é importante para a afinidade para o AR.

Entrada	Composto	Inibição da CYP17	Ligação ao AR		Inibição da Proliferação Celular
		293T IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	LNCaP EC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μM)	LAPC4 EC <sub>50</sub> (μM)	PC-3 EC <sub>50</sub> (μM)
1	191	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>f</i>
2	192	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>f</i>
3	193	<i>c</i>	<i>e</i>	5,7	<i>f</i>
4	194	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>e</i>	5,4
5	195	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>e</i>	8,3
6	196	<i>c</i>	<i>e</i>	5,6	1,9
7	202	<i>c</i>	0,4	0,8	<i>f</i>
8	203	<i>c</i>	<i>e</i>	1,6	2,2
9	204	<i>c</i>	1,1	0,8	<i>f</i>
10	205	<i>c</i>	0,3	0,2	<i>f</i>
11	206	17,1	0,6	0,7	<i>f</i>
12	207	<i>c</i>	0,6	1,4	0,2
13	209	<i>c</i>	<i>e</i>	0,3	<i>f</i>
14	211	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>f</i>
15	215	11,5	0,7	2,3	<i>f</i>
16	<i>Cetoconazol</i>	47 nM	ND	ND	ND
17	<i>VN/85-1</i>	1,29 nM	ND	ND	ND
18	<i>Casodex</i> <sup>®</sup>	ND <sup>d</sup>	1,0	4,5	ND

**Tabela 16** – Resumo dos resultados de avaliação biológica dos compostos sintetizados. <sup>a</sup>IC<sub>50</sub> é a concentração de composto que inibe a actividade enzimática em 50%; <sup>b</sup>EC<sub>50</sub> é o valor intermédio entre a resposta máxima e mínima; <sup>c</sup>Menos de 30% de inibição da actividade enzimática a 10 μM; <sup>d</sup>ND = Não Determinado; <sup>e</sup>Menos de 30% de deslocamento do [<sup>3</sup>H]R1881 do AR a 5 μM; <sup>f</sup>Menos de 30% inibição da proliferação a 1 μM.

O facto de o composto **209** se ligar apenas ao AR nas LAPC4 sugere que o grupo 3β-acetilo é específico para esta ligação (Tabela 16, entrada 13). O composto **215**, contendo um grupo 3β-hidroxilo, mostra afinidade para ambos os tipos de receptores (Tabela 16, entrada 15). A melhor

interacção ocorreu para o composto **205** que mostrou os valores de  $EC_{50}$  mais baixos para ambos os tipos de receptor (Tabela 16, entrada 10).

A razão para o comportamento concentração-dependente dos compostos **202**, **204-207** e **215** na transcrição mediada pelo AR mutado das células LNCaP não é de momento conhecida. Outros compostos desenhados como inibidores da CYP17 e a 4-hidroxi-flutamida (o metabolito activo da flutamida), mostraram um efeito agonista sobre as células LNCaP.<sup>6, 115</sup> O cetoconazol também estimulou a transcrição mediada pelo AR mutado a 5  $\mu$ M.<sup>115</sup>

Foi sugerido que a actividade agonista ou antagonista de um composto depende da sua afinidade para o receptor, da sua concentração e da presença ou ausência de ligandos endógenos.<sup>99</sup> Para explicar o bloqueio concentração-dependente da transcrição mediada pelo LNCaP-AR dos metabolitos do fungicida vinclozolina, Wong *et al.* propuseram que seriam necessários dímeros do AR mistos, ou seja, compostos por uma molécula de agonista (ligando endógeno) e uma de antagonista, para que ocorresse antagonismo, enquanto dímeros não mistos com afinidade suficiente para o receptor promoveriam o agonismo.<sup>99</sup> Assim, o efeito concentração-dependente observado pelos compostos **202**, **204-207** e **215** sobre a transcrição do AR mutado poderá ser devido à presença destes dímeros mistos de composto e DHT **7** ou mesmo de um metabolito. Contudo, a validação desta hipótese exigiria estudos fora do âmbito deste trabalho.

Os derivados do indazole da *série 2* **194-196** revelaram uma boa capacidade de inibição da proliferação das células PC-3 com valores de  $EC_{50}$  de 5,4; 8,3 e 1,9  $\mu$ M, respectivamente (Tabela 16, entradas 4-6). Estas células são provenientes de metástases ósseas do CP e não expressam o AR. Como tal, é possível que mecanismos não mediados pelo AR como a apoptose ou a paragem do ciclo celular estejam implicados na citotoxicidade observada. Os carbamatos **203** e **207** também revelaram uma boa inibição da proliferação das células PC-3 com valores de  $EC_{50}$  de 2,2 e 0,2  $\mu$ M, respectivamente (Tabela 16, entradas 8 e 12). De uma forma geral, as células PC-3 foram mais

sensíveis aos compostos testados e a inibição da proliferação das células LAPC4 e LNCaP só foi conseguida a 10-20  $\mu$ M, para alguns derivados do indazole.

Em conclusão, os novos derivados do indazole sintetizados, especialmente os da *série 2*, foram particularmente interessantes do ponto de vista de inibição da proliferação das células PC-3, que não expressam o AR e representam um modelo de estudo do CP avançado. Entre os novos carbamatos derivados do 2'-metilimidazole sintetizados, dois inibiram a CYP17 ainda que de forma menos potente que o cetoconazol **11** e o VN/85-1 **46**. Em geral, a função carbamato permitiu uma excelente afinidade para o AR. O efeito promovido por esta classe de compostos sobre a transcrição mediada pelo AR mutado revelou-se dependente da concentração. Os carbamatos derivados do 2'-metilimidazole, com excepção do composto **215**, apresentaram ainda actividade inibitória da proliferação das células PC-3.

## 6. Referências

1. Moreira, V. M.; Vasaitis, T. S.; Njar, V. C.; Salvador, J. A. R. Synthesis and evaluation of novel 17-indazole androstene derivatives designed as CYP17 inhibitors. *Steroids* **2007**, *72*, 939-948.
2. Moreira, V. M.; Vasaitis, T. S.; Guo, Z.; Njar, V. C.; Salvador, J. A. R. Synthesis of Novel C17 Steroidal Carbamates. Studies on CYP17 Action, Androgen Receptor Binding and Function, and Prostate Cancer Cell Growth. **2008**, submetido para publicação.
3. Ehmer, P. B.; Jose, J.; Hartmann, R. W. Development of a simple and rapid assay for the evaluation of inhibitors of human 17 $\alpha$ -hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-lyase (P450c17) by coexpression of P450c17 with NADPH-cytochrome-P450-reductase in *Escherichia coli*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *75*, 57-63.
4. Haidar, S.; Ehmer, P. B.; Hartmann, R. W. Novel Steroidal Pyrimidyl Inhibitors of P450 17 (17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2001**, *334*, 373-374.
5. Haidar, S.; Ehmer, P. B.; Barassin, S.; Batzl-Hartmann, C.; Hartmann, R. W. Effects of Novel 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17, 20</sub>-Lyase (P450 17, CYP 17) Inhibitors on Androgen Biosynthesis *in vitro* and *in vivo*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *84*, 555-562.
6. Klus, G. T.; Nakamura, J.; Li, J. S.; Ling, Y. Z.; Son, C.; Kemppainen, J. A.; Wilson, E. M.; Brodie, A. M. Growth Inhibition of Human Prostate Cells *in vitro* by Novel Inhibitors of Androgen Synthesis. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 4956-4964.
7. Cherry, P. C.; Cocker, J. D.; Searle, A. D. Carbazole Derivatives With 17,20-Lyase Inhibiting Activity. *WO Patent* 94/27989, **1994**.
8. Nakajin, S.; Takahashi, K.; Shinoda, M. Inhibitory Effect and Interaction of Stanozolol With Pig Testicular Cytochrome P-450 (17 $\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-lyase). *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 1855-1858.
9. Chasalow, F. I.; Marr, H.; Taylor, G. A New Assay and Solubilization Procedure for Steroid 17,20-Lyase from Rat Testes. *Steroids* **1982**, *39*, 617-630.

10. Wilson, S. R.; Miao, E. Anti-testosterone compounds and Method of Use Thereof. *WO Patent* 92/15604, **1992**.
11. Brodie, A.; Jisong, L. 20-Substituted Pregnene Derivatives and Their Use as Androgen Inhibitors. *US Patent* 5,264,427, **1993**.
12. Li, J.; Li, Y.; Son, C.; Banks, P.; Brodie, A. 4-Pregnene-3-one-20  $\beta$ -carboxaldehyde: A Potent Inhibitor of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase and of 5 $\alpha$ -Reductase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1992**, *42*, 313-320.
13. Li, J.; Li, Y.; Son, C.; Brodie, A. M. Inhibition of Androgen Synthesis by 22-Hydroximino-23,24-Bisnor-4-cholen-3-one. *Prostate* **1995**, *26*, 140-150.
14. Al-Hamrouni, A. M.; Ahmadi, M.; Nicholls, P. J.; Smith, H. J.; Lombardi, P.; Pestellini, V. 1-[(Benzofuran-2-yl)phenylmethyl] Imidazoles as Inhibitors of 17 $\alpha$ -hydroxylase: 17,20-lyase (P450 17): Species and tissue differences. *Pharmaceutical Sci.* **1997**, *3*, 259-263.
15. Ideyama, Y.; Kudoh, M.; Tanimoto, K.; Susaki, Y.; Nanya, T.; Nakahara, T.; Ishikawa, H.; Yoden, T.; Okada, M.; Fujikura, T.; Akaza, H.; Shikama, H. Novel Nonsteroidal Inhibitor of Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  (17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase), YM116, Decreased Prostatic Weights by Reducing Serum Concentrations of Testosterone and Adrenal Androgens in Rats. *Prostate* **1998**, *37*, 10-18.
16. Matsunaga, N.; Kaku, T.; Itoh, F.; Tanaka, T.; Hara, T.; Miki, H.; Iwasaki, M.; Aono, T.; Yamaoka, M.; Kusaka, M.; Tasaka, A. C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors I. Structure-based De Novo Design and SAR Study of C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2251-2273.
17. Matsunaga, N.; Kaku, T.; Ojida, A.; Tanaka, T.; Hara, T.; Yamaoka, M.; Kusaka, M.; Tasaka, A. C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors. Part 2: Design, Synthesis and Structure-activity Relationships of (2-Naphthylmethyl)-1H-imidazoles as Novel C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4313-4336.



18. Schatzman, G. L.; Laughlin, M. E.; Blohm, T. R. A Normal Phase High-Performance Liquid-Chromatography System for Steroid 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub> Lyase (Cytochrome-P-450<sub>21Sc</sub>) Assays. *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 219-226.
19. Neubauer, B. L.; Best, K. L.; Blohm, T. R.; Gates, C.; Goode, R. L.; Hirsch, K. S.; Laughlin, M. E.; Petrow, V.; Smalstig, E. B.; Stamm, N. B.; Toomey, R. E.; Hoover, D. M. LY207320 (6-Methylene-4-pregnene-3,20-dione) Inhibits Testosterone Biosynthesis, Androgen Uptake, 5 $\alpha$ -Reductase, and Produces Prostatic Regression in Male-Rats. *Prostate* **1993**, *23*, 181-199.
20. Bahshwan, S. A.; Owen, C. P.; Nicholls, P. J.; Smith, H. J.; Masoud, A. Some 1-[(Benzofuran-2-yl)methyl] Imidazoles as Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase: 17,20-Lyase (P450 17) and Their Specificity Patterns. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, *50*, 1109-1116.
21. Ideyama, Y.; Kudoh, M.; Tanimoto, K.; Susaki, Y.; Nanya, T.; Nakahara, T.; Ishikawa, H.; Fujikura, T.; Akaza, H.; Shikama, H. YM116, 2-(1*H*-Imidazol-4-ylmethyl)-9*H*-carbazole, Decreases Adrenal Androgen Synthesis by Inhibiting C<sub>17,20</sub>-Lyase Activity in NCI-H295 Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **1999**, *79*, 213-220.
22. Angelastro, M. R.; Marquart, A. L.; Weintraub, P. M.; Gates, C. A.; Laughlin, M. E.; Blohm, T. R.; Peet, N. P. Time-dependent Inactivation of Steroid C<sub>17(20)</sub>-Lyase by 17 $\beta$ -Cyclopropyl Ether-substituted Steroids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 97-100.
23. Weintraub, P. M.; Gates, C. A.; Angelastro, M. R.; Curran, T. T.; Johnston, J. O. 4-Amino-17 $\beta$ -(Cyclopropyloxy)androst-4-en-3-one, 4-Amino-17 $\beta$ -(Cyclopropylamino)androst-4-en-3-one and Related Compounds as C<sub>17,20</sub>-Lyase and 5 $\alpha$ -Reductase. *US Patent* 5,486,511, **1996**.
24. Weintraub, P. M.; Gates, C.; Angelastro, M. R.; Flynn, G. A. Process For the Preparation of 4-Amino- $\Delta^4$ -3-ketosteroids Via Nitro- $\Delta^4$ -3-ketosteroids. *WO Patent* 95/29932, **1995**.
25. Burkhart, J. P.; Gates, C. A.; Laughlin, M. E.; Resvick, R. J.; Peet, N. P. Inhibition of Steroid C<sub>17(20)</sub>-Lyase With C17-Heteroaryl Steroids. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1411-1420.

26. Peet, N. P.; Burkhart, J. P.; Gates, C. 16-Unsaturated C<sub>17</sub> Heterocyclic Steroids Useful as Steroid C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors. *US Patent 5,677,293*, **1997**.
27. Peet, N. P.; Burkhart, J. P.; Gates, C. Methods and Compositions using  $\Delta^{16}$ -Unsaturated C<sub>17</sub>-Heterocyclic Steroids Useful as C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors. *US Patent 5,977,094*, **1999**.
28. Wolfling, J.; Oravec, E. A.; Ondre, D.; Mernyak, E.; Schneider, G.; Toth, I.; Szecsi, M.; Julesz, J. Stereoselective Synthesis of Some 17 $\beta$ -Dihydrooxazinyll Steroids, as Novel Presumed Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase. *Steroids* **2006**, *71*, 809-816.
29. Burkhart, J. P.; Weintraub, P. M.; Gates, C. A.; Resvick, R. J.; Vaz, R. J.; Friedrich, D.; Angelastro, M. R.; Bey, P.; Peet, N. P. Novel Steroidal Vinyl Fluorides as Inhibitors of Steroid C<sub>17(20)</sub>-Lyase. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 929-934.
30. Peet, N. P.; Weintraub, P. M.; Burkhart, J. P.; Gates, C. 20-Fluoro-17(20)-Vinyl Steroids. *US Patent 6,413,951 B2*, **2002**.
31. Weintraub, P. M.; Holland, A. K.; Gates, C. A.; Moore, W. R.; Resvick, R. J.; Bey, P.; Peet, N. P. Synthesis of 21,21-Difluoro-3 $\beta$ -hydroxy-20-methylpregna-5,20-diene and 5,16,20-Triene as Potential Inhibitors of Steroid C<sub>17(20)</sub>-Lyase. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 427-431.
32. Arth, G. E.; Patchett, A. A.; Jefopoulos, T.; Bugianesi, R. L.; Peterson, L. H.; Ham, E. A.; Kuehl, F. A.; Brink, N. G. Steroidal Androgen Biosynthesis Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 675-679.
33. Owen, C. P.; Dhanani, S.; Patel, C. H.; Shahid, I.; Ahmed, S. Synthesis and Biochemical Evaluation of a Range of Potent Benzyl Imidazole-based Compounds as Potential Inhibitors of the Enzyme Complex 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> ). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4011-4015.
34. Patel, C. H.; Dhanani, S.; Owen, C. P.; Ahmed, S. Synthesis, Biochemical Evaluation and Rationalisation of the Inhibitory Activity of Range of 4-Substituted Phenyl Alkyl Imidazole-based Inhibitors of the Enzyme Complex 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> ). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4752-4756.

35. Ayub, M.; Levell, M. J. Inhibition of Testicular  $17\alpha$ -Hydroxylase and  $17,20$ -Lyase but not  $3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-isomerase or  $17\beta$ -Hydroxysteroid Oxidoreductase by Ketoconazole and Other Imidazole Drugs. *J. Steroid Biochem.* **1987**, *28*, 521-531.
36. Barrie, S. E.; Rowlands, M. G.; Foster, A. B.; Jarman, M. Inhibition of  $17\alpha$ -Hydroxylase/ $C_{17,20}$ -Lyase by Bifluranl and Its Analogues. *J. Steroid Biochem.* **1989**, *33*, 1191-1195.
37. Hartmann, R. W.; Wachall, B. G.; Yoshihama, M.; Nakakoshi, M.; Nomoto, S.; Ikeda, Y. Novel Dihydronaphtalene Compounds and Processes of Producing the Same. *US Patent* 0032211 A1, **2002**.
38. McCague, R.; Rowlands, M. G.; Barrie, S. E.; Houghton, J. Inhibition of Enzymes of Estrogen and Androgen Biosynthesis by Esters of 4-Pyridylacetic Acid. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 3050-3055.
39. Chan, F.; Jarman, M.; Potter, G. A. Substituted Pyridines, Their Preparation and Pharmaceutical Use. *GB Patent* 2 266 887 A, **1993**.
40. Rowlands, M. G.; Barrie, S. E.; Chan, F.; Houghton, J.; Jarman, M.; McCague, R.; Potter, G. A. Esters of 3-Pyridylacetic Acid That Combine Potent Inhibition of  $17\alpha$ -Hydroxylase/ $C_{17,20}$ -Lyase (Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub> ) With Resistance to Esterase Hydrolysis. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4191-4197.
41. Chan, F. C.; Potter, G. A.; Barrie, S. E.; Haynes, B. P.; Rowlands, M. G.; Houghton, J.; Jarman, M. 3- and 4-Pyridylalkyl Adamantanecarboxylates: Inhibitors of Human Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  ( $17\alpha$ -Hydroxylase/ $C_{17,20}$ -Lyase). Potential Nonsteroidal Agents For the Treatment of Prostatic Cancer. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3319-3323.
42. Jarman, M.; Barrie, S. E.; Deadman, J. J.; Houghton, J.; McCague, R.; Rowlands, M. G. Hydroxyperfluoroazobenzenes: Novel Inhibitors of Enzymes of Androgen Biosynthesis. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2452-2455.
43. Angelastro, M. R.; Laughlin, M. E.; Schatzman, G. L.; Bey, P.; Blohm, T. R.  $17\beta$ -(Cyclopropylamino)-androst-5-en- $3\beta$ -ol, A Selective Mechanism-based Inhibitor of

- Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  (Steroid 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *162*, 1571-1577.
44. Barrie, S. E.; Jarman, M.; Potter, G. A.; Hardcastle, I. R. 17-Substituted Steroids Useful in Cancer Treatment. *US Patent* 5,604, 213, **1997**.
45. Potter, G. A.; Barrie, S. E.; Jarman, M.; Rowlands, M. G. Novel Steroidal Inhibitors of Human Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  (17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase): Potential Agents For the Treatment of Prostatic Cancer. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2463-2471.
46. Jarman, M.; Barrie, S. E.; Llera, J. M. The 16,17-Double Bond is Needed For Irreversible Inhibition of Human Cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  by Abiraterone (17-(3-Pyridyl)androsta-5, 16-dien-3 $\beta$ -ol) and Related Steroidal Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5375-5381.
47. Njar, V. C.; Kato, K.; Nnane, I. P.; Grigoryev, D. N.; Long, B. J.; Brodie, A. M. Novel 17-Azolyl Steroids, Potent Inhibitors of Human Cytochrome 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> ): Potential Agents for the Treatment of Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 902-912.
48. Sheets, J. J.; Zuber, M. X.; McCarthy, J. L.; Vickery, L. E.; Waterman, M. R. Discriminatory Inhibition of Adrenocortical 17 $\alpha$ -Hydroxylase Activity by Inhibitors of Cholesterol Side Chain Cleavage Cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *242*, 297-305.
49. Li, J. S.; Li, Y.; Son, C.; Brodie, A. M. Synthesis and Evaluation of Pregnane Derivatives as Inhibitors of Human Testicular 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4335-4339.
50. Barrie, S. E. An Improved Assay for 17- $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17</sub>-C<sub>20</sub> Lyase - a Target Enzyme for the Treatment of Hormone Dependent Prostatic-Cancer. *Br. J. Cancer* **1985**, *52*, 413-414.
51. Sergejew, T.; Hartmann, R. W. Pyridyl Substituted Benzocycloalkenes: New Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450 17 $\alpha$ ). *J. Enzyme Inhib.* **1994**, *8*, 113-122.

52. Rotstein, D. M.; Kertesz, D. J.; Walker, K. A.; Swinney, D. C. Stereoisomers of Ketoconazole: Preparation and Biological Activity. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2818-2825.
53. Zhuang, Y.; Hartmann, R. W. Synthesis and Evaluation of Azole-substituted 2-Aryl-6-methoxy-3,4-dihydronaphthalenes and -naphthalenes as Inhibitors of 17 $\alpha$ -hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-lyase (P450 17). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1999**, *332*, 25-30.
54. Wachter, G. A.; Hartmann, R. W.; Sergejew, T.; Grun, G. L.; Ledergerber, D. Tetrahydronaphthalenes: Influence of Heterocyclic Substituents on Inhibition of Steroid Enzymes P450 arom and P450 17. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 834-841.
55. Hartmann, R. W.; Frotscher, M.; Ledergerber, D.; Wachter, G. A.; Grun, G. L.; Sergejew, T. F. Synthesis and Evaluation of Azole-substituted Tetrahydronaphthalenes as Inhibitors of P450 arom, P450 17, and P450 TxA2. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1996**, *329*, 251-261.
56. Hartmann, R. W.; Paluszczak, A.; Lacan, F.; Ricci, G.; Ruzziconi, R. CYP 17 and CYP 19 Inhibitors. Evaluation of Fluorine Effects on the Inhibiting Activity of Regioselectively Fluorinated 1-(Naphthalen-2-ylmethyl)imidazoles. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2004**, *19*, 145-155.
57. Wachall, B. G.; Hector, M.; Zhuang, Y.; Hartmann, R. W. Imidazole Substituted Biphenyls: a New Class of Highly Potent and *in vivo* Active Inhibitors of P450 17 as Potential Therapeutics for Treatment of Prostate Cancer. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1913-1924.
58. Leroux, F.; Hutschenreuter, T. U.; Charriere, C.; Scopelliti, R.; Hartmann, R. W. *N*-(4-Biphenylmethyl)imidazoles as Potential Therapeutics For the Treatment of Prostate Cancer: Metabolic Robustness Due to Fluorine Substitution? *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2671-2686.
59. Zhuang, Y.; Wachall, B. G.; Hartmann, R. W. Novel Imidazolyl and Triazolyl Substituted Biphenyl Compounds: Synthesis and Evaluation as Nonsteroidal Inhibitors of Human 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17, 20</sub>-Lyase (P450 17). *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1245-1252.

60. Hartmann, R. W.; Wachter, G. A.; Sergejew, T.; Wurtz, R.; Duerkop, J. 4,5-Dihydro-3-(2-Pyrazinyl)Naphtho[1,2-*c*]Pyrazole - a Potent and Selective Inhibitor of Steroid-17- $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450 17). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1995**, 328, 573-575.
61. Zhuang, Y.; Zapp, J.; Hartmann, R. W. Synthesis of *Z*- and *E*-1-Methyl-2-(1-hydroximinoethyl)-6-methoxy-3,4-dihydronaphthalene and Evaluation as Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450 17). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1997**, 330, 359-361.
62. Zhuang, Y.; Hartmann, R. W. Synthesis of Novel Oximes of 2-Aryl-6-methoxy-3,4-dihydronaphthalene and Their Evaluation as Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450 17). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1998**, 331, 36-40.
63. Recanatini, M.; Bisi, A.; Cavalli, A.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Rampa, A.; Valenti, P.; Palzer, M.; Paluszczak, A.; Hartmann, R. W. A New Class of Nonsteroidal Aromatase Inhibitors: Design and Synthesis of Chromone and Xanthone Derivatives and Inhibition of the P450 Enzymes Aromatase and 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 672-680.
64. Hartmann, R. W.; Hector, M.; Haidar, S.; Ehmer, P. B.; Reichert, W.; Jose, J. Synthesis and Evaluation of Novel Steroidal Oxime Inhibitors of P450 17 (17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase) and 5 $\alpha$ -Reductase Types 1 and 2. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4266-4277.
65. Haidar, S.; Klein, C. D.; Hartmann, R. W. Synthesis and Evaluation of Steroidal Hydroxamic Acids as Inhibitors of P450 17 (17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2001**, 334, 138-140.
66. Njar, V. C.; Hector, M.; Hartmann, R. W. 20-Amino and 20,21-Aziridinyl Pregnene Steroids: Development of Potent Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450 17). *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 1447-1453.
67. Hartmann, R. W.; Hector, M.; Wachall, B. G.; Paluszczak, A.; Palzer, M.; Huch, V.; Veith, M. Synthesis and Evaluation of 17-Aliphatic Heterocycle-substituted Steroidal Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450 17). *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4437-4445.

68. Haidar, S.; Hartmann, R. W. C16 and C17 Substituted Derivatives of Pregnenolone and Progesterone as Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17, 20</sub>-Lyase: Synthesis and Biological Evaluation. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2002**, 335, 526-534.
69. Ahmed, S.; Smith, J. H.; Nicholls, P. J.; Whomsley, R.; Cariuk, P. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Pyrrolidine-2,5-dione Inhibitors as Potential Anti-tumour Agents. *Drug Des. Discov.* **1995**, 12, 275-287.
70. Canton, R. F.; Sanderson, J. T.; Nijmeijer, S.; Bergman, A.; Letcher, R. J.; Van Den Berg, M. *In vitro* Effects of Brominated Flame Retardants and Metabolites on CYP17 Catalytic Activity: A Novel Mechanism of Action? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, 216, 274-281.
71. Duc, I.; Bonnet, P.; Duranti, V.; Cardinali, S.; Riviere, A.; De Giovanni, A.; Shields-Botella, J.; Barcelo, G.; Adje, N.; Carniato, D.; Lafay, J.; Pascal, J. C.; Delansorne, R. *In vitro* and *in vivo* models for the evaluation of potent inhibitors of male rat 17 $\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-lyase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, 84, 537-542.
72. Ling, Y. Z.; Li, J. S.; Liu, Y.; Kato, K.; Klus, G. T.; Brodie, A. 17-Imidazolyl, Pyrazolyl, and Isoxazolyl Androstene Derivatives. Novel Steroidal Inhibitors of Human Cytochrome C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> ). *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3297-3304.
73. Njar, V. C.; Klus, G. T.; Johnson, H. H.; Brodie, A. M. Synthesis of Novel 21-Trifluoropregnane Steroids: Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (17 $\alpha$ -Lyase). *Steroids* **1997**, 62, 468-473.
74. Nnane, I. P.; Kato, K.; Liu, Y.; Lu, Q.; Wang, X.; Ling, Y. Z.; Brodie, A. Effects of Some Novel Inhibitors of C<sub>17,20</sub>-Lyase and 5 $\alpha$ -Reductase *in vitro* and *in vivo* and Their Potential Role in the Treatment of Prostate Cancer. *Cancer Res.* **1998**, 58, 3826-3832.
75. Grigoryev, D. N.; Kato, K.; Njar, V. C.; Long, B. J.; Ling, Y. Z.; Wang, X.; Mohler, J.; Brodie, A. M. Cytochrome P450c17-expressing *Escherichia coli* as a first-step screening system for 17 $\alpha$ -hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-lyase inhibitors. *Anal. Biochem.* **1999**, 267, 319-330.

76. Grigoryev, D. N.; Long, B. J.; Nnane, I. P.; Njar, V. C.; Liu, Y.; Brodie, A. M. Effects of New 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-Lyase Inhibitors on LNCaP Prostate Cancer Cell Growth *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Cancer* **1999**, *81*, 622-630.
77. Nnane, I. P.; Kato, K.; Liu, Y.; Long, B. J.; Lu, Q.; Wang, X.; Ling, Y. Z.; Brodie, A. Inhibition of androgen synthesis in human testicular and prostatic microsomes and in male rats by novel steroidal compounds. *Endocrinology* **1999**, *140*, 2891-2897.
78. Nnane, I. P.; Njar, V. C.; Liu, Y.; Lu, Q.; Brodie, A. M. Effects of Novel 17-Azoly Compounds on Androgen Synthesis *in vitro* and *in vivo*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *71*, 145-152.
79. Nnane, I. P.; Long, B. J.; Ling, Y. Z.; Grigoryev, D. N.; Brodie, A. M. Anti-tumour Effects and Pharmacokinetic Profile of 17-(5'-Isoxazolyl)androsta-4,16-dien-3-one (L-39) in Mice: An Inhibitor of Androgen Synthesis. *Br. J. Cancer* **2000**, *83*, 74-82.
80. Zhu, N.; Ling, Y.; Lei, X.; Handratta, V.; Brodie, A. M. Novel P450<sub>17 $\alpha$</sub>  Inhibitors: 17-(2'-Oxazolyl)- and 17-(2'-Thiazolyl)-androstene Derivatives. *Steroids* **2003**, *68*, 603-611.
81. Handratta, V. D.; Vasaitis, T. S.; Njar, V. C.; Gediya, L. K.; Kataria, R.; Chopra, P.; Newman, D.; Farquhar, R.; Guo, Z.; Qiu, Y.; Brodie, A. M. Novel C17-Heteroaryl Steroidal CYP17 Inhibitors/Antiandrogens: Synthesis, *in vitro* Biological Activity, Pharmacokinetics, and Antitumor Activity in the LAPC4 Human Prostate Cancer Xenograft Model. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2972-2984.
82. Brodie, A.; Njar, V. C. 17-Azoly Steroids Useful as Androgen Synthesis Inhibitors. *US Patent* 6,200,965 B1, **2001**.
83. Akhtar, M.; Corina, D. L.; Miller, S. L.; Shyadehi, A. Z.; Wright, J. N. Incorporation of Label from <sup>18</sup>O<sub>2</sub> into Acetate during Side-chain Cleavage Catalyzed by Cytochrome P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  (17 $\alpha$ -Hydroxylase-17,20-Lyase). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 263-267.
84. Sanchez, P. E.; Ryan, M. A.; Kridelka, F.; Gielen, I.; Ren, S. G.; Albertson, B.; Malozowski, S.; Nieman, L.; Cassorla, F. RU-486 Inhibits Rat Gonadal Steroidogenesis. *Horm. Metab. Res.* **1989**, *21*, 369-371.



85. Nakajin, S.; Shinoda, M.; Haniu, M.; Shively, J. E.; Hall, P. F. C<sub>21</sub> Steroid Side Chain Cleavage Enzyme From Porcine Adrenal Microsomes. Purification and Characterization of the 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C17,20-Lyase Cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3971-3976.
86. Fevold, H. R.; Lorence, M. C.; McCarthy, J. L.; Trant, J. M.; Kagimoto, M.; Waterman, M. R.; Mason, J. I. Rat P450<sub>17 $\alpha$</sub>  From Testis: Characterization of a Full-length cDNA Encoding a Unique Steroid Hydroxylase Capable of Catalyzing Both  $\Delta^4$ - and  $\Delta^5$ -Steroid-17,20-Lyase Reactions. *Mol. Endocrinol.* **1989**, *3*, 968-975.
87. Sakai, N.; Tanaka, M.; Adachi, S.; Miller, W. L.; Nagahama, Y. Rainbow Trout Cytochrome P-450<sub>c17</sub> (17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase). cDNA Cloning, Enzymatic Properties and Temporal Pattern of Ovarian P-450<sub>c17</sub> mRNA Expression During Oogenesis. *FEBS Lett.* **1992**, *301*, 60-64.
88. Barnes, H. J.; Arlotto, M. P.; Waterman, M. R. Expression and Enzymatic Activity of Recombinant Cytochrome P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5597-5601.
89. Imai, T.; Globerman, H.; Gertner, J. M.; Kagawa, N.; Waterman, M. R. Expression and Purification of Functional Human 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450c17) in *Escherichia coli*. Use of This System for Study of a Novel Form of Combined 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase Deficiency. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 19681-19689.
90. Chung, B. C.; Picado-Leonard, J.; Haniu, M.; Bienkowski, M.; Hall, P. F.; Shively, J. E.; Miller, W. L. Cytochrome P450c17 (Steroid 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20 Lyase): Cloning of Human Adrenal and Testis cDNAs Indicates the Same Gene is Expressed in Both Tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 407-411.
91. Bradshaw, K. D.; Waterman, M. R.; Couch, R. T.; Simpson, E. R.; Zuber, M. X. Characterization of Complementary Deoxyribonucleic Acid for Human Adrenocortical 17 $\alpha$ -Hydroxylase: a Probe for Analysis of 17 $\alpha$ -Hydroxylase Deficiency. *Mol. Endocrinol.* **1987**, *1*, 348-354.

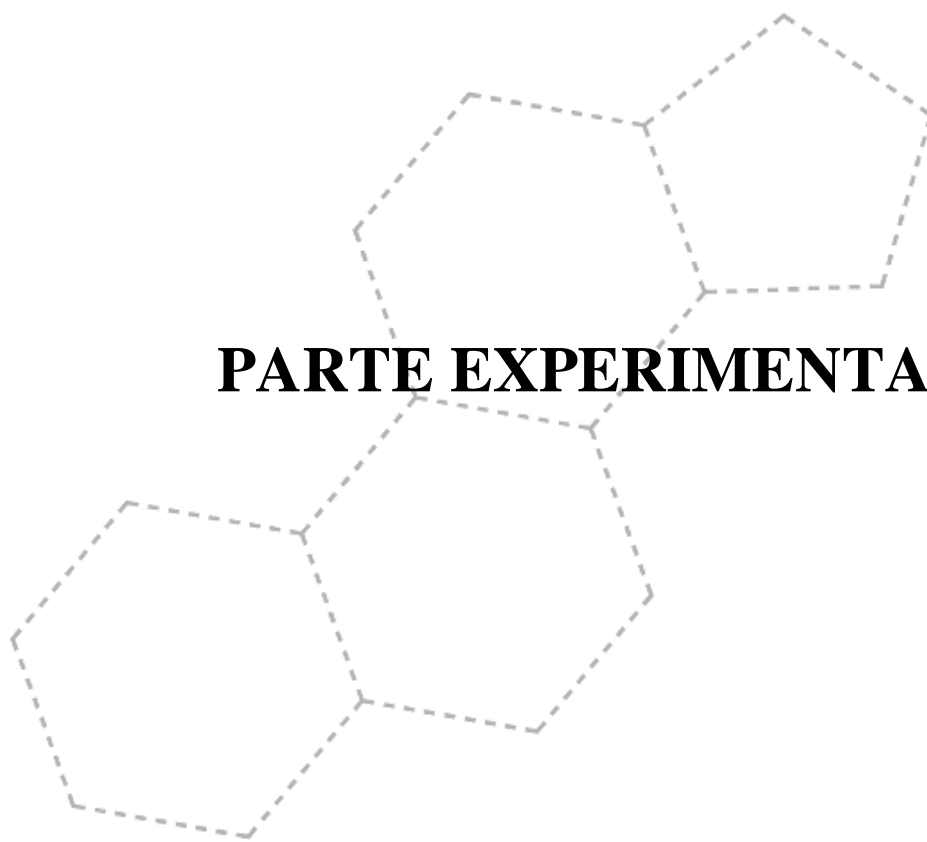
92. Promega Corporation. ProFection<sup>®</sup> Mammalian Transfection System. <http://www.promega.com/tbs/tm012/tm012.pdf>. (acedido em 8 de Fevereiro, 2008).
93. Maniatis, S.; Fritsch, E. F.; Sambrook, S. *Molecular Cloning- A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press: NewYork, **2000**.
94. Van Bokhoven, A.; Varella-Garcia, M.; Korch, C.; Johannes, W. U.; Smith, E. E.; Miller, H. L.; Nordeen, S. K.; Miller, G. J.; Lucia, M. S. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* **2003**, *57*, 205-225.
95. Klein, K. A.; Reiter, R. E.; Redula, J.; Morad, H.; Zhu, X. L.; Brothman, A. R.; Lamb, D. J.; Marcelli, M.; Beldegrun, A. S.; Witte, O. N.; Sawyers, C. L. Progression of metastatic human prostate cancer to androgen independence in immunodeficient SCID mice. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 402-408.
96. Horoszewicz, J. S.; Leong, S. S.; Kawinski, E.; Karr, J. P.; Rosenthal, H.; Chu, T. M.; Mirand, E. A.; Murphy, G. P. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 1809-1818.
97. Culig, Z.; Klocker, H.; Eberle, J.; Kaspar, F.; Hobish, A.; Cronauer, M. V.; Bartsch, G. DNA Sequence of androgen receptor in prostatic tumor cells lines and tissue specimens assessed by means of polymerase chain reaction. *Prostate* **1993**, *22*, 11-22.
98. Veldscholte, J.; Berrevoets, C. A.; Mulder, E. Studies on the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *49*, 341-346.
99. Wong, C.; Kelce, W. R.; Sar, M.; Wilson, E. M. Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19998-20003.
100. de Wet, J. R.; Wood, K. V.; DeLuca, M.; Helinsky, D. R.; Subramani, S. Firefly luciferase gene. Structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **1987**, *7*, 725-737.
101. Promega Corporation. Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System. [http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Promega\\_dualluciferase.pdf](http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Promega_dualluciferase.pdf) (acedido em 8 de Fevereiro, 2008).

102. Zhang, J.; Thomas, T. Z.; Kasper, S.; Matusik, R. J. A small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* **2000**, *141*, 4698-4710.
103. Kim, O.; Jiang, T.; Xie, Y.; Guo, Z.; Chen, H.; Qiu, Y. Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* **2004**, *23*, 1838-1844.
104. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
105. Altman, F. P. Tetrazolium salts and formazans. *Prog. Histochem. Cytochem.* **1976**, *9*, 1-56.
106. Green, L. M.; Reade, J. L.; Ware, C. F. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* **1984**, *70*, 257-268.
107. Hegg, K.; Reimann, J.; Kabelitz, D.; Hardt, C.; Wagner, H. A rapid colorimetric assay for the determination of IL-2 producing helper T cell frequencies. *J. Immunol. Methods* **1985**, *77*, 237-246.
108. Denizot, F.; Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **1986**, *89*, 271-277.
109. Hansen, M. B.; Nielsen, S. E.; Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **1989**, *191*, 203-210.
110. Slater, T. F.; Sawyer, B.; Strauli, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *77*, 383-393.
111. Berridge, M. V.; Tan, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular location, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303*, 474-482.

112. Bernhardt, D.; Schwaiger, W.; Crazzolar, R.; Tinhofer, I.; Kofler, R.; Csordas, A. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* **2003**, *195*, 193-199.
113. Liu, Y.; Peterson, D. A.; Kimura, H.; Schubert, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 581-593.
114. Kaighn, M. E.; Narayan, K. S.; Ohnuki, Y.; Lechner, J. F.; Jones, L. W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line PC-3. *Invest. Urol.* **1979**, *17*, 16-23.
115. Long, B. J.; Grigoryev, D. N.; Nnane, I. P.; Liu, Y.; Ling, Y. Z.; Brodie, A. M. Antiandrogenic Effects of Novel Androgen Synthesis Inhibitors on Hormone-dependent Prostate Cancer. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6630-6640.

# CAPÍTULO IV

## PARTE EXPERIMENTAL



## 1. Síntese química

Os seguintes substratos esteróides: 17 $\beta$ -hidroxiandrost-1-en-3-ona, 17 $\beta$ -hidroxiandrosta-4,6-dien-3-ona, 17 $\beta$ -hidroxiandrosta-1,4,6-trien-3-ona e 17 $\beta$ -hidroxiandrosta-1,4-dien-3-ona foram adquiridos à Steraloids Inc. Os restantes substratos esteróides e todos os outros reagentes necessários à realização deste trabalho foram adquiridos à Sigma-Aldrich Co.

Todos os solventes usados foram previamente secos e purificados de acordo com os procedimentos clássicos descritos na literatura.<sup>1, 2</sup> Para a análise por TLC foram usadas placas comerciais Kieselgel 60 F<sub>254</sub> da Merck. As placas foram observadas à luz ultra-violeta (UV) a 254 nm e reveladas usando uma mistura etanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95:5) seguida de aquecimento a cerca de 120°C. Para a cromatografia *flash* foi usada sílica gel 60 (230-400 mesh ASTM). Os pontos de fusão apresentados não estão corrigidos e foram determinados num aparelho BUCHI B-540. Os espectros de IR foram obtidos usando um espectrofotómetro JASCO FT/IR-420. Os espectros de NMR foram registados num Brucker Digital NMR-Avance 300 ou num espectrofotómetro Varian 600 MHz, em CDCl<sub>3</sub>, usando tetrametilsilano como padrão interno. Os espectros de massa foram registados num espectrofotómetro Finnigan Polaris Q GC/MS Benchtop Ion Trap. Para a Espectroscopia de Massa de Alta Resolução (HMRS) usou-se um espectrofotómetro Brucker 12T APEX-Qe FTIRC-MS (Apollo II ion source e Advion Triversa Nanomate system). A Análise Elemental (EA) foi feita num aparelho Fisons Instruments EA 1108 CHNS-O. O estudo de difracção de raios X foi efectuado num difractómetro Brucker Apex CCD.

## 1.1 Derivados do indazole

### 1.1.1 Síntese do acetato de 17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (187) e do acetato de 17-cloroandrosta-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (188)

Os detalhes da síntese destes compostos foram previamente descritos na literatura.<sup>3-5</sup> Num balão de fundo redondo de 100 ml preparou-se uma solução de POCl<sub>3</sub> (10 ml) em DMF (10 ml) que foi arrefecida em banho de gelo, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Adicionou-se de seguida uma solução de acetato de DHEA **186** (2,00 g; 6,10 mmoles) em clorofórmio (40 ml) e elevou-se gradualmente a temperatura até 80 °C, com agitação magnética, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. O controlo da reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 1:10) mostrou, ao fim de 6 horas, que o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obtiveram-se duas manchas de R<sub>f</sub> 0,5 e 0,8. A mistura reaccional foi concentrada com a ajuda de um evaporador rotativo. Adicionou-se uma mistura de acetato de etilo – éter etílico 2:8 (300 ml) e verteu-se esta mistura sobre gelo, com o matraz de recolha arrefecido. A mistura final foi deixada sob agitação magnética cerca de duas horas. A fase orgânica total foi lavada com NaHCO<sub>3</sub> 10% aquoso (2 × 60 ml), água (60 ml), solução saturada de NaCl (60 ml), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um pó que foi seco em estufa de vácuo. Este pó foi submetido a cromatografia *flash* (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 1:10) tendo-se obtido o composto **187** (1,35 g; 59%), que foi posteriormente recristalizado de acetato de etilo/*n*-hexano.

P.f. 172-175 °C; IR 1243, 1673, 1731 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  0,99 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 1,07 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, 3 $\beta$ -OAc); 4,59 (m, 1H, 3 $\alpha$ -H); 5,39 (m, 1H, 6-H); 9,99 (s, 1H, CHO); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  73,6 (C3); 121,8 (C6); 136,4 (C16/C17); 139,9 (C5); 162,3 (C16/C17); 170,5 (CH<sub>3</sub>C=O); 188,1 (CHO).

Numa segunda fracção obteve-se o composto **188** (0,35 g; 16%), que foi posteriormente recristalizado de acetato de etilo/*n*-hexano.

P.f. 162-164 °C; IR 1244, 1732 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 0,89 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 1,06 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, 3β-OAc); 4,62 (m, 1H, 3α-H); 5,39 (m, 1H, 6-H); 5,61 (m, 1H, 16-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 73,8 (C3); 122,0 (C6); 124,6 (C16/C17); 140,0 (C5); 144,6 (C16/C17); 170,5 (CH<sub>3</sub>C=O).

### 1.1.2 Síntese do acetato de 16-formil-17-(1*H*-indazol-1-il)androsta-5,16-dien-3β-ilo (**189**) e do acetato de 16-formil-17-(2*H*-indazol-2-il)androsta-5,16-dien-3β-ilo (**190**)

Num balão de fundo redondo de 100 ml juntou-se o composto **187** (2,00 g; 5,32 mmoles), indazole (0,94 g; 7,98 mmoles), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,20 g; 15,94 mmoles) e DMF (40 ml) e aqueceu-se a 80 °C com agitação magnética, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. O controlo da reacção por TLC (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C 7:3) mostrou que, ao fim de 6 horas, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obtiveram-se duas manchas correspondentes aos produtos de reacção com valores de R<sub>f</sub> 0,3 e 0,4 e com absorção UV. A mistura reaccional foi concentrada com a ajuda de um evaporador rotativo. Adicionou-se água (60 ml) e diclorometano (200 ml) e deixou-se a mistura sob agitação magnética por cerca de duas horas. A fase aquosa foi novamente extraída com diclorometano (2 × 50 ml). A fase orgânica total foi lavada com água (60 ml), solução saturada de NaCl (60 ml), seca com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um óleo amarelado que foi seco em estufa de vácuo. Este óleo foi submetido a cromatografia *flash* (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C; 7:3) tendo-se obtido o composto **189** (1,27 g; 52%), que foi posteriormente recristalizado de acetona/*n*-hexano.



P.f. 185-189 °C; IR 1248, 1633, 1661, 1721  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$  1,07 (s, 3H, 19- $\text{H}_3$ ); 1,26 (s, 3H, 18- $\text{H}_3$ ); 2,03 (s, 3H, 3 $\beta$ -OAc); 4,60 (m, 1H, 3 $\alpha$ -H); 5,43 (m, 1H, 6-H); 7,24 (m, 1H, 5'-H); 7,44 (m, 2H, 6'-H e 7'-H); 7,76 (m, 1H, 4'-H); 8,23 (brs, 1H; 3'-H); 9,71 (brs, 1H, CHO);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150,8 MHz)  $\delta$  73,7 (C3); 110, 2 (C6'/C7'); 121,1 (C4'); 121,9 (C6); 122,4 (C5'); 124,5 (C3a); 128,0 (C6'/C7'); 130,4 (C16); 137,3 (C3'); 140,0 (C5); 142,0 (C7a); 163,0 (C17); 170,4 ( $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ ); 188,0 ( $\underline{\text{C}}\text{HO}$ ); EI-MS  $m/z$  (%): 458 (12)  $\text{M}^+$ , 398 (26), 225 (25), 185 (39), 157 (100), 143 (16), 91 (22), 77 (14); EA: calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$ : C 75,95; H 7,47; N 6,11; encontrado: C 75,89; H 7,29; N 5,90.

Numa segunda fracção obteve-se o composto **190** (0,54 mg; 22%), que foi posteriormente recristalizado de acetona/*n*-hexano.

P.f. 190-192 °C; IR 1245, 1629, 1661, 1731  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$  1,08 (s, 3H, 19- $\text{H}_3$ ); 1,27 (s, 3H, 18- $\text{H}_3$ ); 2,03 (s, 3H, 3 $\beta$ -OAc); 4,61 (m, 1H, 3 $\alpha$ -H); 5,43 (m, 1H, 6-H); 7,12 (m, 1H, 6'-H); 7,33 (m, 1H, 5'-H); 7,67 (m, 1H, 4'-H); 7,71 (m, 1H; 7'-H); 8,18 (brs, 1H, 3'-H); 10,14 (s, 1H, CHO);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150,8 MHz)  $\delta$  73,6 (C3); 117, 6 (C7'); 120,2 (C4'); 121,8 (C7a); 122,1 (C6); 123,2 (C6'); 124,0 (C3'); 127,7 (C5'); 133,0 (C16); 139,9 (C5); 150,1 (C3a); 161,3 (C17); 170,4 ( $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ ); 190,5 ( $\underline{\text{C}}\text{HO}$ ); EI-MS  $m/z$  (%): 458 (32)  $\text{M}^+$ , 398 (74), 383 (48), 293 (24), 225 (56), 185 (54), 157 (100), 130 (20); EA: calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$ : C 75,95; H 7,47; N 6,11; encontrado: C 76,02; H 7,53; N 5,88.

### 1.1.3 Síntese do acetato de 17-(1*H*-indazol-1-il)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (191)

Num balão de fundo redondo de 250 ml juntou-se cloreto de carbonilobis(trifenilfosfina) ródio(I) (0,32 g; 0,47 mmoles) e 1,1,3,3-tetrafenilfosfinopropano (0,42 g; 1,02 mmoles) em xilenos seco (95 ml) e deixou-se a 80 °C, com agitação magnética, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Passados 15 minutos, formou-se um precipitado amarelo. Adicionou-se então o composto **189** (1,20 g; 2,62 mmoles) e levou-se a mistura a refluxo, sob atmosfera de N<sub>2</sub>, por 10 dias. O controlo da reacção por TLC (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C 7:3) mostrou que o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de R<sub>f</sub> 0,5 e com absorção UV. A mistura de reacção foi concentrada com a ajuda de um evaporador rotativo. O óleo resultante foi dissolvido em diclorometano (600 ml) e tratado com carvão activado a quente. Após filtração, a fase orgânica foi lavada com água (60 ml), seca com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada à securo, obtendo-se um óleo amarelado. Este óleo foi submetido a cromatografia *flash* (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C 7:3) tendo-se obtido o composto **191** (0,70 g; 62%), que foi posteriormente recristalizado de acetonitrilo/THF.

P. f. 154-156 °C; IR 1241, 1620, 1728 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$  1,09 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 1,18 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, 3 $\beta$ -OAc); 4,61 (m, 1H, 3 $\alpha$ -H); 5,43 (m, 1H, 6-H); 5,86 (m, 1H, 16-H); 7,18 (m, 1H, 6'-H); 7,39 (m, 1H, 5'-H); 7,64 (m, 1H, 4'-H); 7,74 (m, 1H; 7'-H); 8,07 (brs, 1H, 3'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150,8 MHz)  $\delta$  73,8 (C3); 111,2 (C7'); 116,7 (C16); 120,8 (C4'); 121,1 (C5'); 122,1 (C6); 124,3 (C3a); 126,6 (C6'); 134,0 (C3'), 139,8 (C7a); 140,1 (C5); 150,6 (C17); 170,5 (CH<sub>3</sub>C=O); EI-MS *m/z* (%): 430 (20) M<sup>+</sup>, 370 (100), 355 (40), 195 (26), 157 (85), 144 (32), 119 (28), 91 (38); EA: calculado para C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C 78,10; H 7,96; N 6,51; encontrado: C 78,40; H 7,60; N 6,36.

#### 1.1.4 Síntese do 17-(1*H*-indazol-1-il)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ol (**192**)

Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveu-se o composto **191** (0,40 g; 0,93 mmoles) em MeOH (7,5 ml), à temperatura ambiente, com agitação magnética, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Adicionou-se de seguida KOH (10%) em metanol (2,5 ml). O controlo de reacção por TLC (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C 7:3) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 1 hora e 30 minutos, tendo o substrato sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de R<sub>f</sub> 0,2 e com absorção UV. A mistura de reacção foi concentrada com a ajuda de um evaporador rotativo. Ao pó resultante juntou-se diclorometano (150 ml) e água (20 ml) e esta mistura ficou sob agitação magnética durante cerca de duas horas. A fase aquosa foi novamente extraída com diclorometano (2 × 100 ml). A fase orgânica total foi lavada com água (20 ml), seca com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada à secura, obtendo-se o composto **192** (0,30 g; 82%), que foi posteriormente recristalizado de acetona.

P. f. 189-191 °C; IR 1625, 3257 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  1,08 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 1,18 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 3,55 (m, 1H, 3 $\alpha$ -H); 5,41 (m, 1H, 6-H); 5,86 (m, 1H, 16-H); 7,18 (m, 1H, 6'-H); 7,39 (m, 1H, 5'-H); 7,64 (m, 1H, 4'-H); 7,74 (m, 1H, 7'-H); 8,07 (brs, 1H, 3'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  71,6 (C3); 111,2 (C7'); 116,9 (C16); 120,8 (C4'); 121,1 (C5'), 122,2 (C6); 124,3 (C3a); 126,6 (C6'); 134,0 (C3'); 139,9 (C7a); 140,9 (C5); 150,6 (C17); EI-MS *m/z* (%): 388 (100) M<sup>+</sup>, 373 (35), 237 (29), 195 (24), 181 (14), 157 (26), 119 (22), 91 (17); EA: calculado para C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O: C 80,37; H 8,30; N 7,21; encontrado: C 80,46; H 8,07; N 7,00.

### 1.1.5 Síntese do 17-(1*H*-indazol-1-il)androsta-4,16-dien-3-ona (193)

Num balão de fundo redondo de 100 ml juntou-se composto **192** (0,47 g; 1,21 mmoles), *N*-metilpiperidona (1,7 ml) e tolueno (28 ml). Aqueceu-se a mistura a refluxo e recolheu-se uma fracção de destilado (c. a. 10 ml), com a ajuda de um aparelho Dean-Stark. Adicionou-se isopropóxido de alumínio (0,45 g; 2,22 mmoles) e a mistura foi deixada a refluxo, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. O controlo de reacção por TLC (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C 9:1) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 5 horas, tendo o substrato sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de R<sub>f</sub> 0,5 e com absorção UV. A mistura de reacção foi concentrada com a ajuda de um evaporador rotativo. Ao pó resultante juntou-se em acetato de etilo (50 ml) e água (20 ml) e esta mistura ficou sob agitação magnética durante cerca de duas horas. A fase aquosa foi novamente extraída com acetato de etilo (2 × 100 ml). A fase orgânica total foi lavada com HCl 5% aquoso (50 ml), NaHCO<sub>3</sub> 10% aquoso (50 ml), água (50 ml), seca com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada à secura, obtendo-se o composto **193** (0,39 g; 83%), que foi posteriormente recristalizado de acetona/*n*-hexano.

P.f. 196-197 °C; IR 1621, 1672 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 1,20 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 1,24 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 5,76 (brs, 1H, 4-H); 5,85 (m, 1H, 16-H); 7,17 (m, 1H, 6'-H); 7,40 (m, 1H, 5'-H); 7,64 (m, 1H, 4'-H); 7,74 (m, 1H, 7'-H); 8,07 (brs, 1H, 3'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 111,2 (C7'); 116,3 (C16); 120,8 (C4'); 121,2 (C5'); 123,9 (C4); 124,3 (C3a); 126,7 (C6'); 134,0 (C3'); 139,8 (C7a); 150,4 (C17); 171,0 (C5); 199,5 (C3); EI-MS *m/z* (%): 386 (100) M<sup>+</sup>, 371 (75), 253 (22), 211 (16), 183 (21), 157 (30), 119 (18), 81 (14); HRMS: calculado 387,2431 (C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>OH<sup>+</sup>), encontrado 387,2435.

### 1.1.6 Síntese do acetato de 17-(2*H*-indazol-2-il)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (**194**)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em **1.1.3** mas usando o composto **190** (0,70 g; 1,53 mmoles), cloreto de carbonilobis(trifenilfosfina) ródio(I) (0,19 g; 0,27 mmoles), 1,1,3,3-tetrafenilfosfinopropano (0,24 g; 0,58 mmoles) em xilenos seco (55 ml). O controlo da reacção por TLC (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C 7:3) mostrou que, ao fim de 4 dias, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de R<sub>f</sub> 0,5 e com absorção UV. Após isolamento, conforme descrito em **1.1.3**, o óleo resultante foi submetido a cromatografia *flash* (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C 7:3) tendo-se obtido o composto **194** (0,31 g; 47%), que foi posteriormente recristalizado de acetona.

P. f. 144-146 °C; IR 1243, 1620, 1728 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  1,09 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 1,19 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, 3 $\beta$ -OAc); 4,62 (m, 1H, 3 $\alpha$ -H); 5,43 (m, 1H, 6-H); 6,14 (m, 1H, 16-H); 7,06 (m, 1H, 6'-H); 7,27 (m, 1H, 5'-H); 7,64 (m, 1H, 7'-H); 7,71 (m, 1H; 4'-H); 8,11 (brs, 1H, 3'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  73,7 (C3); 117,7 (C7'); 120,0 e 120,1 (C16 e C4'); 121,2 (C3'); 121,7 (C7a); 122,0 e 122,1 (C6 e C6'); 126,4 (C5'); 140,1 (C5); 148,9 (C3a); 151,7 (C17); 170,5 (CH<sub>3</sub>C=O); EI-MS *m/z* (%): 430 (14) M<sup>+</sup>, 370 (100), 355 (56), 209 (18), 195 (24), 157 (57), 105 (16), 91 (13); EA: calculado para C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C 78,10; H 7,96; N 6,51; encontrado: C 78,50; H 7,60; N 6,20.

### 1.1.7 Síntese do 17-(2*H*-indazol-2-il)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ol (195)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em **1.1.4** mas usando o composto **194** (0,26 g; 0,59 mmoles), MeOH (4 ml), e KOH (10%) em MeOH (1,6 ml). O controlo da reacção por TLC (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C 7:3) mostrou que, ao fim de 1 hora, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de Rf 0,2 e com absorção UV. Após isolamento, conforme descrito em **1.1.4**, o óleo resultante foi submetido a cromatografia *flash* (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C 7:3) tendo-se obtido o composto **195** (0,22 g; 94%), que foi posteriormente recristalizado de acetonitrilo/THF.

P.f. 224-226 °C; IR 1629, 3352 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  1,08 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 1,19 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 3,55 (m, 1H, 3 $\alpha$ -H); 5,40 (m, 1H, 6-H); 6,17 (m, 1H, 16-H); 7,07 (m, 1H, 6'-H); 7,27 (m, 1H, 5'-H); 7,64 (m, 1H, 7'-H); 7,71 (m, 1H; 4'-H); 8,11 (brs, 1H, 3'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  71,6 (C3); 117,6 (C7'); 120,1 e 120,2 (C16 e C4'); 121,1 e 121,2 (C3' e C6); 121,7 (C7a); 122,0 (C6'); 126,5 (C5'); 141,2 (C5); 148,9 (C3a); 151,7 (C17); EI-MS *m/z* (%): 388 (100) M<sup>+</sup>, 373 (68), 369 (23), 223 (22), 209 (26), 195 (32), 181 (18), 157 (86); EA: calculado para C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O: C 80,37; H 8,30; N 7,21; encontrado: C 80,20; H 8,16; N 7,15.

### 1.1.8 Síntese do 17-(2*H*-indazol-2-il)androsta-4,16-dien-3-ona (196)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em **1.1.5** mas usando o composto **195** (0,45 g; 1,16 mmoles), *N*-metilpiperidona (1,7 ml), tolueno (28 ml) e isopropóxido de alumínio (0,45 g; 2,22 mmoles). O controlo da reacção por TLC (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C 9:1) mostrou que, ao fim de 5 horas, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de R<sub>f</sub> 0,3 e com absorção UV. Após isolamento, conforme descrito em **1.1.5**, o óleo resultante foi submetido a cromatografia *flash* (eluente: clorofórmio – éter de petróleo 40-60 °C 7:3) tendo-se obtido o composto **196** (0,37 g; 83%), que foi posteriormente recristalizado de acetona.

P. f. 169-172 °C; IR 1629, 1674 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) δ 1,20 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 1,23 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 5,75 (brs, 1H, 4-H); 6,12 (m, 1H, 16-H); 7,06 (m, 1H, 6'-H); 7,26 (m, 1H, 5'-H); 7,63 (m, 1H, 7'-H); 7,70 (m, 1H; 4'-H); 8,10 (brs, 1H, 3'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150,8 MHz) δ 117,7 (C7'); 119,6 (C16); 120,1 (C4'); 121,1 (C3'); 121,7 (C7a); 122,1 (C6'); 124,5 (C4); 126,4 (C5'); 148,9 (C3a); 151,6 (C17); 170,6 (C5); 199,3 (C3); EI-MS *m/z* (%): 386 (72) M<sup>+</sup>, 371 (62), 223 (39), 195 (36), 157 (100), 145 (25), 119 (35), 91 (42); HRMS: calculado 387,2431 (C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>OH<sup>+</sup>), encontrado 387,2431.

## 1.2 C17 Carbamatos derivados do 2'-metilimidazole

### 1.2.1 Síntese do (2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxoandrost-4-en-17β-ilo (202)

Num balão de fundo redondo colocou-se testosterona **6** (0,20 g; 0,69 mmoles), CBMI (0,21 g; 1,11 mmoles) e acetonitrilo seco (6,6 ml). A mistura foi levada a refluxo, com agitação magnética, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. O controlo de reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 24 horas, tendo o substrato sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de R<sub>f</sub> 0,3 e com absorção UV. Adicionou-se água (30 ml) à mistura final de reacção e o precipitado resultante foi dissolvido em éter etílico (80 ml). A fase aquosa foi extraída com éter etílico (2 × 30 ml). A fase orgânica total foi lavada com água (10 ml), solução saturada de NaCl (10 ml), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada à secura, obtendo-se o composto **202** (0,22 g; 82%), que foi posteriormente recristalizado de acetato de etilo/*n*-hexano.

P.f. 200-203 °C; IR 1142, 1300, 1613, 1663, 1757 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) δ 0,91 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 1,17 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 2,61 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>); 4,78 (m, 1H, 17α-H); 5,70 (brs, 1H, 4-H); 6,83 (brs, 1H, 4'-H); 7,31 (brs, 1H, 5'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150,8 MHz) δ 86,4 (C17); 118,0 (C5'); 124,0 (C4); 127,5 (C4'); 147,8 (C2'); 149,3 (OCO); 170,4 (C5); 199,2 (C3). EI-MS m/z (%): 396 (32) M<sup>+</sup>, 271 (52), 253 (100), 157 (34), 147 (60), 119 (34), 105 (44), 91 (38); EA: calculado para C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C 72,70; H 8,47; N 7,06; encontrado: C 72,60; H 8,47; N 7,24.



### 1.2.2 Síntese do (2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxoandrosta-1,4,6-trien-17β-ilo (203)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em 1.2.1 mas usando 17β-hidroxiandrosta-1,4,6-trien-3-ona **197** (0,04 g; 0,14 mmoles), CBMI (0,04 g; 0,22 mmoles) em acetonitrilo seco (1,3 ml). Após 15 horas de reacção, adicionou-se mais CBMI (0,02 g; 0,11 mmoles). O controlo da reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de mais 5 horas, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de R<sub>f</sub> 0,4 e com absorção UV. Após isolamento, conforme descrito em 1.2.1, obteve-se o composto **203** (0,05 g; 88%), que foi posteriormente recristalizado de acetona.

P. f. 199-201 °C; IR 1143, 1301, 1600, 1646, 1758 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 1,04 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 1,23 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 2,77 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>); 4,87 (m, 1H, 17α-H); 6,01 (m, 1H, 2-H); 6,02 (brs, 1H, 4-H); 6,28 (m, 2H, 6-H e 7-H); 6,70 (brs, 1H, 4'-H); 7,06 (d, *J* = 10,2 Hz, 1H, 1-H); 7,41 (brs, 1H, 5'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 85,8 (C17); 118,0 (C5'); 124,0 (C4); 127,8, 128,1 e 128,2 (C2, C6 e C4'); 136,6 (C7); 147,8 (C2'); 149,3 (OCO); 152,6 (C1); 161,9 (C5); 186,2 (C3). EI-MS *m/z* (%): 392 (34) M<sup>+</sup>, 267 (34), 171 (100), 159 (51), 145 (46), 128 (35), 121 (10), 83 (25); EA: calculado para C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C 73,44; H 7,19; N 7,14; encontrado: C 73,80; H 7,56; N 6,80.

### 1.2.3 Síntese do (2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxoandrosta-4,6-dien-17β-ilo (204)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em 1.2.1 mas usando 17β-hidroxiandrosta-4,6-dien-3-ona **198** (0,03 g; 0,17 mmoles), CBMI (0,04 g; 0,22 mmoles) em acetonitrilo seco (1,3 ml). Após 15 e 22 horas de reacção, adicionou-se mais CBMI (0,02 g; 0,11 mmoles) e (0,02 g; 0,11 mmoles). O controlo da reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de mais 15 horas, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de R<sub>f</sub> 0,3 e com absorção UV. Após isolamento, conforme descrito em 1.2.1, obteve-se o composto **204** (0,04 g; 82%), que foi posteriormente recristalizado de acetona.

P.f. 185-186 °C; IR 1143, 1302, 1617, 1659, 1753 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 1,01 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 1,14 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 2,78 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>); 4,89 (m, 1H, 17α-H); 5,70 (brs, 1H, 4-H); 6,30 (m, 2H, 6-H e 7-H); 7,00 (brs, 1H, 4'-H); 7,41 (brs, 1H, 5'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 86,0 (C17); 118,0 (C5'); 123,9 (C4); 127,7 e 128,4 (C6 e C4'); 139,3 (C7); 147,8 (C2'); 149,3 (OC<sub>2</sub>O); 163,2 (C5); 199,5 (C3). EI-MS m/z (%): 394 (48) M<sup>+</sup>, 269 (100), 251 (35), 213 (32), 173 (89), 145 (64), 117 (28), 81 (36); EA: calculado para C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C 73,07; H 7,66; N 7,10; encontrado: C 72,90; H 7,96; N 7,24.

#### 1.2.4 Síntese do (2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxo-5 $\alpha$ -androst-17 $\beta$ -ilo (205)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em 1.2.1 mas usando 17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona **199** (0,10 g; 0,34 mmoles), CBMI (0,10 g; 0,55 mmoles) em acetonitrilo seco (5 ml). Após 29 horas de reacção, adicionou-se mais CBMI (0,03 g; 0,17 mmoles). O controlo da reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de mais 31 horas, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de Rf 0,7 e com absorção UV. Após isolamento, conforme descrito em 1.2.1, obteve-se o composto **205** (0,10 g; 94%), que foi posteriormente recristalizado de acetonitrilo.

P. f. 195-196 °C; IR 1152, 1282, 1710, 1744 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  0,92 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 1,04 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 2,66 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>); 4,80 (m, 1H, 17 $\alpha$ -H); 6,88 (brs, 1H, 4'-H); 7,36 (brs, 1H, 5'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  86,8 (C17); 118,1 (C5'); 127,5 (C4'); 147,8 (C2'); 149,4 (OCO); 211,7 (C3). EI-MS m/z (%): 398 (24) M<sup>+</sup>, 273 (36), 255 (100), 159 (37), 123 (46), 107 (42), 81 (52), 79 (43); EA: calculado para C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C 72,33; H 8,60; N 7,03; encontrado: C 72,16; H 8,74; N 7,31.

#### 1.2.5 Síntese do (2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxoandrosta-1,4-dien-17 $\beta$ -ilo (206)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em 1.2.1 mas usando 17 $\beta$ -hidroxiandrosta-1,4-dien-3-ona **200** (0,40 g; 1,4 mmoles), CBMI (0,53 g; 2,79 mmoles) em diclorometano (14 ml). O controlo da reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de 28 horas, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de Rf 0,2 e com

absorção UV. Após isolamento, conforme descrito em **1.2.1**, obteve-se o composto **206** (0,40 g; 73%), que foi posteriormente recristalizado de etanol.

P.f. 165-167 °C; IR 1149, 1280, 1625, 1664, 1761  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  0,98 (s, 3H, 18- $\text{H}_3$ ); 1,26 (s, 3H, 19- $\text{H}_3$ ); 2,66 (s, 3H, 2'- $\text{CH}_3$ ); 4,79 (m, 1H, 17 $\alpha$ -H); 6,09 (brs, 1H, 4-H); 6,24 (dd,  $J_1 = 10,2$  Hz e  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H, 2-H); 6,88 (brs, 1H, 4'-H); 7,05 (d,  $J = 10,2$  Hz, 1H, 1-H); 7,35 (brs, 1H, 5'-H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  86,2 (C17); 118,0 (C5'); 124,0 (C4); 127,6 e 127,8 (C2 e C4'); 147,8 (C2'); 149,4 ( $\text{OCO}$ ); 155,4 (C1); 168,5 (C5); 186,2 (C3). EI-MS  $m/z$  (%): 394 (36)  $\text{M}^+$ , 229 (10), 173 (37); 147 (80), 122 (73), 91 (76), 83 (100), 81 (22); EA: calculado para  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$ : C 73,07; H 7,66; N 7,10; encontrado: C 73,26; H 7,60; N 7,25.

### 1.2.6 Síntese do (2'-metil-1H-imidazol-1-il)carboxilato de 3-oxo-5 $\alpha$ -androst-1-en-17 $\beta$ -ilo (207)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em **1.2.1** mas usando 17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androst-1-en-3-ona **201** (0,08 g; 0,28 mmoles), CBMI (0,15 g; 0,79 mmoles) em diclorometano seco (2,6 ml). O controlo da reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de 5 horas, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de Rf 0,2 e com absorção UV. Após isolamento, conforme descrito em **1.2.1**, obteve-se o composto **207** (0,09 g; 84%), que foi posteriormente recristalizado de etanol.

P.f. 212-214 °C; IR 1152, 1283, 1674, 1745  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$  0,92 (s, 3H, 18- $\text{H}_3$ ); 1,02 (s, 3H, 19- $\text{H}_3$ ); 2,65 (s, 3H, 2'- $\text{CH}_3$ ); 4,80 (m, 1H, 17 $\alpha$ -H); 5,85 (d,  $J = 10,2$  Hz, 1H, 2-H); 6,86 (brs, 1H, 4'-H); 7,11 (d,  $J = 10,2$  Hz, 1H, 1-H); 7,34 (brs, 1H, 5'-H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150,8 MHz)  $\delta$  86,8 (C17); 118,3 (C5'); 127,7 (C4') e 127,8 (C2); 147,1 (C2'); 149,6 ( $\text{OCO}$ ); 158,0

(C1); 200,1 (C3). EI-MS m/z (%): 396 (16) M<sup>+</sup>, 271 (14), 161 (26), 121 (31), 107 (100), 95 (54), 81 (31), 79 (26); EA: calculado para C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C 72,70; H 8,13; N 7,06; encontrado: C 72,05; H 8,51; N 7,20.

### 1.2.7 Síntese do acetato de 17β-hidroxiandrost-5-en-3β-ilo (208)

Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveu-se acetato de DHEA **186** (0,10 g; 0,30 mmoles) em THF/metanol 1:1 (2 ml), à temperatura ambiente. Arrefeceu-se depois a mistura em banho de gelo e fez-se a adição de NaBH<sub>4</sub> (0,03 g; 0,79 mmoles). O controlo da reacção por TLC (acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de 1 hora, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de R<sub>f</sub> 0,5. A reacção foi parada por adição de acetona, gota-a-gota. A mistura de reacção foi concentrada com a ajuda de um evaporador rotativo. Ao pó resultante juntou-se acetato de etilo (20 ml) e água (6 ml) e esta mistura ficou sob agitação magnética durante cerca de duas horas. A fase aquosa foi novamente extraída com acetato de etilo (2 × 30 ml). A fase orgânica total foi lavada com NaHCO<sub>3</sub> 10% aquoso (10 ml), água (10 ml), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada à secura, obtendo-se o composto **208** (0,08 g; 82%) que foi posteriormente recristalizado de metanol/água.

P. f. 144-147 °C; IR 1716, 3423 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 0,76 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 1,04 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, 3β-OAc); 3,65 (m, 1H, 17α-H); 4,60 (m, 1H, 3α-H); 5,37 (m, 1H, 6-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 73,7 (C3); 81,4 (C17); 122,1 (C6); 139,5 (C5); 170,4 (CH<sub>3</sub>C=O); EI-MS m/z (%): 331 (2) M<sup>+</sup>, 272 (100), 239 (56), 183 (26), 143 (45), 105 (44), 91 (54), 79 (40); EA: calculado para C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>: C 75,86; H 9,70; encontrado: C 75,50; H 9,70.

### 1.2.8 Síntese do (2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)carboxilato de 3β-acetoxiandrost-5-en-17β-ilo (209)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em 1.2.1 mas usando o composto **208** (0,60 g; 1,71 mmoles), CBMI (0,66 g; 3,45 mmoles) em acetonitrilo seco (15 ml). O controlo da reacção por TLC (acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de 29 horas, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de R<sub>f</sub> 0,2 e com absorção UV. Após isolamento, conforme descrito em 1.2.1, obteve-se o composto **209** (0,61 g; 81%), que foi posteriormente recristalizado de acetato de etilo/*n*-hexano.

P.f. 151-152 °C; IR 1147, 1302, 1725, 1750 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 0,92 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 1,05 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, 3β-OAc); 2,67 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>); 4,61 (m, 1H, 3α-H); 4,80 (m, 1H, 17α-H); 5,39 (m, 1H, 6-H); 6,87 (brs, 1H, 4'-H); 7,36 (brs, 1H, 5'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 73,7 (C3); 86,8 (C17); 118,1 (C5'); 122,0 (C6); 127,5 (C4'); 139,7 (C5); 147,8 (C2'); 149,4 (OCO); 170,5 (CH<sub>3</sub>CO). EI-MS m/z (%): 440 (8) M<sup>+</sup>, 380 (100), 255 (78), 145 (65), 129 (89), 91 (56), 81 (72), 67 (46); EA: calculado para C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C 70,88; H 8,24; N 6,36; encontrado: C 70,58; H 8,42; N 6,75.

### 1.2.9 Síntese do 5α-androstan-17β-ol (210)

Os detalhes da síntese destes compostos foram previamente descritos na literatura.<sup>6</sup> Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveu-se 17β-hidroxi-5α-androstan-3-ona **199** (0,40 g; 1,38 mmoles) em ácido acético glacial (24 ml) a 70 °C, sob agitação magnética. De seguida, adicionou-se zinco (3,20 g; 50 mmoles). O controlo da reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de 3 horas, o substrato de partida tinha sido

completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de Rf 0,8. A mistura de reacção foi filtrada por uma placa com celite, sob sucção e lavada com ácido acético e éter etílico. A solução resultante foi evaporada à securo com a ajuda de um evaporador rotativo. Ao pó resultante juntou-se éter etílico (150 ml) e água (50 ml) e esta mistura ficou sob agitação magnética durante cerca de duas horas. A fase aquosa foi novamente extraída com éter etílico (2 × 30 ml). A fase orgânica total foi lavada com NaHCO<sub>3</sub> 10% aquoso (20 ml), água (20 ml), seca com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada à securo, obtendo-se o composto **210** (0,37 g; 97%), que foi posteriormente recristalizado de acetato de etilo/*n*-hexano.

P. f. 150-152 °C; IR 3264 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 0,73 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 0,79 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 3,62 (m, 1H, 17α-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 82,0 (C17).

#### 1.2.10 Síntese do (2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)carboxilato de 5α-androst-17β-ilo (**211**)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em **1.2.1** mas usando o composto **210** (0,38 g; 1,37 mmoles), CBMI (0,52 g; 2,74 mmoles) em diclorometano seco (14 ml). Após 27 horas de reacção, adicionou-se mais CBMI (0,10 g; 0,53 mmoles). O controlo da reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de mais 29 horas, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de Rf 0,7 e com absorção UV. Após isolamento, conforme descrito em **1.2.1**, o produto obtido foi purificado por cromatografia *flash* (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1), obtendo-se o composto **211** (0,38 g; 73%), que foi posteriormente recristalizado de acetona.

P. f. 112-115 °C; IR 1149, 1273, 1751 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 0,80 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 0,89 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 2,66 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>); 4,78 (m, 1H, 17α-H); 6,87 (brs, 1H, 4'-H); 7,35 (brs, 1H,

5'-H);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  87,1 (C17); 118,1 (C5'); 127,3 (C4'); 147,8 (C2'); 149,4 (OCO). EI-MS  $m/z$  (%): 384 (14)  $\text{M}^+$ , 259 (73), 163 (69), 149 (100), 135 (52), 121 (47), 81 (71), 67 (56); EA: calculado para  $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2$ : C 74,96; H 9,44; N 7,28; encontrado: C 74,66; H 9,82; N 7,00.

### 1.2.11 Síntese do 3 $\beta$ -[[*(t*-butil)dimetilsilil]oxi]androst-5-en-17-ona (**212**)

Os detalhes da síntese destes compostos foram previamente descritos na literatura.<sup>7</sup> Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveu-se DHEA **4** (0,50 g; 1,73 mmoles) em DMF seca (7,5 ml), à temperatura ambiente, sob agitação magnética, em atmosfera de  $\text{N}_2$ . De seguida adicionou-se TBDMSCl (0,34 g; 2,26 mmoles), DMAP (0,01 g; 0,11 mmoles) e trietilamina (0,34 ml). Após 3 horas e 30 minutos adicionou-se mais TBDMSCl (0,15 g; 1 mmole), DMAP (0,06 g; 0,05 mmoles) e trietilamina (0,15 ml). O controlo da reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de mais 2 horas e 30 minutos, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. A água (50 ml) sob forte agitação magnética adicionou-se a mistura de reacção. Extraíu-se a fase aquosa resultante com éter etílico (3  $\times$  30 ml). A fase orgânica total foi lavada com  $\text{NaHCO}_3$  10% aquoso (20 ml), água (20 ml), seca com  $\text{MgSO}_4$  anidro, filtrada e evaporada à secura, obtendo-se o composto **212** (0,60 g; 86%), que foi posteriormente recristalizado de acetato de etilo/*n*-hexano.

P. f. 137-140 °C; IR 1744  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  0,06 [s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ]; 0,88 (s, 3H, 18- $\text{H}_3$ ); 0,89 [s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ]; 1,02 (s, 3H, 19- $\text{H}_3$ ); 3,49 (m, 1H, 3 $\alpha$ -H); 5,35 (m, 1H, 6-H);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  72,4 (C3); 120,4 (C6); 141,7 (C5); 221,2 (C17).



### 1.2.12 Síntese do 3 $\beta$ -[[*t*-butil]dimetilsilil]oxi]androst-5-en-17 $\beta$ -ol (213)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em **1.2.7** mas usando o composto **212** (0,84 g; 2,10 mmoles), THF/metanol 1:1 (16,8 ml) e NaBH<sub>4</sub> (0,21 g; 5,50 mmoles). O controlo da reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de 30 minutos, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de Rf 0,7. Após isolamento, conforme descrito em **1.2.7**, obteve-se o composto **213** (0,81 g; 96%), que foi posteriormente recristalizado de acetato de etilo/*n*-hexano.

P. f. 165-167 °C; IR 3277 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  0,06 [s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si]; 0,76 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 0,89 [s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C]; 1,01 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 3,48 (m, 1H, 3 $\alpha$ -H); 3,65 (m, 1H, 17 $\alpha$ -H); 5,32 (m, 1H, 6-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  72,5 (C3); 81,9 (C17); 120,8 (C6); 141,6 (C5). EI-MS m/z (%): 404 (2) M<sup>+</sup>, 347 (100), 329 (38), 253 (41), 199 (21), 159 (34), 105 (30), 75 (40); EA: calculado para C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>Si; C 74,19; H 10,96; encontrado: C 74,30; H 10,70.

### 1.2.13 Síntese do (2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)carboxilato de 3 $\beta$ -[[*t*-butil]dimetilsilil]oxi]androst-5-en-17 $\beta$ -ilo (214)

A reacção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em **1.2.1** mas usando o composto **213** (0,12 g; 0,29 mmoles), CBMI (0,09 g; 0,46 mmoles) numa mistura de acetonitrilo seco (3,8 ml) e 1,2-dicloroetano (2 ml). Após 63 e 69 horas de reacção, adicionou-se mais CBMI (0,02 g; 0,11 mmoles) e (0,05 g; 0,29 mmoles), respectivamente. O controlo da reacção por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 1:2) mostrou que, ao fim de 3 horas, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de

reação de Rf 0,4 e com absorção UV. Após isolamento, conforme descrito em **1.2.1**, obteve-se o composto **214** (0,12 g; 79%), que foi posteriormente recristalizado de acetato de etilo/*n*-hexano.

P. f. 146-147 °C; IR 1148, 1308, 1761 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 0,06 [s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si]; 0,89 [s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C]; 0,91 (s, 3H, 18-H<sub>3</sub>); 1,02 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>); 2,78 (s, 3H, 2'-CH<sub>3</sub>); 3,49 (m, 3α-H); 4,83 (m, 1H, 17α-H); 5,33 (m, 1H, 6-H); 6,99 (brs, 1H, 4'-H); 7,40 (brs, 1H, 5'-H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 72,4 (C3); 86,9 (C17); 118,1 (C5'); 120,5 (C6); 127,3 (C4'); 141,6 (C5); 147,8 (C2'); 149,4 (OCO). EI-MS m/z (%): 513 (2) M<sup>+</sup>, 455 (51), 329 (26), 253 (32), 157 (51), 145 (31), 105 (26), 91 (46); EA: calculado para C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>i</sub>:. C 70,27; H 9,43; N 5,46; encontrado: C 70,00; H 9,42; N 5,60.

#### **1.2.14 Síntese do (2'-metil-1*H*-imidazol-1-il)carboxilato de 3β-hidroxiandrost-5-en-17β-ilo (215)**

Num balão de reação de 100 ml preparou-se uma solução de composto **214** (1,00 g; 1,95 mmoles) em etanol (25 ml), à temperatura ambiente. Adicionou-se água (45 μl) e TMSCl (60 μl; 0,5 mmoles). O pH resultante foi 5. A cada 30 minutos foi feita adição de água (22,5 μl) e TMSCl (30 μl; 0,25 mmoles) num total de 7 adições até pH de 1. O controlo da reação por TLC (eluente: acetato de etilo – éter de petróleo 40-60 °C 2:1) mostrou que, ao fim de 3 horas e 30 minutos, o substrato de partida tinha sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reação de Rf 0,2 e com absorção UV. A reação foi suspensa por neutralização com NaHCO<sub>3</sub>. A mistura de reação foi concentrada com a ajuda de um evaporador rotativo. Ao pó resultante juntou-se em acetato de etilo (250 ml) e água (50 ml) e esta mistura ficou sob agitação magnética durante cerca de duas horas. A fase aquosa foi novamente extraída com acetato de etilo (2 × 50 ml). A fase orgânica total foi lavada com água (35 ml), seca com MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada à secura. O produto final foi submetido a cromatografia *flash* (eluente: acetato de etilo –

éter de petróleo 40-60 °C 2:1), obtendo-se o composto **215** (0,35 g; 30%), que foi posteriormente recristalizado de THF.

P. f. 181-183 °C; IR 1146, 1300, 1757, 3262  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  0,92 (s, 3H, 18- $\text{H}_3$ ); 1,04 (s, 3H, 19- $\text{H}_3$ ); 2,67 (s, 3H, 2'- $\text{CH}_3$ ); 3,54 (m, 1H, 3 $\alpha$ -H); 4,81 (m, 1H, 17 $\alpha$ -H); 5,36 (m, 1H, 6-H); 6,88 (brs, 1H, 4'-H); 7,36 (brs, 1H, 5'-H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  71,5 (C3); 87,0 (C17); 118,1 (C5'); 121,0 (C6); 127,1 (C4'); 140,9 (C5); 147,6 (C2'); 149,3 (OCO). EI-MS m/z (%): 398 (4)  $\text{M}^+$ , 272 (76), 239 (100), 205 (86), 145 (70), 131 (58), 105 (86), 91 (72), EA: calculado para  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$ : C 72,33; H 8,60; N 7,03; encontrado: C 72,60; H 8,93; N 6,80.

## 2. Avaliação biológica dos compostos sintetizados

As linhas celulares LNCaP e PC-3 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (Rockville, MD). As células 293T foram oferecidas pelo Dr. Yun Qiu (UMB, Maryland) e as LAPC4 pelo Dr. Charles Sawyers (UCLA School of Medicine).

Os meios de cultura RPMI 1640 e DMEM, com e sem vermelho de fenol, e Opti-MEM, a solução salina DPBS, a solução de tripsina-EDTA (0,25% m/v) e a solução de penicilina/estreptomicina (P/E) (10,000U penicilina e 10,000 µg/ml estreptomicina) foram adquiridas à Gibco-BRL. O soro fetal bovino (FBS) original e tratado com carvão activado foi obtido da Biofluids Inc. A poli-*L*-lisina, o acetono de triancinolona, o cetoconazol, a DHT e o MTT foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. O Casodex<sup>®</sup> foi gentilmente cedido pela Astra-Zeneca Inc. O líquido Scintiverse BD Cocktail foi comprado à Fisher Scientific. O VN/85-1 foi preparado como descrito previamente na literatura.<sup>3</sup> O androgéneo sintético metiltrienolona [<sup>3</sup>H]R1881, com actividade específica 72 Ci/mole, foi comprado à Perkin-Elmer. A [21-<sup>3</sup>H<sub>3</sub>]-17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, com uma actividade específica 13,61 µCi/µmole, foi preparada conforme a literatura.<sup>8</sup>

O kit de transfecção de fosfato de cálcio (Promega Profection Mammalian Transfection System), o kit para o ensaio da luciferase (Dual Luciferase kit) e o reagente de lipofectamina (Lipofectamine 2000 Reagent) foram adquiridos à Promega. O kit Tox-2 (teste do XTT) foi comprado à Sigma-Aldrich Co. O plasmídeo recombinante *pCDNA3Hmod17(His)<sub>4</sub>* foi desenhado como descrito na literatura<sup>9</sup> O plasmídeo recombinante *ARR<sub>2</sub>-Luc* foi construído por inserção do promotor *ARR<sub>2</sub>*, no “*multiple cloning site*” (MCS) do vector pGL3 (Promega).<sup>10</sup> O vector pRL-null (Promega) foi usado como controlo interno.

As medições de radioactividade foram feitas num leitor Tri-Carb 2100 TR. As leituras de absorvância e luminescência foram feitas num contador Victor 1420.

## 2.1 Considerações gerais

As células 293T e 293T-CYP17 foram mantidas durante a rotina do trabalho em DMEM adicionado de 10% (v/v) FBS e 1% (v/v) P/E. As células LNCaP e PC-3 foram mantidas em RPMI 1640 adicionado de 10% (v/v) FBS e 1% (v/v) P/E. As células LAPC4 foram mantidas em RPMI 1640 com 15% (v/v) FBS, 1% (v/v) P/E e 10 nM de DHT. As células são aderentes e cresceram em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, Inc. Corning, NY), sendo mantidas numa incubadora à temperatura de 37 °C, em atmosfera humidificada (90% humidade) e com 5% de dióxido de carbono.

O procedimento geral para tratamento das placas usadas nos ensaios com 293T, LNCaP e LAPC4, com poli-*L*-lisina, é o que se descreve a seguir. Foi preparada uma solução de poli-*L*-lisina em DPBS (0,01 mg/ml). A cada placa foi adicionada uma quantidade desta solução suficiente para cobrir na totalidade o fundo dos poços e deixou-se as placas em repouso durante 5 minutos, à temperatura ambiente. De seguida, lavaram-se as placas com água desionizada e esterilizada por duas vezes e deixaram-se secar, à temperatura ambiente, por 2 horas.

## 2.2 Inibição da CYP17 (Componente liase)

As células 293T foram semeadas em placas de 100 mm, em DMEM, com uma densidade suficiente para atingir cerca de 60% de confluência no dia seguinte, para a transfecção. Cerca de 3 horas antes da transfecção, renovou-se o meio nas placas. O seguinte procedimento refere-se às quantidades usadas para a transfecção por placa de 100 mm. Num *ependorf*, adicionou-se *pCDNA3Hmod17(His)<sub>4</sub>* (10 µg), água desionizada e esterilizada (413 µl) e a solução foi ligeiramente agitada no vórtex. Em seguida, adicionou-se uma solução de CaCl<sub>2</sub> (62 µl; 2M) e a mistura ficou em repouso, à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Esta mistura foi adicionada

gota-a-gota a um *ependorf* contendo tampão HEPES (500  $\mu$ l) sob ligeira agitação e deixada a incubar à temperatura ambiente 30 minutos, antes de ser agitada no vórtex de novo e gotejada para a placa de 100 mm. Após incubação a 37 °C, o meio de cultura foi mudado 18 horas após a transfecção e a actividade enzimática foi avaliada como de seguida se descreve, num total de 48 horas após a transfecção.

As células transfectadas 293T-CYP17 cresceram até 80% de confluência e foram depois divididas igualmente em placas de 6 poços. No dia seguinte foram lavadas com DPBS e incubadas com DMEM sem vermelho de fenol (contendo 5% v/v de FBS tratado com carvão activado e 1% v/v de P/E) e uma concentração de saturação de [21-<sup>3</sup>H<sub>3</sub>]-17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona. Adicionaram-se os compostos a testar nas concentrações desejadas e deixaram-se as placas a incubar 18 horas a 37°C. Para controlo usou-se apenas meio radioactivo. Para os compostos **191-196** foi usado dimetilsulfóxido (DMSO) (1%) como veículo. Para avaliação dos restantes compostos usou-se EtOH (1%).

Os esteróides foram posteriormente extraídos com clorofórmio e deixados a 4°C, durante 2 horas. A fase aquosa foi recolhida e adicionada de uma suspensão de carvão activado (2,5% m/v). Após uma incubação de 30 minutos a 4°C, foi recolhida uma alíquota do sobrenadante e adicionada ao líquido de leitura para medição da radioactividade. Cada leitura final representa a média de pelo menos 3 poços diferentes. Os compostos com actividade inibitória foram seleccionados para determinação do IC<sub>50</sub>. Os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos directamente de um gráfico que expressa a percentagem de inibição contra a concentração de inibidor testada numa gama de valores apropriada a cada caso, usando o software Graphpad Prism v. 4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Cada composto foi testado a um mínimo de 7 concentrações diferentes para este efeito.

### 2.3 Ligação ao receptor de androgénio

As células LNCaP ou LAPC4 foram transferidas para meio RPMI sem vermelho de fenol (com 5% v/v de FBS tratado com carvão activado e 1% v/v de P/E) 3 dias antes de se iniciar a experiência. Semearam-se cerca de 2 a  $3 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços. No dia seguinte o meio foi substituído por RPMI sem vermelho de fenol (com 1% v/v P/E) e uma concentração de saturação de metiltrienolona [ $^3\text{H}$ ]R1881 (5 nM), acetónico de triancinolona (1  $\mu\text{M}$ ) e as concentrações desejadas de composto a testar. Para controlo usou-se meio com [ $^3\text{H}$ ]R1881 (5 nM) e acetónico de triancinolona (1  $\mu\text{M}$ ). A ligação inespecífica foi determinada usando DHT (2  $\mu\text{M}$ ). Para os compostos **191-196** foi usado DMSO (1%) como veículo. Para avaliação dos restantes compostos usou-se EtOH (1%).

Após um período de incubação de 2 horas a 37°C, as células foram lavadas com DPBS arrefecido e solubilizadas em DPBS contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) (0,5% m/v) e glicerol (20% v/v). Recolheram-se alíquotas e adicionou-se líquido de leitura para medição da radioactividade. Cada leitura final representa a média de pelo menos 3 poços diferentes. Os compostos com actividade inibitória foram seleccionados para determinação do  $\text{EC}_{50}$ . Para determinar os valores de  $\text{EC}_{50}$  de cada composto, usou-se um mínimo de 8 concentrações. Os valores de  $\text{EC}_{50}$  foram determinados por regressão não linear com o software Graphpad Prism v. 4.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

### 2.4 Efeito na transcrição mediada pelo receptor de androgénio mutado

As células LNCaP ou LAPC4 foram transferidas para meio RPMI sem vermelho de fenol (com 5% v/v de FBS tratado com carvão activado e 1% v/v de P/E) 3 dias antes de se iniciar a experiência. As células foram semeadas ( $1 \times 10^5$  células por poço) em RPMI sem vermelho de

fenol (com 5% v/v de FBS tratado com carvão activado e 1% v/v de P/E), em placas de 24 poços. Após 24 horas as células foram dualmente transfectadas com o plasmídeo recombinante *ARR<sub>2</sub>-Luc* e o vector pRL-null usando o Lipofectamine 2000 Reagent, Promega<sup>®</sup>, de acordo com o protocolo do fabricante. O seguinte procedimento refere-se às quantidades usadas para a transfecção por placa de 24 poços. Dissolveu-se o *ARR<sub>2</sub>-Luc* (0,25 µg) e o pRL-null (0,025 µg) em meio Opti-MEM (625 µl). Num *ependorf* à parte juntou-se lipofectamina (25 µl) a meio Opti-MEM (600 µl). O conteúdo deste segundo *ependorf* foi adicionado à solução de *ARR<sub>2</sub>-Luc*/pRL-null em Opti-MEM e a mistura final foi deixada a incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente. Mudou-se o meio na placa, adicionou-se a mistura de transfecção (50 µl por poço para um volume final de 1 ml por poço) e deixou-se a placa a incubar por 24 horas, a 37°C.

Após 24 horas, as células foram incubadas com meio fresco e tratadas com DHT (5 nM) e/ou os compostos seleccionados. Para controlo usou-se apenas meio. O veículo usado para os compostos testados foi EtOH (1%). Decorridas 18 horas, as células foram lavadas duas vezes com DPBS arrefecido e lidas usando o Dual Luciferase kit, Promega<sup>®</sup>, de acordo com o protocolo do fabricante. O conteúdo de cada poço foi adicionado de tampão de lise (100 µl), centrifugado e o sobrenadante (20 µl) transferido para uma placa opaca de 96 poços. Adicionou-se luciferina (78 µl) a um máximo de 3 poços de cada vez e a luminescência produzida foi imediatamente medida num contador Victor 1420, a 560 nm. De seguida, adicionou-se o reagente “Stop & Glo” (78 µl) aos mesmos poços e a luminescência produzida foi de novo lida num contador Victor 1420. Cada leitura final representa a média de pelo menos 3 poços diferentes.



## 2.5 Ensaios de proliferação celular

As células LNCaP e LAPC4 foram semeadas ( $2,5 \times 10^3$  por poço) em placas de 96 poços usando RPMI. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio fresco contendo os compostos a testar nas concentrações pretendidas (0.1 – 20  $\mu$ M). Foi usado DMSO (1%) como veículo. Para controlo usou-se meio fresco. O meio contendo os compostos a testar foi renovado nas placas a cada 3 dias e o número de células viáveis foi comparado por ensaio de XTT, ao sétimo dia de ensaio. Para o efeito, adicionou-se uma solução de XTT (20% v/v) em RPMI sem vermelho de fenol (com 5% v/v de FBS tratado com carvão activado e 1% v/v de P/E) a cada um dos poços das placas e após 4 horas de incubação a 37°C as placas foram lidas a 450 nm num contador Victor 1420. Todos os resultados representam a média de pelo menos 3 poços diferentes.

Para as células PC-3, semearam-se  $1,5 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços, usando RPMI. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio novo contendo os compostos a testar nas concentrações pretendidas (0.1 – 20  $\mu$ M). Para controlo usou-se apenas meio fresco sem adição dos compostos a testar. O meio contendo os compostos a testar foi renovado nas placas a cada 3 dias e o número de células viáveis foi comparado por ensaio de MTT, ao sétimo dia de ensaio. Para o efeito, uma solução de MTT (0,5 mg/ml) em RPMI, sem vermelho de fenol (com 5% v/v de FBS tratado com carvão activado e 1% v/v de P/E), foi adicionada a cada um dos poços das placas. Após uma incubação de 4 horas a 37°C, o meio foi aspirado na totalidade com cuidado para não aspirar os cristais formados. Adicionou-se DMSO (400  $\mu$ l por poço) e após agitação ligeira as placas foram lidas a 570 nm num contador Victor 1420. Todos os resultados representam a média de pelo menos 3 poços diferentes. Para os compostos **191-196** foi usado DMSO (1%) como veículo. Para avaliação dos restantes compostos usou-se EtOH (1%). Para determinar os valores de EC<sub>50</sub> dos compostos seleccionados usou-se um mínimo de 8 concentrações diferentes do composto. Os valores de EC<sub>50</sub> foram determinados por regressão não linear com o software Graphpad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

### 3. Referências

1. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of laboratory chemicals*, Pergamon Press: Oxford - New York - Beijing - Frankfurt - São Paulo - Sydney - Tokyo - Toronto, **1988**.
2. Gordon, A. J.; Ford, R. A. *The Chemist's companion. A handbook of practical data, techniques, and references*, John Wiley & Sons, Inc: New York - London - Sydney - Toronto, **1972**.
3. Njar, V. C.; Kato, K.; Nnane, I. P.; Grigoryev, D. N.; Long, B. J.; Brodie, A. M. Novel 17-Azolyl Steroids, Potent Inhibitors of Human Cytochrome 17 $\alpha$ -Hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-Lyase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> ): Potential Agents for the Treatment of Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 902-912.
4. Siddiqui, A. U.; Rao, V. U. M.; Maimirani, M.; Siddiqui, A. H. Heterocyclic Steroids: Synthesis of Androsteno[17,16-*d*]Pyrazoles and Androsteno[17,16-*e*]Pyrimidines. *J. Heterocyclic Chem.* **1995**, *32*, 353-354.
5. Marson, C. M. Reactions of carbonyl compounds with (monohalo) methyleneiminium salts (vielsmeir reagents). *Tetrahedron* **1992**, *48*, 3659-3726 e referências aí citadas.
6. Salvador, J. A. R.; Melo, M. L. S.; Neves, A. S. C. Ultrasound Assisted Zinc Reactions in Synthesis 2. A New Clemmensen-type Reduction. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 361-362.
7. Burkhart, J. P.; Gates, C. A.; Laughlin, M. E.; Resvick, R. J.; Peet, N. P. Inhibition of Steroid C<sub>17(20)</sub>-Lyase With C17-Heteroaryl Steroids. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1411-1420.
8. Akhtar, M.; Corina, D. L.; Miller, S. L.; Shyadehi, A. Z.; Wright, J. N. Incorporation of Label from <sup>18</sup>O<sub>2</sub> into Acetate during Side-chain Cleavage Catalyzed by Cytochrome P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  (17 $\alpha$ -Hydroxylase-17,20-Lyase). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 263-267.
9. Grigoryev, D. N.; Kato, K.; Njar, V. C.; Long, B. J.; Ling, Y. Z.; Wang, X.; Mohler, J.; Brodie, A. M. Cytochrome P450c17-expressing *Escherichia coli* as a first-step screening system for 17 $\alpha$ -hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-lyase inhibitors. *Anal. Biochem.* **1999**, *267*, 319-330.

10. Kim, O.; Jiang, T.; Xie, Y.; Guo, Z.; Chen, H.; Qiu, Y. Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* **2004**, *23*, 1838-1844.



# **LISTA DE PUBLICAÇÕES**

## LISTA DE PUBLICAÇÕES

Salvador J. A. R.; Moreira V. M.; Hanson J. R.; Carvalho R. A. One-pot, high yield synthesis of  $\alpha$ -ketols from  $\Delta^5$ -steroids. *Steroids* **2006**, 71:266-272.

Salvador J. A. R.; Silvestre S. M.; Moreira V. M. Catalytic oxidative processes in steroid chemistry: allylic oxidation,  $\beta$ -selective epoxidation, alcohol oxidations and remote functionalization reactions., *Curr. Org. Chem.* **2006**, 10: 2227-2257.

Moreira, V. M.; Vasaitis, T. S.; Njar, V. C. O.; Salvador, J. A. R. Synthesis and evaluation of novel 17-indazole androstene derivatives designed as CYP17 inhibitors. *Steroids* **2007**, 72: 939-948.

Silva, M. R.; Matos Beja, A.; Moreira, V. M.; Santos, R. C.; Salvador, J. A. R. 3-Oxoandrost-4-en-17 $\beta$ -yl-1H-imidazole-1-carboxylate, *Acta Cryst. E*, **2007**, E63, o4824.

Salvador J. A. R.; Silvestre S. M.; Moreira V. M. Catalytic Epoxidation and *syn*-Dihydroxylation Reactions in Steroid Chemistry. *Curr. Org. Chem.*, **2008**, 12, em impressão.

Moreira, V. M.; Salvador, J. A. R.; Vasaitis, T. S.; Njar, V. C. O. CYP17 Inhibitors for Prostate Cancer Treatment – An Update”, *Curr. Med. Chem.* **2008**, 15 (9), em impressão.

Silva, M. R.; Moreira, V. M.; Cardoso, C.; Matos Beja, A.; Salvador, J. A. R. 1H-and 2H-indazole derivatives of androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ol. *Acta Cryst. C*, **2008**, C64, doi:10.1107/S0108270108005842.

Moreira, V. M.; Vasaitis, T. S.; Guo, Z.; Njar, V. C. O.; Salvador, J. A. R. Synthesis of Novel C17 Steroidal Carbamates. Studies on CYP17 Action, Androgen Receptor Binding and Function, and Prostate Cancer Cell Growth. **2008**, submetido para publicação.

Silva, M. R.; Moreira, V. M.; Cardoso, C.; Matos Beja, A.; Salvador, J. A. R. 17-Chloro-16-formylandrosta-5,16-dien-3 $\beta$ -yl acetate and 17-chloroandrosta-5,16-dien-3 $\beta$ -yl acetate. *Acta Cryst. C*, **2008**, submetido para publicação.