

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Determinación *in vitro* del efecto de algunas sustancias liquénicas seleccionadas sobre el receptor de andrógenos, la enzima 5alfa-reductasa y la aromatasa para valorarlos como posibles prototipos de fármacos para el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos

Alcides Polania Patiño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D.C., Colombia
2020

Determinación *in vitro* del efecto de algunas sustancias liquénicas seleccionadas sobre el receptor de andrógenos, la enzima 5alfa-reductasa y la aromatasa para valorarlos como posibles prototipos de fármacos para el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos

Alcides Polania Patiño

Tesis presentada como requisito parcial para optar al grado de:
Magíster en Ciencias Farmacéuticas

Directora

PhD. Norma Angélica Valencia Islas

Profesora Titular D.E.

Departamento de Farmacia

Universidad Nacional de Colombia

Co-directora

Ph.D. Marisa Cabeza Salinas

Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal

Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco

Línea de Investigación:

Antiandrógenos e inhibidores de 5 alfa-reductasa

Grupo de Investigación en Química Medicinal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento Farmacia

Bogotá D.C., Colombia

2020

Dedicatoria

A Dios todo poderoso por permitirme alcanzar tan maravilloso sueño, a mi bella madre Lucia Patiño Castañeda, a mi hermana Lucia Polania Patiño, a mi hermano Juan Pablo Sanabria Patiño, a mi gran negrito y amigo Pablo Enrique Sanabria Arias, y a mi padre Alcides Polania Fierro, a mi comprometida Martha Ligia Ospina Padilla y mi hermosa Alma Lucia Polania Ospina; porque todos como equipo y familia, superaremos las adversidades.

A todos, muchas gracias.

Agradecimientos

Para la ejecución de este trabajo de investigación agradezco a esas personas especiales e indispensables que sin su colaboración no hubiese sido posible culminar tan grandioso trabajo.

En primer lugar, agradezco a Dios por darme la oportunidad, a mi madre Lucia Patiño Castañeda por su apoyo y constancia ofrecida.

A la doctora y directora de tesis, Norma Angélica Valencia Islas, por todos sus conocimientos ofrecidos para el desarrollo del trabajo investigativo durante todas las etapas allí desempeñadas, reconozco su labor ejercida como mi gran maestra, una vez que es portadora de sin igualables conocimientos y principios que influyeron en mí, para ser un mejor profesional.

Al profesor adscrito al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, el doctor José Leopoldo Rojas Araque, quien dispuso de su tiempo a través de la emisión de recomendaciones y asesorías durante la ejecución de este trabajo investigativo.

A la doctora y codirectora de tesis, Marisa Cabezas Salinas, profesora del Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal de la UAM-Xochimilco, México, quien es una espectacular y carismática persona, que depositó su confianza en mí, ofreciendo su apoyo y mejores conocimientos para el desarrollo de este trabajo de grado.

Al profesor Roberto Dávila, por su gran amistad, acompañamiento, seguimiento y asesoría ofrecida en los distintos escenarios técnicos, investigativos y científicos en los que coincidimos.

A los magísteres en Ciencias Farmacéuticas Norman David Camacho, Diego Alejandro Rodríguez, y Jimmy Lozano, que junto con las QFB Araceli Sánchez e Isabel Moreno me apoyaron y colaboraron para el mejoramiento de este trabajo.

A la Vicerrectoría de Investigación, al Departamento de Farmacia, a la oficina de Bienestar de la Facultad de Ciencias y la oficina de la ORI de la Universidad Nacional de Colombia; quienes me apoyaron durante la estancia de investigación realizada en el Laboratorio de Hormonas de la Facultad de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México.

Resumen

Con la finalidad de contribuir al descubrimiento de fármacos para el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos endógenos como la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el cáncer de próstata (CaP), que a su vez constituyen problemas de salud pública en el entorno nacional y mundial, en el presente estudio determinó mediante métodos *in vitro*, la afinidad de algunas sustancias de origen liquénico para unirse al receptor de andrógenos (RA) e inhibir a las enzimas 5alfa-reductasa isoforma 2 (5 α -R2) y la aromatasa (P450-arom), blancos de acción involucrados en dichas enfermedades. Las sustancias evaluadas previamente habían presentado afinidad ya sea por el RA o la 5 α -R2 *in silico*.

Los compuestos objeto de estudio se aislaron y purificaron por métodos fitoquímicos convencionales a partir de extractos o fracciones enriquecidas provenientes de líquenes colombianos. Su identidad fue corroborada mediante comparación de su perfil cromatográfico con un patrón auténtico, o en caso de duda, mediante la determinación y análisis de sus datos de resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C) comparando con los datos reportados en la literatura. Los compuestos a ensayar fueron: ácido úsnico (**1**), ácido descarboxithamnólico (**2**), esferoforina (**3**), atranorina (**4**), ácido bonínico (**5**), ácido 3-metoxicarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (**6**), lobarielina (**7**), orselinato de metilo (**8**), ácido orselínico (**9**) y ácido atrárico (**10**).

La afinidad de **1** a **10** para unirse al RA se determinó cuantificando el desplazamiento del ligando radiactivo mibolerona MIB[^3H] unido al receptor de origen murino, por efecto de concentraciones crecientes de los compuestos de prueba, comparando dicho efecto con el causado por el mismo ligando no radiactivo (MIB) empleado como control. Solamente los compuestos **2** y **10** a baja concentración presentaron ligera afinidad por el RA (20 %) vs la presentada por el control (35 %).

Por su parte, para determinar la actividad inhibidora de la 5 α -R2 se cuantificó la cantidad de dihidrotestosterona tritiada (DHT[1,2,6,7- ^3H]) producida a partir de la reducción de testosterona tritiada (T[1,2,6,7- ^3H]) por la fracción enzimática de próstata humana, en presencia de diferentes concentraciones (10^{-11} a 10^{-3} M) de finasterida (**F**) o de los

compuestos de prueba, calculando la concentración que produce el 50 % de la inhibición de la enzima (CI_{50}). La esferoforina (**3**) y el ácido atrárico (**10**) inhibieron significativamente a la enzima, siendo más potente **10** ($CI_{50} = 17.27 \pm 0.1234$ nM) que **3** ($CI_{50} = 50.28 \pm 0.5849$ nM) y ambos, ligeramente menos potentes que **F** ($CI_{50} = 8.5 \pm 0.2$ nM). Este hallazgo concuerda con la afinidad predicha *in silico* para estos compuestos.

La actividad inhibidora de la P450-arom se determinó cuantificando la cantidad de estradiol radiactivo ($E_2[6,7-^3H]$) producido a partir de la aromatización de testosterona tritiada ($T[1,2,6,7-^3H]$) por la fracción citosólica de hígado de rata (representativa de la enzima) en presencia de diferentes concentraciones (10^{-11} a 10^{-3} M) de los compuestos de prueba o anastrozol, empleado como control. La atranorina (**4**) y el ácido atrárico (**10**) inhibieron significativamente a la enzima aromatasa de origen murino siendo **4** ($CI_{50} = 49.31 \pm 0.0694$ nM) más potente que **10** ($CI_{50} = 65.20 \pm 0.1810$ nM) y ambos, ligeramente menos potentes que el anastrozol (22.46 ± 0.58 nM).

Los compuestos esferoforina (**3**), atranorina (**4**) y ácido atrárico (**10**) se constituyen en candidatos para evaluarlos *in vivo* y considerarlos como posibles fármacos para el tratamiento de desórdenes dependientes de un exceso de andrógenos o de estrógenos entre ellos, el CaP, la HPB y el cáncer de mama.

Los hallazgos de este estudio constituyen un aporte al estado del arte de las propiedades biológicas de las sustancias de origen liquénico.

Palabras clave: Sustancias de origen liquénico, cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, antiandrógenos, inhibidores enzimáticos.

Abstract

With the purpose of contributing to the discovery of drugs for the treatment of endogenous androgen-dependent disorders such as benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa), which in turn are public health problems in the national and global environment, in this study we determined by *in vitro* methods, the affinity of some lichen substances to bind the androgen receptor (RA) and inhibit the enzymes 5 α -reductase isoform 2 (5 α -R2) and aromatase (P450-arom), which are targets involved in these diseases. The evaluated substances showed *in silico* affinity for either RA or 5 α -R2.

The studied compounds were isolated and purified by conventional phytochemical methods from natural extracts or enriched fractions of Colombian lichens. Their identity was corroborated by comparing their chromatographic profile with an authentic pattern and in case of doubt, by determining and analyzing their nuclear magnetic resonance data (^1H and ^{13}C) compared with the those reported in the literature. The compounds to be tested were: usnic acid (**1**), decarboxythamnolic acid (**2**), sphaerophorin (**3**), atranorin (**4**), boninic acid (**5**), 3-methoxycarbonyl-2-hydroxy-6-methoxy-4-methylbenzoic acid (**6**), lobarielin (**7**), methyl orselinate (**8**), orselinic acid (**9**) and atraric acid (**10**).

The affinity of **1** to **10** to bind to the RA was determined by quantifying the displacement of radioactive ligand mibolerone MIB [^3H] bound to the receptor (of murine origin), by effect of increasing concentrations of the test compounds and comparing this effect with that caused by non-radioactive ligand (MIB). Only **2** and **10** at low concentration had a slight affinity for RA (20%) vs that presented by the control (35%).

On the other hand, to determine the inhibitory activity of 5 α -R2, the amount of tritiated dihydrotestosterone (DHT [1,2,6,7- ^3H]) produced from the reduction of tritiated testosterone (T [1,2,6,7- ^3H]) by the enzymatic fraction of human prostate in the presence of different concentrations (10^{-11} to 10^{-3} M) of finasteride (**F**) or the test compounds, was quantified calculating the concentration that produces 50 % of the inhibition of the enzyme (IC_{50}). Sphaerophorin (**3**) and atraric acid (**10**) significantly inhibited the enzyme being **10** ($\text{IC}_{50} = 17.27 \pm 0.1234$ nM) more potent than **3** ($\text{IC}_{50} = 50.28 \pm 0.5849$ nM) and both, less potent

than **F** ($IC_{50} = 8.5 \pm 0.2$ nM). This finding is consistent with the affinity predicted *in silico* for these compounds.

The inhibitory activity of P450-arom was determined by quantifying the amount of radioactive estradiol (E_2 [6.7-3H]) produced from aromatization of tritiated testosterone (T [1,2,6,7-3H]) by the rat liver cytosolic fraction (representative of the enzyme) in the presence of different concentrations (10^{-11} to 10^{-3} M) of compounds or anastrozole (used as a control). Atranorin (**4**) and atraric acid (**10**) significantly inhibited aromatase being **4** ($IC_{50} = 49.31 \pm 0.0694$ nM) more potent than **10** ($IC_{50} = 65.20 \pm 0.1810$ nM) and both, less potent than anastrozole (22.46 ± 0.58 nM).

Sphaerophorin (**3**), atranorin (**4**) and atraric acid (**10**) are candidates for their evaluation *in vivo* in order to consider them as possible drugs for the treatment of disorders dependent on an excess of androgens or estrogens, including PCa, BPH and breast cancer.

The findings of this study constitute a contribution to the state of the art of the biological properties of substances of lichen origin.

Keywords: Lichen substances, prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, antiandrogens, enzyme inhibitors.

Contenido

Pág.

1. Planteamiento del problema y justificación.....	1
2. Objetivos.....	7
2.1. General.....	7
1.1. Específicos.....	7
3. Hipótesis.....	7
4. Fundamento teórico y antecedentes.....	8
4.1. La próstata.....	8
4.2. Los andrógenos y su rol biológico en la próstata.....	9
4.3. Los estrógenos y su rol biológico en la próstata.....	14
4.4. Hiperplasia prostática benigna.....	15
4.4.1. Definición, incidencia y etiología.....	15
4.4.2. Tratamiento.....	17
4.4.2.1. Manejo expectante.....	17
4.4.2.2. Cirugía.....	18
4.4.2.3. Farmacológico.....	19
4.5. Cáncer de próstata.....	24
4.5.1. Definición, incidencia y etiología.....	24
4.5.2. Tratamiento.....	27
4.5.2.1. Cirugía.....	27
4.5.2.2. Radioterapia.....	28
4.5.2.3. Crioterapia.....	28
4.5.2.4. Farmacológico.....	28
4.6. Líquenes.....	32
4.6.1. Usos de los líquenes.....	33
4.6.2. Sustancias de origen liquénico y su actividad biológica.....	35

Contenido

	Pág.
4.6.3. Sustancias liquénicas con potencial actividad para tratar problemas de la próstata.....	40
5. Materiales y métodos.....	45
5.1. Lugares de realización	45
5.2. Procedimientos experimentales generales.....	45
5.3. Selección de las sustancias liquénicas.....	46
5.4. Aislamiento y purificación de sustancias	52
5.4.1. Consideraciones éticas.....	52
5.4.2. Purificación del ácido descarboxithamnólico (2)	53
5.4.3. Purificación de esferoforina (3)	53
5.4.4. Purificación del ácido bonínico (5)	53
5.4.5. Purificación del ácido 3-metoxycarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (6).....	53
5.4.6. Purificación del ácido atrárico (10).....	53
5.5. Determinación <i>in vitro</i> de la afinidad por el receptor de andrógenos y de la actividad inhibidora de las enzimas 5alfa-reductasa 2 y aromatasa de las sustancias liquénicas seleccionadas	54
5.5.1. Consideraciones éticas.....	54
5.5.2. Unión por el receptor de andrógenos.....	54
5.5.2.1. Preparación de la fracción citosólica de próstata de rata, representativa del receptor de andrógenos.....	54
5.5.2.2. Ensayos de competencia por el receptor de andrógenos	55
5.5.3. Actividad inhibidora la enzima 5alfa-reductasa 2	56
5.5.3.1. Preparación del homogenizado de próstata humana, representativa de la 5alfa-reductasa 2	56
5.5.3.2. Inhibición de la enzima 5alfa-reductasa 2	56
5.5.4. Actividad inhibidora la enzima aromatasa.....	57
5.5.4.1. Preparación de fracción membranal de hígado de rata representativos de la enzima aromatasa.....	57

Contenido

	Pág.
5.5.4.2. Inhibición de la aromatasas.....	57
5.6. Análisis estadístico	58
6. Resultados y discusión.....	59
6.1. Obtención de sustancias líquénicas.....	61
6.2. Confirmación de la identidad de los compuestos aislados.	63
6.2.1. Ácido descarboxithamnólico (2)	63
6.2.2. Esferoforina (3)	65
6.2.3. Ácido bonínico (5)	66
6.2.4. 3-metoxicarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (6)	68
6.2.5. Ácido atrárico (10).....	69
6.3. Afinidad <i>in vitro</i> de los compuestos de origen líquénico por el receptor de andrógenos.....	70
6.4. Inhibición <i>in vitro</i> de la enzima 5 α -reductasa isoforma 2 por los compuestos de origen líquénico	73
6.5. Inhibición <i>in vitro</i> de la enzima aromatasas por los compuestos de origen líquénico.....	77
7. Conclusiones	83
7.1. Recomendaciones.....	84
8. Referencias	85
A. Anexo A: Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	94
B. Anexo B: Inhibición de la 5α-R2 y P450-arom	104

Lista de figuras

	Pág.
Figura 4-1. Ubicación de los lóbulos ventral, lateral, central y dorsal de la glándula proatática (Risbridger & Taylor, 2005).....	8
Figura 4-2. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Molina, 2013).	10
Figura 4-3. Esteroidogénesis (Poirier, 2008).	11
Figura 4-4. Mecanismo de activación del receptor de andrógenos (AR) por sus ligandos endógenos. (Harris, et al., 2009).	12
Figura 4-5. Estructura molecular del receptor de andrógenos (Tan, et al., 2015).	13
Figura 4-6. Resección transuretral de la próstata (MedlinePlus, 2019).....	18
Figura 4-7. Estructura del antagonista de los receptores α 1-adrenérgicos tamsulosina.	19
Figura 4-8. Estructuras de los inhibidores de 5alfa-reductasa finasterida (a) y dutasterida (b)	20
Figura 4-9. Estructura de la darifenacina, antagonista del receptor muscarínico.	21
Figura 4-10. Estructura del tadalafilo, inhibidor de la 5-fosfodiesterasa.	22
Figura 4-11. Estructura del anastrozol, inhibidor de la enzima aromatasa.....	24

Lista de figuras

	Pág.
Figura 4-12. Prostactectomía radical retropúbica y perineal (American Cancer Society, 2018).	27
Figura 4-13. Estructura de la leuprolida (a) y degarelix (b).....	29
Figura 4-14. Estructuras de antiandrógenos flutamida (a) y bicalutamida (b).....	29
Figura 4-15. Mecanismo de acción de antiandrógenos bicalutamida y enzalutamida (Hoffman-Censits, 2013).....	30
Figura 4-16. Inhibición de la 14 α -desmetilasa por el ketoconazol y la 17 α -hidroxilasa/C(17, 20)-liasa por el acetato de abiraterona (Avendaño & Menéndez, 2008).	31
Figura 4-17. Estructura del ketoconazol.....	31
Figura 4-18. Estructura anatómica de líquenes (Cummings, 2002).....	32
Figura 4-19. Estructuras del orcinol (a) y β -orcinol (b).	36
Figura 4-20. Biosíntesis del ácido úsnico (dibenzofurano) a partir del metilfluroacetofenona (Dewick, 2009).....	37
Figura 4-21. Biosíntesis de depsidonas (Calcott, et al., 2018).	38
Figura 4-22. Biosíntesis de xantonas (Calcott, et al., 2018).	39
Figura 6-1. Porcentaje de unión por el receptor de andrógenos de origen murino de compuestos de origen líquénico (1 a 10). 1: ácido úsnico, 2: ácido descarboxithamnólico, 3: esferoforina, 4: atranorina, 5: ácido bonínico, 6: ácido 3-metoxycarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico, 7: lobarielina, 8: orselinato de metilo, 9: ácido orselínico, 10: ácido atrárico.	71
Figura 6-2. Comparación estructural del ácido atrárico (10), lobarielina (7), orselinato de metilo (8) y ácido orselínico (9).....	75

Lista de figuras

	Pág.
Figura 6-3. Comparación estructural del ácido atrárico (10) y la atranorina (4).....	81
Figura A-1. Espectro ¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) del ácido descarboxithamnólico (2).	94
Figura A-2. Espectro ¹³ C RMN (100 MHz, DMSO-d ₆) del ácido descarboxithamnólico (2).	95
Figura A-3. Espectro ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) de la esferoforina (3).....	96
Figura A-4. Espectro ¹³ C RMN (100 MHz, CDCl ₃) de la esferoforina (3).....	97
Figura A-5. Espectro ¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃) del ácido bonínico (5).....	98
Figura A-6. Espectro ¹³ C RMN (75 MHz, CDCl ₃) del ácido bonínico (5).....	99
Figura A-7. Espectro ¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) del ácido 3-metoxicarbonil-2-hidroxi- 6-metoxi-4-metilbenzoico (6)	100
Figura A-8. Espectro ¹³ C RMN (100 MHz, DMSO-d ₆) del ácido 3-metoxicarbonil-2- hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (6).	101
Figura B-1. Inhibición de la enzima 5α-R2 por el ácido atrárico (10).....	104
Figura B-2. Inhibición de la enzima 5α-R2 por la esferoforina (3).....	104
Figura B-3. Inhibición de la enzima P450-arom por el ácido atrárico (10).....	104
Figura B-4. Inhibición de la enzima P450-arom por la atranorina (4).....	104

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1. Sustancias liquénicas candidatas para desarrollarlas como posibles fármacos para el tratamiento quimioterapéutico del cáncer de próstata.	40
Tabla 5-1. Compuestos de origen liquénico candidatos a ser evaluados <i>in vitro</i> (Molano-Merchán, et al., 2013; Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019).	47
Tabla 6-1. Compuestos de origen liquénico objeto de estudio.	61
Tabla 6-2. Datos de RMN (DMSO-d6, 400 MHz) del ácido descarboxithamnólico (2). ...	64
Tabla 6-3. Datos de RMN (CDCl ₃ , 400 MHz) de la esferoforina (3).	66
Tabla 6-4. Datos de RMN (CDCl ₃ , 400 MHz) del ácido bonínico (5).	67
Tabla 6-5. Datos de RMN (DMSO-d6, 400 MHz) del ácido 3-metoxicarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (6).	69
Tabla 6-6. Datos de RMN (CDCl ₃ , 400 MHz) de ácido atrárico (10).	70
Tabla 6-7. Actividad inhibidora de la enzima 5alfa-reductasa isoforma 2 de los compuestos de origen liquénico.	74
Tabla 6-8. Actividad inhibidora de la aromatasa de los compuestos de origen liquénico.	79

Símbolos y abreviaturas

Símbolos y abreviaturas	Significado
PSA	Antígeno Prostático Específico (siglas en inglés)
CPRC	Cáncer con resistencia a la castración (siglas en inglés)
ADPC	Cáncer de próstata andrógeno dependiente (siglas en inglés)
AIPC	Cáncer de próstata andrógeno independiente (siglas en inglés)
CPM	Cuentas por minutos
CT	Cuentas Totales
DPM	Destellos por minutos
DHT	Dihidrotestosterona
DTT	Ditroitreitol
NTD	Dominio amino terminal (siglas en inglés)
DBD	Dominio de unión al ADN (siglas en inglés)
LBD	Dominio de unión al ligando (siglas en inglés)
ERA	Elementos de Respuesta a Andrógenos
E ₂	Estradiol
TGFβ	Factor de crecimiento tumoral beta
NKX _{3.1}	Factor de transcripción NK3 locus 1 (siglas en inglés)
TF	Factores de Transcripción (sigla en inglés)
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoruro

Símbolos y abreviaturas

Símbolos y abreviaturas	Significado
AF2	Función de activación del receptor de andrógenos dependiente de ligando
FUNBIOCOL	Fundación Nacional para el Estudio de la Biodiversidad en Colombia
SHBG	Globulina transportadora de hormonas sexuales
HA	Hidroxiapatita
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
LH	Hormona Luteinizante
LHLR	Hormona Reguladora de la Hormona Luteinizante (siglas en inglés)
MIB[³ H]	Mibolerona marcada con tritio 17 α -metil- ³ H-MIB
MIB	Mibolerona no radiactiva
PDB	Protein Data Bank
SCP2	Proteínas transportadoras de esteroides (siglas en inglés)
RA	Receptor de Andrógenos
2AM9	Receptor de Andrógenos cristalizado de origen <i>Homo sapiens</i>
RE	Receptor de Estrógenos
TCA	Triamcinolona
UT	Uniones totales

1. Planteamiento del problema y justificación

En hombres maduros, el cáncer de próstata (CaP) y la hiperplasia prostática benigna (HPB) son enfermedades de gran preocupación nacional y mundial dada su alta incidencia de morbilidad y de mortalidad. A nivel mundial, el CaP se ha reportado como la neoplasia más prevalente en hombres maduros, la tercera patología oncológica más prevalente en la población (Cajina, 2012; Organización Panamericana de la Salud, 2013) y la sexta causa de muerte debida a cáncer entre los varones maduros (Rawla, 2019). En Colombia, el CaP también es el más prevalente en dichos individuos (World Health Organization, 2019a), su índice de mortalidad se ha triplicado en los últimos treinta años diagnosticándose más de 6500 nuevos casos y más de 2400 muertes por año (Ramírez, 2013; Lee, et al., 2017). Por ello, el Ministerio de Salud y Protección Social en conjunto con el Instituto Nacional de Cancerología en Colombia lo han incluido dentro de sus líneas prioritarias de investigación a fin de mejorar su detección, tratamiento y pronóstico en la población masculina del país (Instituto Nacional de Cancerología, 2017).

Con respecto a la HPB, a pesar de no contar con datos precisos sobre su incidencia, se puede estimar que esta patología constituye la primera causa de cirugía de la próstata en los hombres maduros (Gonzalez, et al., 2007). Este padecimiento se define como el crecimiento excesivo benigno del tejido prostático debido un aumento en el número de sus células (Caro-Zapata, et al., 2017), fenómeno considerado como parte del proceso propio del envejecimiento del individuo, por lo cual, es muy común en los varones maduros (National Institutes of Health, 2019b). Sin embargo, en casos patológicos, dicho fenómeno conlleva al agrandamiento de la glándula y a la constricción de la uretra produciéndose los síntomas del tracto urinario inferior (LUTS) que incluyen urgencia y frecuencia urinaria, nocturia, micción incompleta y flujo urinario débil, que si no se trata, puede provocar complicaciones como retención urinaria, insuficiencia renal y cálculos en la vejiga, que requieren intervención quirúrgica.

Se ha establecido que ambas enfermedades son dependientes de andrógenos endógenos. En particular, los andrógenos testosterona (T) y su metabolito reducido dihidrotestosterona (DHT) son hormonas determinantes en la iniciación y progresión del CaP, pues al interactuar con el receptor de andrógenos (RA) (un receptor nuclear de hormona esteroide

inducible por ligando), conducen a proliferación celular como parte de su acción biológica (Lamb & Neal, 2013). Por su parte, la DHT, es la principal responsable del crecimiento exacerbado de la próstata en la HPB, debido a su mayor poder androgénico respecto a la T, y a que en este órgano, ésta se biosintetiza a partir de T por acción de la enzima 5alfa-reductasa (5 α -R), constituyéndose en el andrógeno prostático mayoritario (Shuk-Mei, 2004).

De manera adicional, el tejido prostático también es blanco de la acción de los estrógenos que afectan de manera directa (por activación de los receptores de estrógenos que promueven proliferación celular) e indirecta (mediante el control de la producción de andrógenos por un mecanismo de retroalimentación negativa) su crecimiento (Poirier, 2008). La principal fuente de estrógenos en el varón son los testículos, cuyas células de Leydig biotransforman la T en estradiol (E₂) por reacción catalizada por la enzima aromatasa (P450-arom) (Shuk-Mei, 2004). Se ha visto que entre la cuarta y quinta década de vida del varón, la producción normal de andrógenos empieza a disminuir, al tiempo que los estrógenos aumentan, lo que se ha asociado a un aumento en la masa corporal y tejido adiposo del individuo, posibilitando mayor expresión de aromatasa tisular y aumento en la tasa de conversión de T a E₂, favoreciendo la aparición de trastornos asociados a proliferación celular aumentada tales como HPB y CaP, que tienen su mayor incidencia precisamente en estas etapas de la vida (Espinoza, et al., 2013). Por estas razones, la modulación de los niveles tanto de andrógenos como de estrógenos en el varón resulta necesaria para el control y mitigación de dichas enfermedades (Shuk-Mei, 2004).

Dentro de las principales opciones de tratamiento para el CaP se incluye la prostatectomía y radioterapia para los tumores localizados, así como la terapia de privación hormonal para los estados avanzados (Lamb & Neal, 2013). En el caso de la HPB, la cirugía constituye uno de los métodos más empleados cuando la próstata ha alcanzado un gran tamaño y produce los síntomas del tracto urinario bajo (López-Ramos, et al., 2014). A pesar de las bondades que posee la cirugía para el tratamiento de estas enfermedades, dicha estrategia afecta la calidad de vida del paciente por los problemas postoperatorios que provoca, entre ellos, disfunción sexual eréctil, incontinencia urinaria y limitación para la actividad física intensa (Cataño & Morales, 2009). En el caso de la radioterapia, algunos de los efectos secundarios son similares a los presentados en la cirugía, desencadenando problemas urinarios, de erección e impotencia sexual, sensación de cansancio y linfedema (American Cancer Society, 2017). Por ello, el tratamiento farmacológico ha adquirido importancia

pues en el caso de la HPB, ayuda a reducir el tamaño de la próstata y los requerimientos de cirugía, mientras que en el CaP permite disminuir los niveles de andrógenos endógenos evitando que estas hormonas propicien el crecimiento y proliferación de las células cancerosas (Denmeade & Isaacs, 2002). Cabe mencionar que este último efecto, conocido como terapia de privación androgénica, también se podría conseguir mediante orquiectomía, la cual constituye una estrategia quirúrgica poco aceptada por los pacientes, tomando importancia por ello, el tratamiento farmacológico (López-Ramos, et al., 2014).

Los fármacos antagonistas del receptor de andrógenos (RA) y los agonistas-antagonistas de la Hormona Liberadora de Gonodotropinas (GnRH), son alternativas farmacológicas para el tratamiento del CaP en etapa avanzada, mientras que, para la HPB, se recurre a los inhibidores de las enzimas 5 α -R y P450-arom, así como también a los antagonistas del receptor α 1-adrenérgico (Fine & Ginsberg, 2008), siendo estos últimos, agentes paliativos de los síntomas asociados a la HPB. A pesar de la relevancia clínica del tratamiento farmacológico, este ha mostrado efectos adversos de tipo hormonal, como en el caso de los inhibidores de la 5 α -R y los antagonistas del RA, asociados con su interacción con los receptores de glucocorticoides o progesterona estrechamente relacionados con ellos (Gonzalez, et al., 2007). Los agonistas-antagonistas de GnRH también presentan problemas hormonales y causan riesgo de recurrencia del cáncer. En el caso de los antagonistas α 1-adrenérgicos, se les ha asociado con problemas intestinales, congestión nasal, dolor de cabeza, mareo, cansancio, hipotensión arterial y trastornos de la eyaculación, afectando de una manera somática y psicosocial al paciente (Gonzalez, et al., 2007). Es por estos motivos que surge la necesidad de contar con alternativas farmacológicas potencialmente más selectivas en su acción a fin de evitar dichos efectos.

En la búsqueda de compuestos bioactivos potencialmente más inocuos para el tratamiento de estas enfermedades, una gran cantidad de fuentes naturales principalmente de origen vegetal han sido exploradas para tal fin, entre ellas, plantas como el ciruelo africano (*Pygeum africanum* syn. *Prunus africana*), el saw palmetto o palmito salvaje (*Serenoa repens* syn. *Sabal serrulata*), la calabaza (*Curcubita pepo*) y la soya (*Glycine max*), entre otras, las cuales han mostrado mecanismos de acción relacionados con dichas enfermedades, por ejemplo, acción vasodilatadora de la uretra mediante antagonismo de receptores α 1-adrenérgicos; efecto antiinflamatorio; acción antagonista del receptor de andrógenos o efecto modulador selectivo del receptor de estrógenos, etc. (Applegate, et

al., 2018; Papaioannou, et al., 2009). De manera adicional, algunos registros de la medicina tradicional en conjunto con algunos estudios científicos han permitido determinar a los líquenes, como una fuente idónea para este propósito por presentar potencial actividad para interactuar con el RA y con la enzima 5 α -R (Molano-Merchán, et al., 2013; Papaioannou, et al., 2009; Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019).

Los líquenes también llamados hongos liquenizados, son organismos resultantes del consorcio simbiótico mutualista entre un hongo llamado micobionte (generalmente ascomiceto), con uno o más organismos autótrofos fotosintéticos (llamado fotobionte), que pueden ser un alga verde y/o una cianobacteria y en ciertas ocasiones también se puede asociar una levadura (basidiomiceto) como parte del micobionte (Spribille, et al., 2016; Pennisi, 2016). Como resultado, se origina un ser que es anatómica y morfológicamente diferente de los organismos que le dieron origen, capaz de colonizar todo tipo de hábitats incluyendo los hostiles y extremos en temperatura, humedad, desecación, salinidad, radiación UV y contaminación ambiental, bajo los cuales otros organismos, incluyendo a los constituyentes del liquen por separado, no podrían sobrevivir (Valencia-Islas, et al., 2007; Raggio, 2013). Esto se debe a que ante tales ambientes extremos, los líquenes han desarrollado estrategias para lograr su supervivencia, entre los que destaca, la biosíntesis de metabolitos secundarios únicos, que a su vez poseen propiedades biológicas entre las que destacan la antioxidante, fotoprotectora (Perico-Franco, et al., 2015; Rojas, et al., 2015; Raggio, et al., 2011), herbicida (Lokajová, et al., 2014), antihervíbora, antihelmíntica, antibiótica (Rankovic´ & Kosanic´, 2015), insecticida, antineoplásica (Papaioannou, et al., 2009), inmunomoduladora y antienvjecimiento (Núñez-Arango & Valencia-Islas, 2012), entre otras (Rankovic´ & Kosanic´, 2015).

En estudios llevados a cabo por el Grupo de Investigación en Química Medicinal de la Universidad Nacional de Colombia, donde se enmarca el presente trabajo, se predijo por métodos *in silico* que algunas sustancias liquénicas presentan mayor afinidad por el RA que sus ligandos endógenos T y DHT (Molano-Merchán, et al., 2013), encontrándose un mecanismo de interacción novedoso que consiste en unirse a la función de activación dependiente del ligando (AF2) en vez de hacerlo sobre el dominio de unión al ligando (LBD), sitio bloqueado por los fármacos antiandrogénicos tradicionales (Cardile, et al., 2017). Así mismo, se descubrió que uno de los principios activos de la corteza de ciruelo africano (*P. africanum*) (droga para preparar un fitoterapéutico para el tratamiento de la prostatitis y de la HPB) es el ácido atrárico, un policétido natural en líquenes, que a su vez,

constituye un compuesto marcador en cortezas y duramen externo de árboles colonizados por estos organismos (Bourgeois, et al., 1999). Se ha establecido que el ácido atrárico posee efecto antiandrogénico frenando el crecimiento celular y la expresión del gen del antígeno prostático específico en adenocarcinoma de próstata que expresa al RA, sin afectar el crecimiento de aquel que carece de dicho receptor (PC3 o CV1) (Papaioannou, et al., 2009). Además, se ha establecido que a bajas concentraciones es específico para antagonizar al RA sin afectar al receptor de progesterona y de estrógenos, íntimamente relacionados, por lo tanto, se sugiere que es un antagonista selectivo de dicho receptor. Por lo tanto, el aislamiento de este compuesto ha planteado la pregunta de si es realmente un metabolito del árbol o si es producido por líquenes que colonizan su corteza, principalmente de aquellos pertenecientes al género *Parmelia* que son productores de dicho compuesto (Bourgeois y otros 1999). Cabe mencionar, que el líquen *Parmelia perlatum* es uno de los constituyentes de la preparación indígena ayurvédica Speman®, empleada en la India para el tratamiento sintomático de la HPB (Marya, et al., 1995), lo que hace pensar que parte de su efecto terapéutico se deba a la presencia del ácido atrárico. En estudios realizados en nuestro grupo también se ha determinado *in silico* que algunos compuestos aislados de líquenes pueden presentar afinidad comparable a la testosterona para unirse a la enzima 5alfa-reductasa (Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019). Por lo tanto, con base en estas consideraciones, la búsqueda de compuestos que potencialmente sean más inocuos para la profilaxis o el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos endógenos a partir de líquenes se encuentra justificada.

En el presente trabajo, se exploró mediante ensayos *in vitro* el efecto que pueden ejercer algunas sustancias líquénicas seleccionadas sobre el RA y sobre algunas enzimas involucradas en la biosíntesis (5alfa-reductasa) y niveles de andrógenos (P450-arom). Las sustancias fueron seleccionadas para su estudio, tomado como base sus datos de afinidad *in silico* por el sitio de unión al ligando del RA o el sitio catalítico de la 5alfa-reductasa, en conjunto con la facilidad para su consecución a partir de fuente natural de origen colombiano. Este trabajo pretende contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas de las sustancias líquénicas y al desarrollo de fármacos para el tratamiento de trastornos dependientes de andrógenos endógenos, entre ellos el CaP y la HPB, que como se mencionó, son problemas de salud pública en el entorno nacional y mundial.

2. Objetivos

2.1. General

Establecer por métodos *in vitro*, el efecto que ejercen algunas sustancias liquénicas seleccionadas sobre el receptor de andrógenos, la enzima 5alfa-reductasa y la aromatasa, con la finalidad de contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas de estas sustancias y de valorarlas como posibles prototipos de fármacos para el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos.

1.1. Específicos

- Llevar a cabo la selección de las sustancias liquénicas a evaluar experimentalmente tomando como criterio para dicha selección, la mayor afinidad presentada por el dominio de unión al ligando del receptor de andrógenos, y la mayor facilidad en su consecución a partir de la fuente natural.
- Aislar, purificar y caracterizar a través de análisis espectroscópicos (RMN) al menos tres sustancias liquénicas seleccionadas.
- Evaluar la actividad de las sustancias seleccionadas sobre el receptor de andrógenos, la enzima 5alfa-reductasa y la aromatasa mediante ensayos *in vitro*.

3. Hipótesis

Considerando la afinidad predicha *in silico* por el sitio de unión al ligando del receptor de andrógenos o por el sitio catalítico de la enzima 5alfa-reductasa, de algunas sustancias de origen liquénico, en conjunto con los datos de actividad antiandrogénica *in vitro* reportados para el ácido atrárico, se pueden considerar a los líquenes como una fuente potencial de agentes farmacológicos para el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos, esperando encontrar que aquellas sustancias liquénicas que sean más afines por dichos sitios, puedan presentar efecto *in vitro*.

4. Fundamento teórico y antecedentes

4.1. La próstata

La próstata es una glándula accesoria del sistema reproductivo masculino que produce un líquido alcalino que transporta los espermatozoides durante la eyaculación y aporta aproximadamente el 70 % del volumen seminal (Foster, et al., 2018). Tiene forma similar a la de una nuez y se localiza en la pelvis, por debajo de la vejiga rodeando a la uretra. Su desarrollo comienza desde la undécima semana de gestación como cinco pares de yemas epiteliales (anterior, posterior, media y dos laterales) que rodean la uretra y los conductos eyaculatorios en desarrollo (Risbridger & Taylor, 2005; Risbridger & Taylor, 2005). La glándula (Figura 4-1), se compone de numerosos alvéolos revestidos de epitelio pseudoestratificado los cuales desembocan en la uretra a través de un sistema de conductos y túbulos ramificados. Está formada por distintas zonas: la periférica que representa la región más grande y abarca aproximadamente el 75 % del tejido glandular en donde generalmente se presentan los adenocarcinomas (Foster, et al., 2018). La zona central, una región pequeña con tan solo el 25 % del tejido glandular; la zona periuretral también llamada zona de transición, que representa el 5 % del tejido prostático, sin embargo, su importancia clínica es vital debido a que es el sitio frecuente donde se desarrolla la HPB. Por su parte, el tejido pre-prostático, rodea la uretra, siendo una estructura cuya función es prevenir la eyaculación retrógrada (Risbridger & Taylor, 2005).

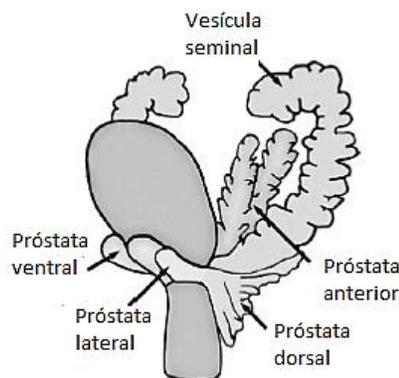


Figura 4-1. Ubicación de los lóbulos ventral, lateral, central y dorsal de la glándula proatática (Risbridger & Taylor, 2005).

4.2. Los andrógenos y su rol biológico en la próstata

Las hormonas sexuales masculinas o andrógenos son los principales esteroides sexuales responsables del desarrollo del fenotipo masculino durante la embriogénesis y la maduración sexual en la pubertad (Gómez-Chang, et al., 2012). Los andrógenos, participan en los procesos biológicos que incluyen el desarrollo del pene, el escroto, los testículos, las glándulas sexuales accesorias (entre ellas la próstata) y las características sexuales secundarias durante la pubertad (Lamb & Neal, 2013).

Los principales andrógenos en el organismo son la testosterona (T), su metabolito reducido dihidrotestosterona (DHT) y la androstenediona. Entre el 90 y 95 % de éstos se producen en las células de Leydig de los testículos, siendo la T la hormona mayormente biosintetizada y el principal andrógeno testicular responsable de presentarse en el plasma de los hombres sanos (Rojas, et al., 2011).

En el eje hipotálamo-pituitaria-gonadal, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH o LHRH), es liberada del hipotálamo y a su vez, esta induce la liberación de las gonadotropinas hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (HFS) por la parte anterior de glándula pituitaria que estimulan la liberación de T por los testículos y glándulas adrenales (Figura 4-2). La T biosintetizada, viaja a la próstata y a otros tejidos blanco de andrógenos, en donde es convertida a su metabolito más activo dihidrotestosterona (DHT), por acción de la 5α -R y luego es transportada por difusión pasiva al citoplasma de la célula epitelial donde se une a su receptor nuclear (RA) que regula la expresión de genes que conllevan a la síntesis de proteínas implicadas en el desarrollo, mantenimiento del tamaño y función secretora de la próstata (Lamb & Neal, 2013). Dado que la DHT posee mayor afinidad al receptor a andrógenos (RA), los efectos androgénicos en próstata se deben principalmente a este metabolito y no a T. El aumento de los niveles de testosterona también puede disminuir la producción de LHRH y LH a través de bucles de retroalimentación negativa, por lo tanto, cuando las concentraciones de testosterona y estrógenos son altas en los hombres, este sistema disminuye la producción de ésta debido a la inhibición que se produce sobre la adenohipófisis la cual reduce la liberación de LH y HFS (Bustos, 2012). Además, la inhibina ejerce una retroalimentación negativa selectiva sobre la HFS en los hombres y las mujeres manteniendo así la testosterona sérica en niveles fisiológicos (Denmeade & Isaacs, 2002; Koeppen & Stanton, 2009).

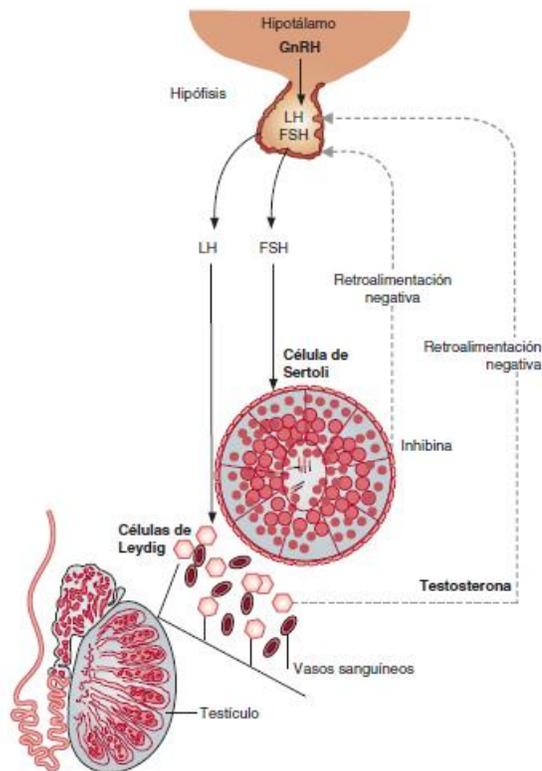


Figura 4-2. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Molina, 2013).

La biosíntesis de las hormonas esteroidales a partir del colesterol precursor es un proceso de varios pasos llamado esteroidogénesis, que consiste en transformaciones enzimáticas sucesivas (Figura 4-3). Las enzimas esteroidogénicas biosintetizan diferentes familias de hormonas esteroidales (progestinas, mineralocorticoides, glucocorticoides, andrógenos y estrógenos) en órganos secretores específicos (producción endocrina), pero también en tejidos periféricos que contienen todas las enzimas necesarias para la síntesis local intracelular de esteroides activos (producción intracrina) (Poirier, 2008). Durante este proceso, la T es biosintetizada en los testículos a partir de 17α -hidroxipregnenolona (17-OH-PREG) que es convertida en dehidroepiandrosterona (DHEA) por el citocromo P450 17α -hidroxilasa/ $17,20$ -liasa (P450c17) que escinde su cadena lateral. A su vez, la DHEA puede ser reducida a 5-androsten- $3\beta,17\beta$ -diol (5-DIOL) por 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasas (17β -HSDs). Tanto la DHEA como el 5-DIOL pueden ser reducidos por la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - Δ^4 -isomerasa (3β -HSD) dando lugar a los andrógenos 4-androsten-3,17-dion (4-DIONE) y testosterona (T), respectivamente.

En el epitelio prostático y otros órganos como las glándulas suprarrenales y la piel, la T se biotransforma en DHT mediante la reducción catalizada por las enzimas 5 α -reductasa 1 (5 α -R1) y 2 (5 α -R2) (Gu, et al., 2013). También existen fuentes alternativas de andrógenos a nivel suprarrenal a partir de la biosíntesis de DHEA y deshidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S). Finalmente, la 4-DIONE y la T son biotransformadas en los estrógenos estradiol (E₂) y estrona (E₁), respectivamente, por acción de la aromatasa (P450-arom). En humanos, la enzima se expresa en las células de la granulosa del folículo ovárico, los sincitiotrofoblastos de la placenta durante el embarazo y en las células de Leydig de los testículos. Los estrógenos producidos por la aromatasa tienen una serie de importantes funciones fisiológicas y patológicas en hombres y mujeres. Como se puede apreciar, durante el proceso de esteroidogénesis, las enzimas del citocromo P450 cumplen un papel fundamental (Gu, et al., 2013).

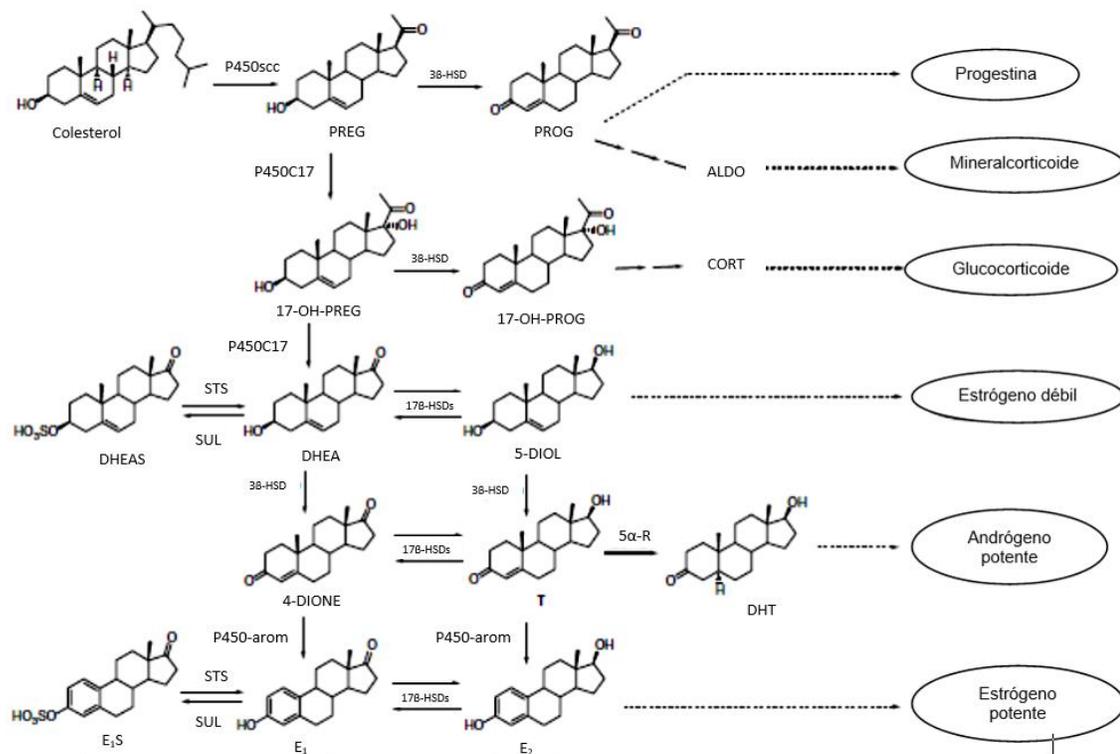


Figura 4-3. Esteroidogénesis (Poirier, 2008).

La T y DHT biosintetizadas interactúan con el RA (NR3C4) presente en tejidos blanco de andrógenos para ejercer su efecto biológico (Gómez-Chang, et al., 2012). Dado que la DHT presenta una afinidad 10 veces mayor que la T por el RA, ésta permite el normal funcionamiento de la próstata. Una vez estas hormonas se unen al RA, se inducen cambios

conformacionales sobre éste provocando su disociación de las proteínas chaperonas de choque térmico (HSP) a las que se encuentra unidas en estado basal. Acto seguido, se lleva a cabo su dimerización y posterior translocación al núcleo (Figura 4-4), en donde se une a los elementos de respuesta a andrógenos en el ADN que tienen actividad transcripcional conduciendo a proliferación celular (Gao, 2010) mediante la producción de factores de crecimiento (epidérmico, plaquetario similar a la insulina de las células estromales y otros) y a síntesis de proteínas, entre ellas, el antígeno prostático específico (PSA) implicado en la movilidad de los espermatozoides para la fecundación ya que disuelven eficientemente a las semenogelinas 1 y 2 y fibronectina del gel seminal después de la eyaculación (Rojas, et al., 2011).

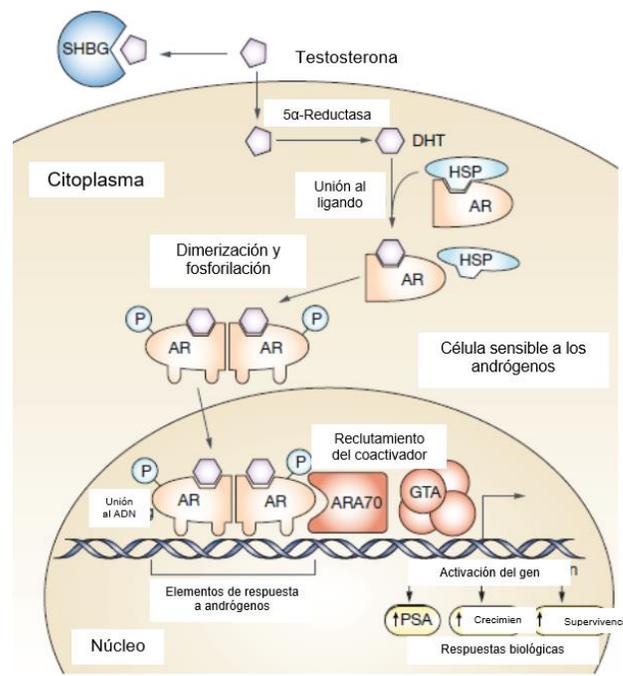


Figura 4-4. Mecanismo de activación del receptor de andrógenos (AR) por sus ligandos endógenos. (Harris, et al., 2009).

El RA es una proteína de 919 aminoácidos que se constituye de cuatro dominios funcionales (Figura 4-5) (Gao, et al., 2005), el primero es un dominio NH₂-terminal (NTD) encargado de la activación transcripcional, siendo este el más variable entre los receptores nucleares tanto en longitud como en secuencia. El segundo, es el dominio de unión ADN (DBD) localizado en la parte central de la proteína, el cual actúa como la región más conservada dentro de la familia de los receptores nucleares (Rojas, et al., 2011). El DBD

está formado por nueve residuos de cisteína, de los cuales ocho, forman dos complejos con el zinc denominados dedos de zinc que cumplen la función de reconocer secuencias consenso específicas del ADN. El tercer dominio, es el dominio de unión al ligando (LBD) encargado de la dimerización y activación de la transcripción, que regula la interacción entre el RA y las proteínas HSP e interactúa con el dominio NTD para estabilizar la unión del andrógeno. El cuarto dominio, consta de una región bisagra no conservada que se encarga de unir a los dominios LBD y DBD, luego de la translocación nuclear y transactivación del RA (Figura 4-5) (Harris, et al., 2009).

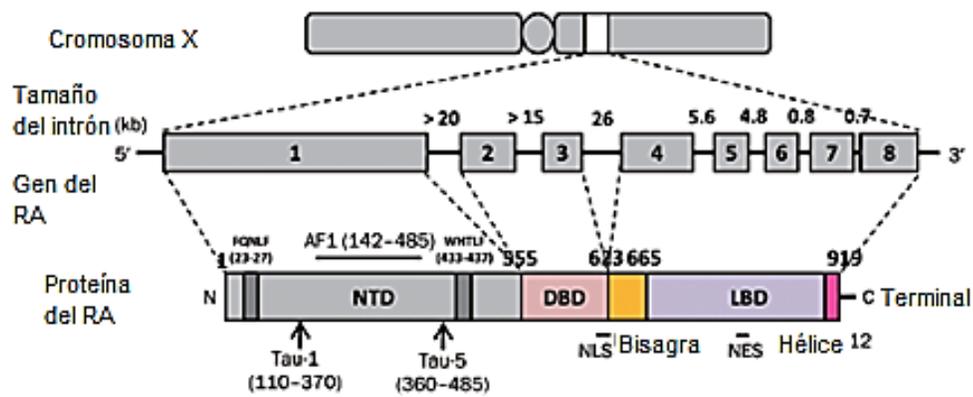


Figura 4-5. Estructura molecular del receptor de andrógenos (Tan, et al., 2015).

Si bien la T y DHT son los principales de andrógenos endógenos en humanos, la T se presenta en un 95 % en forma circulante una vez es segregada por las células de Leydig de los testículos en respuesta a la estimulación de la LH. Se ha observado la presencia de pequeñas cantidades de testosterona producida por la corteza suprarrenal, el hígado y el ovario. La T circulante está altamente unida a proteínas séricas como globulinas fijadoras de hormonas sexuales (SHBG) y albúmina, dejando solo el 2 % como testosterona libre. Como hormonas sexuales, los andrógenos son esenciales para el desarrollo fenotípico desde la virilización, el desarrollo del tracto urogenital en embriones masculinos hasta los cambios puberales del hombre a lo largo de su vida. En varones adultos, los andrógenos mantienen sus características masculinas, así como también la libido, la espermatogénesis, la masa muscular y la densidad mineral ósea además de estimular la eritropoyesis. También, se atribuyen el desarrollo gradual de la calvicie masculina, la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata, dada la conversión de T a DHT. La expresión del RA se localiza en todos los tejidos diana típicos de andrógenos, donde se incluyen los tejidos reproductivos tales como la próstata, vesícula seminal, epidídimo y

testículos, también se incluyen en otros tejidos como el músculo -esquelético, músculo cardíaco, piel e hígado (Gao, 2010).

4.3. Los estrógenos y su rol biológico en la próstata

Si bien los andrógenos son de importancia primordial para el crecimiento de la próstata normal, en la HPB y en el CaP, los estrógenos también pueden tener un papel en esto. En los varones, los andrógenos androstenediona y testosterona se convierten en los estrógenos estrona (E_1) y estradiol (E_2) por acción de la aromatasa (P-450arom), enzimas del complejo de citocromos P-450. El E_2 producido, entra a la circulación sistémica para alcanzar a sus tejidos blanco, en donde interactúa de manera específica con sus receptores nucleares esteroidales llamados receptores de estrógenos (RE (Shuk-Mei, 2004)).

Uno de los efectos estrogénicos más estudiados en el macho es el mecanismo de retroalimentación negativa sobre la secreción de T, fenómeno que consiste en la inhibición que los estrógenos ejercen sobre la secreción de la hormona luteinizante (LH) por la pituitaria estimulando la secreción de T por parte de las células de Leydig testiculares. La retroalimentación negativa producida por los estrógenos resulta en disminución de los niveles T, conllevando a una menor producción de DHT. Por lo cual, durante un tiempo se emplearon a los estrógenos como tratamiento farmacológico del CaP inoperable (Shuk-Mei, 2004).

El desarrollo y función testicular también requieren de los estrógenos, evidenciado por el macroorquidismo y oligozoospermia que se observan en hombres con niveles bajos de E_2 (Espinoza, et al., 2013). Así mismo, el desarrollo y funcionamiento de la glándula prostática se ven influenciados por acciones estrogénicas tanto indirectas (mediante el control de la producción de andrógenos por retroalimentación negativa) como directas (a través de la activación de los receptores de estrógenos) (Nicholson & Ricke, 2011).

Los estrógenos ejercen efectos importantes tanto en condiciones fisiológicas como patológicas de la próstata. Por ejemplo, durante el tercer trimestre del desarrollo fetal, la proporción plasmática de estrógenos/andrógenos se modifica favoreciendo el predominio de los primeros como consecuencia de un incremento en los niveles plasmáticos de estrógenos maternos. Estos se han correlacionado con la presencia de metaplasia

escamosa en la próstata fetal, que desaparece después del nacimiento cuando estas hormonas regresan a sus niveles normales (Binet, et al., 2017). También entre la cuarta y quinta décadas de vida del varón, la producción normal de andrógenos empieza a disminuir, al tiempo que los niveles de estrógenos aumentan junto con los niveles plasmáticos de proteína fijadora de hormonas sexuales, ocasionando disminución de T plasmática libre (Shuk-Mei, 2004). Aunado a esto, el incremento en la masa corporal y del tejido adiposo del individuo, posibilitan una mayor expresión de aromatasas tisulares y con ello, un aumento en la tasa de conversión de T a E₂, trayendo como consecuencia un aumento en la relación de estrógenos vs andrógenos que afecta nuevamente el crecimiento de la próstata y que propicia la aparición de trastornos con proliferación celular aumentada tales como HPB y CaP, cuya incidencia es mayor en estas etapas de la vida (Binet, et al., 2017). De hecho, la inducción de proliferación anormal e hipertrofia celular es una respuesta común a los estrógenos en diversos tejidos, por lo que son considerados carcinógenos potenciales (Binet, et al., 2017).

4.4. Hiperplasia prostática benigna

4.4.1. Definición, incidencia y etiología

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es una de las enfermedades urológicas más comunes entre los hombres mayores, con una prevalencia agrupada del 26.2 % en la población masculina (Lee, et al., 2017) y en cuanto a la edad, una prevalencia del 40 y 90 % en la quinta y novena década de la vida, respectivamente (Kahokehr & Gilling, 2014). La HPB se caracteriza por un crecimiento excesivo benigno de tejido prostático alrededor de la uretra que constriñe la abertura uretral, lo que resulta en los síntomas del tracto urinario bajo que incluyen urgencia, frecuencia, nocturia, micción incompleta y flujo urinario débil, que pueden ocurrir complicaciones como retención urinaria, insuficiencia renal y cálculos en la vejiga. La HPB también se ha asociado con otras morbilidades médicas, como el aumento del riesgo de caídas, la reducción de la calidad de vida, así como el aumento del costo anual de atención médica (Lee, et al., 2017).

La HPB es un diagnóstico histológico definido como un aumento en el número total de células epiteliales estromales y glandulares dentro de la zona de transición de la glándula prostática provocando la formación de nódulos grandes y discretos (Manzarbeitia, et al., 2010). La HPB a menudo se confunde con la hipertrofia prostática benigna, que es un

término arcaico que describe un aumento en el tamaño celular en lugar del número celular. Si bien la HPB por sí sola no requiere tratamiento, la obstrucción prostática benigna y la obstrucción de la salida de la vejiga a menudo se asocian con síntomas del tracto urinario bajo, que pueden requerir tratamiento (Carrero-López, et al., 2016).

No todos los hombres con HPB sufren de síntomas del tracto urinario bajo y viceversa, aproximadamente la mitad de los hombres diagnosticados con HPB histopatológica los mostraron en forma moderada o grave (Nazarko, 2004). La etiología exacta es desconocida, sin embargo, la similitud entre la HPB y la morfogénesis embrionaria de la próstata ha llevado a la hipótesis de que la HPB puede ser el resultado de un proceso de inducción embrionario avanzado en la edad adulta de los hombres (Foster, et al., 2018; Makridakis, et al., 2000). Siendo así que esta patología sea considerada, como una parte normal del proceso de envejecimiento en los hombres que depende de las hormonas sexuales. Diversos estudios indican que según pasan los años, se produce una disminución de la proporción testosterona/estrógenos reduciéndose la concentración de la primera mientras aumenta la de los segundos. Además, se produce un aumento en la tasa de conversión de testosterona a dihidrotestosterona por la 5 α -R y la acumulación de ésta produce la proliferación de las células prostáticas dando lugar a la hiperplasia de la glándula (Shuk-Mei, 2004).

Microscópicamente, en la HBP se presenta infiltrado inflamatorio celular mononuclear. Por un lado, se estimulan los factores de crecimiento al producirse linfocinas y por el otro, se activa la cadena del ácido araquidónico (Manzarbeitia, et al., 2010). Se ha evidenciado que la lesión observada en el nódulo mixoide 1 con una matriz celular abundante, es rica en mucopolisacáridos, y con densidad celular escasa correspondiente a elementos fibroblásticos no modificados desde el punto de vista funcional ni fenotípico, aumento en la vascularización capilar y maduración morfológica y funcional de fibroblastos (Manzarbeitia, et al., 2010).

Si bien el agrandamiento de la próstata puede restringir el flujo de orina desde la vejiga, este se puede ver manifestado como un síntoma clínico de la HPB, además se ha establecido en modelos animales que los machos sometidos a castración no desarrollan la HPB al igual que los individuos pseudohermafroditas con mutación en el gen que codifica para la isoenzima 5 α -R2, cuyos niveles de T son normales, mientras que los de DHT son

bajos, confirmando que el andrógeno endógeno DHT juega un papel primordial en el desarrollo de esta patología (Imperato-McGinley & Zhu, 2002). Con esto, se afianza la teoría tradicional de la HPB, que expone que la próstata se agranda por efecto de la DHT, donde la cápsula que la rodea evita que se expanda radialmente resultando en la compresión de la uretra (Manzarbeitia, et al., 2010).

Entre los factores de riesgo para el desarrollo de la HPB, los más importantes son la edad y la presencia de testículos funcionales, afectando a hombres mayores de 45 años. Además, se observa que aquellos individuos con una elevada ingesta de grasas y proteínas de origen animal, y obesidad abdominal, aumentan en un 10 % el riesgo de sufrirla. La raza es otro factor importante, pues es más frecuente en negros americanos y menos en razas orientales, así como la historia familiar de HBP (Chung & Kaplan, 2010). Por otro lado, algunos factores dietéticos (determinados vegetales como la soya) parece que tienen una función protectora frente a la HBP por su contenido en fitoestrógenos, sustancias que ejercen un efecto antiandrogénico en la próstata (Gonzalez, et al., 2007).

La HPB también se asocia a una sobreexpresión de la enzima P450-arom y a la regulación genética anormal en la producción de estrógenos *in situ*, pues se cree que estas hormonas desempeñan un papel crucial en la inducción y desarrollo de trastornos prostáticos dada su actividad proliferadora celular y su acción carcinógena (Pinedo-Pichilingue, et al., 2016). Sin embargo, algunos estudios sobre pacientes con HPB y CaP demostraron que el porcentaje de células estromales positivas para aromatasa no difirió entre ellos, ni tampoco se observó una correlación significativa entre el porcentaje de células positivas a la P450-arom y el grado de diferenciación del carcinoma (Hiramatsu, et al., 1997).

4.4.2. Tratamiento

4.4.2.1. Manejo expectante

Los hombres a los que no les molestan demasiado los síntomas, son adecuados para someterse a tratamiento conservador mediante manejo expectante que incluye educación, vigilancia periódica y asesoría sobre los hábitos de vida y es viable para muchos hombres, ya que tan solo unos pocos, si no se les trata, evolucionarán a una retención urinaria aguda y a complicaciones tales como insuficiencia renal y cálculos. Así mismo, los síntomas de algunos hombres pueden mejorar espontáneamente, mientras que los de otros permanecen estables durante muchos años (Carrero-López, et al., 2016; Nazarko, 2004).

4.4.2.2. Cirugía

La cirugía es uno de los tratamientos de primera elección para aliviar los síntomas de la HPB, una de ellas se efectúa mediante la resección transuretral de la próstata (Figura 4-6), cuando otros métodos como los farmacológicos fallan (Nazarko, 2004). La edad media de los pacientes que se someten a este tratamiento es de aproximadamente 69 años con un promedio de tejido prostático resecado de 22 g (Nazarko, 2004). La técnica quirúrgica consiste en introducir un instrumento llamado resectoscopio dentro del canal de la uretra, el cual cuenta con luz y permite irrigar la zona mientras se realiza el procedimiento. El instrumento tiene un asa eléctrica, que permite cortar la próstata en láminas pequeñas al tiempo que cauteriza los vasos sanguíneos prostáticos. Las laminillas cortadas, se retiran de la vejiga y se envían a laboratorio para su análisis, insertándose un catéter mientras la zona se recupera (Rando, 2002).

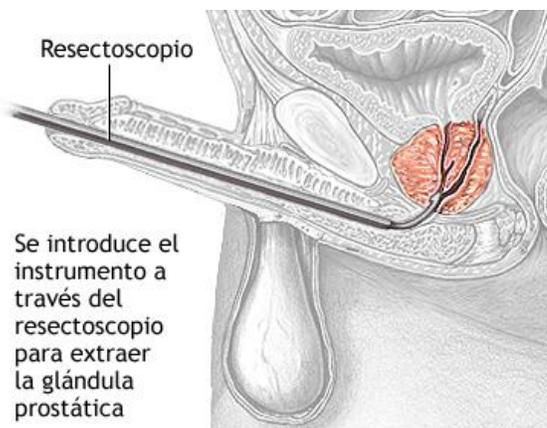


Figura 4-6. Resección transuretral de la próstata (MedlinePlus, 2019).

Otros métodos como la prostatectomía abierta es una de las modalidades más tradicionales como tratamiento quirúrgico en paciente con SOUB secundario a HPB, donde los adenomas son enucleados permitiendo la evacuación sin obstrucción. Otro método como la termoterapia transuretral con microondas, es aquella en la que se emite una radiación microondas con el uso de una antena intrauretral, que incrementa el calor y la temperatura del tejido prostático, que luego es destruido, a pesar de que también se cree que causa apoptosis y denervación de receptores alfa-adrenérgicos que disminuyen el tono del músculo liso de la uretra prostática. La ablación transuretral de próstata con aguja conduce a la necrosis por coagulación dentro de la zona de transición haciendo madurar la cicatriz y reduciendo el volumen de dicha zona (Nazarko, 2004).

La enucleación con láser de holmio (HoLEP), la resección con láser de holmio (HoLRP) y vaporización con láser verde se usan también para este fin. Por ejemplo, con HoLEP se lleva a cabo la destrucción de cálculos en las vías urinarias, pero su uso facultativo sobre la próstata genera coagulación y necrosis del tejido reduciendo significativamente el tamaño de la glándula, una vez la radiación es absorbida por el agua del tejido. Respecto a la HoLRP, esta genera una emisión de energía no térmica muy localizada que conlleva a la destrucción del tejido prostático a través de un corte preciso y eficiente. Por su parte, la PVP induce a la vaporización del tejido prostático a través del incremento súbito de la temperatura tisular que comprometen la estructura del tejido prostático (López-Ramos, et al., 2014).

4.4.2.3. Farmacológico

4.4.2.3.1. Antagonistas de los receptores α 1-adrenérgicos

Los fármacos antagonistas de los receptores α 1-adrenérgicos son considerados la primera línea de tratamiento farmacológico de los SOUB moderados a severos en los hombres (Deters, 2019). Relajan la musculatura lisa de la próstata mediante antagonismo de los receptores alfa adrenérgicos (Deters, 2019). Los tres subtipos del receptor α 1, incluyen 1a, 1b, y 1c, de éstos, el receptor α 1-1a es el que se encuentra específicamente en el cuello de la vejiga y de la próstata. Algunos ejemplos de estos fármacos son la alfuzocina, doxazosina, tamsulosina (Figura 4-7) y terazonsina. Aunque son igual de efectivos, hay ligera diferencia en cuanto a los efectos secundarios y sus indicaciones; las ventajas que presentan están relacionadas con una mejoría moderada de los síntomas de la HPB, pero no atacan como tal su causa, además de que presentan efectos secundarios como problemas estomacales o intestinales, congestión nasal, dolor de cabeza, mareo y cansancio (Deters, 2019). Un porcentaje menor de pacientes puede llegar a tener disminución en la presión arterial y trastornos de la eyaculación dado su efecto periférico.

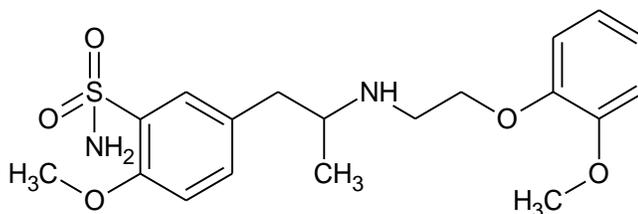


Figura 4-7. Estructura del antagonista de los receptores α 1-adrenérgicos tamsulosina.

4.4.2.3.2. Inhibidores de la 5alfa-reductasa

Se prescriben a pacientes con síntomas obstructivos moderados a severos del tracto urinario bajo y próstata de gran tamaño (> 40 mL). Estos agentes previenen la progresión de la enfermedad en términos de retención urinaria y necesidad de cirugía (Deters, 2019; Alcántara & Müller, 2019). Como se mencionó, los efectos androgénicos sobre la próstata se encuentran mediados por la DHT, que se biosintetiza principalmente en las células del estroma prostático a partir de su precursor testosterona por acción de la 5alfa-reductasa (Alcántara & Müller, 2019). Existen tres isoformas de esta enzima (Chávez, et al., 2015): 5alfa-reductasa tipo 1, con una expresión baja en la próstata y con actividad predominante en tejidos extraprostáticos, como piel e hígado; la 5alfa-reductasa tipo 2, con una expresión y actividad predominantes en la próstata y la 5alfa-reductasa tipo 3, con expresión y actividad predominantes en cáncer de próstata resistente a castración (Gu, et al., 2013).

Estos inhibidores actúan induciendo la apoptosis de las células epiteliales de la próstata, provocando reducción del tamaño prostático entre el 15 y 25 % y del PSA en un 50 % después de 6 meses de tratamiento (Alcántara & Müller, 2019). La reducción media del volumen prostático puede ser incluso más pronunciada después del tratamiento a largo plazo. Hay dos fármacos disponibles para uso clínico: dutasterida (inhibidor dual de la isoforma 1 y 2) (Figura 4-8a) y finasterida (inhibidor de la isoforma 2) (Figura 4-8b). En estudios comparativos con los fármacos antagonistas de los receptores α 1-adrenérgicos, se ha demostrado que estos agentes reducen los síntomas más lentamente, pero reducen el riesgo a largo plazo (> 1 año) de retención urinaria aguda, así como la necesidad de cirugía.

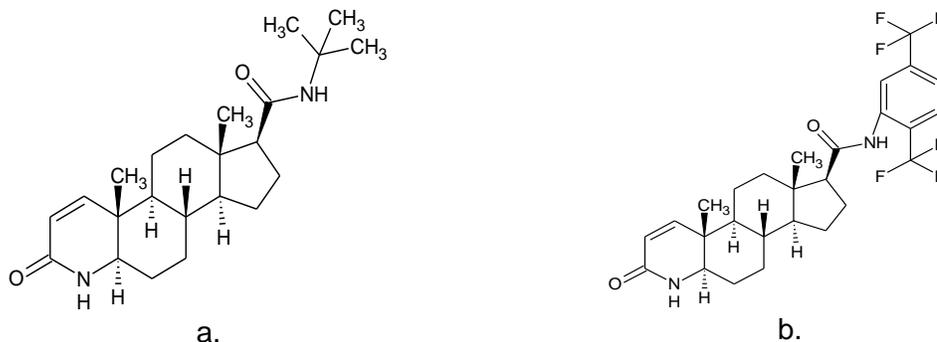


Figura 4-8. Estructuras de los inhibidores de 5alfa-reductasa finasterida (a) y dutasterida (b).

Sus efectos adversos más importantes están relacionados con la función sexual y consisten en disminución de la libido y disfunción eréctil, y con menos frecuencia, trastornos de la eyaculación y ginecomastia en aproximadamente el 2 % de los pacientes (Alcántara & Müller, 2019).

4.4.2.3.3. Antagonistas del receptor muscarínico

Estos agentes pueden ser considerados para hombres con síntomas obstructivos moderados del tracto urinario bajo, que sean predominantemente de almacenamiento. Usándose con precaución en hombres con obstrucción del tracto urinario de salida (Steven & Kaplan, 2007). El neurotransmisor predominante en la vejiga urinaria es la acetilcolina, que agoniza los receptores muscarínicos en la superficie de las células musculares lisas del detrusor. En el humano se han descrito 5 subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) siendo M2 y M3 predominantemente expresados en dicho lugar (Deters, 2019) cuyo antagonismo disminuye la contracción de la vejiga hiperactiva. Los fármacos que se encuentran autorizados son la oxibutinina HCl, tartrato de tolterodina, cloruro de trospio y bromhidrato de darifenacina (Figura 4-9) (López-Ramos, et al., 2014).

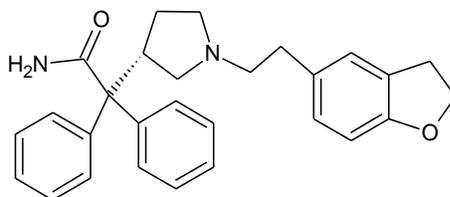


Figura 4-9. Estructura de la darifenacina, antagonista del receptor muscarínico.

Los acontecimientos adversos relacionados con estos fármacos se relacionan con sequedad de boca, estreñimiento, dificultad en la micción, infección de vías respiratorias superiores y mareo (Steven & Kaplan, 2007).

4.4.2.3.4. Inhibidores de la 5-fosfodiesterasa

Estos agentes reducen los síntomas moderados a severos del tracto urinario bajo en hombres con o sin disfunción eréctil, secundarios a crecimiento prostático benigno pues inhiben a la enzima presente en el cuello vesical, la uretra prostática y la próstata, generando un efecto relajante muscular por aumento intracelular de guanosil monofosfato cíclico (GMPc). El fármaco tadalafilo (Figura 4-10) es el que más estudios presenta al respecto (Astobieta-Odriozola, et al., 2007).

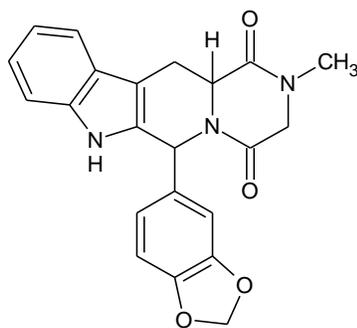


Figura 4-10. Estructura del tadalafilo, inhibidor de la 5-fosfodiesterasa.

4.4.2.3.5. Terapia combinada

Consiste en el empleo de antagonistas α -adrenérgicos (alfuzosina, doxazosina, tamsulosina o terazosina) con inhibidores de la 5 α R (dutasterida o finasterida). El bloqueador α -adrenérgico demuestra un efecto en horas o días, mientras que el inhibidor de 5alfa-reductasa necesita varios meses para desarrollar eficacia (Chung & Kaplan, 2010). De todas las combinaciones posibles, finasterida junto con alfuzosina, doxazosina o terazosina o dutasterida junto con tamsulosina, han sido probados en estudios clínicos (López-Ramos, et al., 2014). La terapia combinada es muy efectiva para prevenir problemas agudos como la retención urinaria y en cierta forma puede reducir la necesidad de cirugía en un futuro, sin embargo, una desventaja es que se puede presentar los efectos secundarios de ambos tratamientos (Chung & Kaplan, 2010).

También se puede emplear un bloqueador α -adrenérgico junto a un antagonista de receptores muscarínicos para antagonizar de manera conjunta dichos receptores en el tracto urinario bajo. Únicamente la combinación doxazosina, tamsulosina o terazosina con oxibutinina o tolterodina han sido probados en ensayos clínicos (López-Ramos, et al., 2014).

4.4.2.3.6. Inhibidores de aromatasa

En los hombres, los inhibidores de aromatasa (P450-arom) pueden ser útiles para afecciones asociadas con el exceso de estrógenos, como la ginecomastia y la oligospermia (Ingólfssdóttir, et al., 2002). También se ha sugerido que podrían ser valiosos en el cáncer de próstata y la HPB (Brodie, et al., 2009) pues dicha enzima está presente en el estroma prostático a pesar de estar en muy baja concentración. Adicionalmente, el estrógeno sintetizado en otros tejidos, como el adiposo y los testículos (donde también existe

aromatasa), podría influir en el crecimiento de la próstata por lo cual, se sugiere podrían ser agentes útiles en el tratamiento de estos padecimientos. (Brodie, et al., 2009).

Un estudio mostró que los hombres maduros de 60 años o más con niveles bajos de testosterona que tomaron anastrozol (Figura 4-11) durante 12 meses exhibieron una reducción en los niveles séricos de estradiol sin un aumento significativo en los síntomas de BPH (Burnett-Bowie, et al., 2009). Sin embargo, la evidencia es inconsistente con respecto a la eficacia de la terapia con inhibidores de la aromatasa en la HPB, ya que estos medicamentos pueden aumentar los niveles de DHT (Nicholson & Ricke, 2011) que podrían modularse con inhibidores de la 5alfa-reductasa. Por lo tanto, los hombres que tienen HPB y cuyos niveles de estradiol están por encima del rango óptimo (20 a 30 pg/mL) podrían ser tratados con dicha combinación. Debido a que el uso de inhibidores de P450-arom podría afectar negativamente la masa ósea, la evaluación de la densidad mineral ósea y la evaluación del riesgo de fractura deben ser garantizados antes de recomendar el uso clínico de estos agentes incluso en ausencia de daño a la próstata (Nicholson & Ricke, 2011).

Entre los inhibidores de P450-arom está la testolactona, que ejerce efecto inhibitor no competitivo y efectos secundarios como anorexia, náuseas, vómito y malestar general (Alcántara & Müller, 2019). Otro principio activo es el atamestano, un inhibidor irreversible competitivo que presenta menos efectos adversos (Burnett-Bowie, et al., 2009). Si bien se ha evidenciado que al bloquear la producción de estrógenos mediante inhibición de la P450-arom se generan cambios en el estroma del tejido prostático, lo cual se ha establecido como una alternativa clínicamente útil, hoy en día el uso de estos inhibidores no es común en la práctica médica, quedando comúnmente como un último recurso de manejo en el tratamiento para HPB (Ghosh, et al., 2016).

Otros inhibidores de la P450-arom son los de tercera generación, quienes se clasifican en competitivos que se unen al sitio activo de la enzima y no competitivos que destruyen la enzima uniéndose covalentemente a ella. Entre los primeros está el anastrozol y letrozol y en los segundos el exemestano (Alcántara & Müller, 2019).

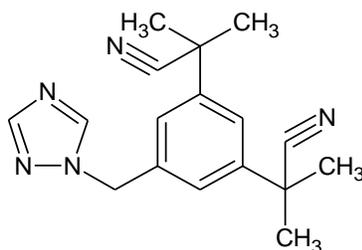


Figura 4-11. Estructura del anastrozol, inhibidor de la enzima aromatasa.

4.5. Cáncer de próstata

4.5.1. Definición, incidencia y etiología

El cáncer de próstata (CaP) es uno de los tipos más comunes de cáncer en los hombres (Denmeade & Isaacs, 2002). A nivel mundial es el más prevalente en los hombres maduros y ocupa el sexto lugar en cuanto a la mortalidad atribuida a cáncer (World Health Organization, 2019a). Su incidencia y mortalidad se correlaciona con el aumento de la edad, con una edad promedio al momento del diagnóstico de 66 años. Es de destacar que, para los hombres afroamericanos, las tasas de incidencia son más altas en comparación con los blancos, con 158.3 casos nuevos diagnosticados por cada 100000 hombres y mortalidad de aproximadamente el doble. A pesar de que se estiman 2293818 nuevos casos de CaP para el año 2040, se espera una pequeña variación en la mortalidad con tendencia a la baja dado el avance en los métodos para su diagnóstico temprano (Rawla, 2019; Ramirez, 2013).

En Colombia y Latinoamérica, el CaP también ocupa el primer lugar en cuanto a su prevalencia en hombres y el segundo en las defunciones con tendencias a incrementarse (World Health Organization, 2019a). Este comportamiento contrasta con países como Estados Unidos, Reino Unido y Canadá, donde la mortalidad por este cáncer muestra un descenso en los últimos años, atribuido a los avances en los tratamientos y a las actividades de detección temprana (American Cancer Society, 2018).

Aunque las tasas de incidencia de CaP son altas, la mayoría de los casos se detectan cuando está confinado a la próstata (García, 2013). La tasa de supervivencia a 5 años en los Estados Unidos para los hombres diagnosticados es de alrededor del 98 %. Los datos del proyecto Eurocare (EUROCARE-5) de pacientes diagnosticados con cáncer de

próstata entre 2003 y 2007 mostraron que las tasas de supervivencia a 5 años fueron del 83 % (Rawla, 2019).

Por lo general, el CaP se desarrolla lentamente limitándose inicialmente a la glándula prostática, donde no causa daños graves. Sin embargo, aunque algunos tipos de cáncer de próstata progresan de esta forma y pueden no necesitar de tratamiento, otros son agresivos y se propagan rápidamente (Rawla, 2019).

Existe una gran cantidad de datos que respaldan el papel de los andrógenos en la patogénesis y progresión de esta enfermedad entre ellos la "hipótesis de los andrógenos". En 1941, Huggins y Hodges (Denmeade & Isaacs, 2002) propusieron que el CaP es impulsado por los andrógenos, después de observar los beneficios de la castración en pacientes con este cáncer (Denmeade & Isaacs, 2002). Datos *in vitro* obtenidos de estudios realizados sobre líneas celulares de CaP diferenciadas, mostraron que responden a la estimulación de andrógenos y sufren apoptosis tras su retirada. Del mismo modo, los estudios *in vivo* también han mostrado que las hormonas T y DHT promueven la tumorigénesis y el crecimiento de xenoinjertos en modelos animales, mientras que la privación de andrógenos promueve la regresión tumoral (Rawla, 2019).

Por otro lado, algunos estudios encontraron que en los pacientes con CaP los niveles de T y DHT eran bajos, sugiriendo que hormonas no androgénicas como los estrógenos, la insulina y la vitamina D, pueden estar involucradas en dicha carcinogénesis (García, 2013). Como se mencionó, varios estudios han demostrado que los estrógenos, incluyendo a E₂, inducen lesiones genéticas, alteraciones cromosómicas, daño en el ADN e inestabilidad de microsatélites estableciendo su papel carcinogénico (Denmeade & Isaacs, 2002). Si bien algunos cambios malignos en la glándula prostática dependen de la respuesta androgénica y estrogénica, ninguna de las hormonas por sí sola es suficiente para provocar patrones de crecimiento aberrantes que produzcan malignidad (Nelson, 2016).

La mayoría de los tipos de CaP expresan receptores de andrógenos y retroceden al retirarlos (Gao, 2010), por ello, se tratan con terapia hormonal dirigida a su supresión, al bloqueo del RA o una combinación de estos. El uso de fármacos antagonistas evita que el RA se active, impidiendo también la expresión de genes como el PSA y el factor de transcripción NK3 locus 1 (NKX_{3.1}) en la próstata humana los cuales regulan el desarrollo y progresión de las células prostáticas normales, benignas y/o malignas (Gao, 2010).

Inicialmente se presenta una respuesta benéfica con la terapia hormonal dirigida a la supresión o bloqueo del RA, pero con el tiempo el CaP inevitablemente, progresa a lo que ahora se denomina "cáncer de próstata resistente a la castración" (CRPC) que sorprendentemente retiene la expresión funcional del RA. Algunas explicaciones de este comportamiento son: a) hay amplificación y sobreexpresión del gen del RA que hace aumentar la sensibilidad de las células de CaP a bajas concentraciones de andrógenos circulantes extra-gonadales. b) Ocurren mutaciones en el gen del RA que cambian la especificidad del receptor hacia los antiandrógenos viéndose activado cuando interactúa con estos últimos. c) El CaP independiente de andrógenos podría progresar, en ausencia de mutaciones en el gen, a través de la activación de receptores de andrógenos independientes de ligando que señalizan todas las vías de activación. d) La expresión de las proteínas coactivadores y correpresores podría modificarse afectando la señalización del RA (Gao, et al., 2005). Como consecuencia, para combatir el CRPC, una avalancha de nuevos descubrimientos y desarrollo de fármacos ha producido inhibidores de la biosíntesis de andrógenos, como la abiraterona, y los antagonistas del RA mutado como la enzalutamida (Berlin & Fernández, 2015).

Estudios recientes postulan que las células de carcinoma de próstata pueden ser sensibles a los estrógenos provocando su proliferación, una vez se comienza con la terapia de privación de andrógenos (Convalía, et al., 2017). Por lo tanto, una estrategia efectiva para frenar el crecimiento del carcinoma de próstata en esta etapa sería la inhibición de la síntesis de estrógenos (Gómez-Chang, et al., 2012). Esta hipótesis surgió de los análisis estructura-función del RA, que establecen la ubicación de mutaciones puntuales del RA, que le permiten responder al estrógeno, como un promotor dependiente de ligando de la transcripción inducida por el receptor de andrógenos. La mutación puntual localizada en el aminoácido en posición 868 del RA, cambia su especificidad frente al ligando y permite que tanto el E₂ como el antiandrógeno flutamida estimulen la transcripción (Brodie, et al., 2009). Por lo tanto, se asume que al verse aumentados los niveles del RA en la próstata, los estrógenos de una cierta manera terminan participando en el incremento de la función secretora del epitelio de la próstata (Brodie, et al., 2009).

Adicionalmente, en la próstata hay presencia de receptores de estrógenos (RE) que al ser activados por dichas hormonas, ejercen un efecto proliferativo de la glándula (Espinoza, et al., 2013). Por lo tanto, las combinaciones de estrógenos con andrógenos parecen ejercer

una sinergia para la transformación maligna de las células epiteliales de la próstata (García-Figueredo, et al., 2015). Los dos tipos principales de receptores, RE α y RE β , se expresan en la próstata humana normal y la enferma, aunque con una localización celular diferente, dado que estos dos receptores son distintos en términos de unión al ligando, heterodimerización, transactivación y actividad del elemento de respuesta de estrógenos; y es probable que un desequilibrio de estos receptores en su expresión pueda ser crítica para determinar los efectos finales de los estrógenos en las células de CaP (Espinoza, et al., 2013). La activación del RE β parece limitar la proliferación celular directamente, por lo que su pérdida se ha asociado con la progresión tumoral (Carruba, 2007).

4.5.2. Tratamiento

4.5.2.1. Cirugía

La cirugía es una alternativa para el tratamiento del CaP siempre y cuando aún no haya presentado metástasis. La prostatectomía radical retropúbica y perineal, son los dos tipos de cirugías más recurrentes y consisten en hacer una incisión en la parte baja del abdomen (retropúbica) o sobre el perineo (perineal) (Figura 4-12). Adicionalmente, si el cáncer se hubiese propagado a los ganglios linfáticos cercanos, el personal médico decide extirpar algunos de ellos (Barceló, et al., 2014; American Cancer Society, 2018).

En la prostatectomía radical laparoscópica se realizan incisiones pequeñas en el abdomen para insertar laparoscopios y extirpar la próstata. Presenta ventajas sobre la prostatectomía radical abierta, una vez que se evita la pérdida de sangre y se logra paliar el dolor causado por la intervención quirúrgica. También permite una recuperación más corta (American Cancer Society, 2018; Mottet, et al., 2011).

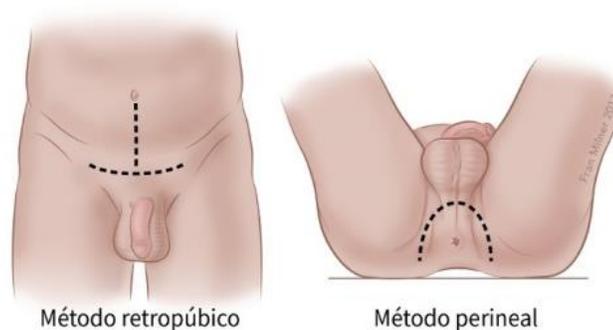


Figura 4-12. Prostatectomía radical retropúbica y perineal (American Cancer Society, 2018).

4.5.2.2. Radioterapia

En este tratamiento se usan imágenes diagnósticas, para administrar altas dosis de radiación sobre la región de la próstata donde se presenta el cáncer. A menudo se administra radiación gamma knife, x-knife, ciberknife y clinac con la ventaja de que toma menos tiempo la recuperación respecto a la cirugía (American Cancer Society, 2017). También se puede emplear radioterapia con rayos de protones, la cual causa poco daño en el tejido (American Cancer Society, 2017).

4.5.2.3. Crioterapia

La crioterapia (criocirugía o crioablación) emplea temperaturas muy bajas para congelar y eliminar las células cancerosas de la próstata, y a pesar de que a veces se le denomina criocirugía, no es precisamente un tipo de cirugía. Es una terapia que se utiliza en etapa inicial de CaP, pero también es una opción si el cáncer ha regresado después de la radioterapia pero no es una buena opción para los hombres que tienen glándulas prostáticas muy grandes (Bjerklund, 2007).

Para este procedimiento se requiere de anestesia epidural o general y se usa ecografía transrectal para guiar sondas huecas por el ano y el escroto hasta la próstata, a través de las que se pasan gases a temperaturas muy bajas para congelar y destruir la próstata. Al tiempo que se hace circular solución salina tibia en la uretra a través de un catéter, para evitar que la uretra se congele, y el catéter se deja allí por varias semanas permitiendo que la vejiga se vacíe mientras el paciente se recupera. Este tratamiento es ambulatorio y menos invasivo que la cirugía, pero no es eficaz para los tumores de próstata en etapa avanzada (American Cancer Society, 2018).

4.5.2.4. Farmacológico

La terapia hormonal, también llamada terapia de privación de andrógenos, se utiliza en caso de que la cirugía no sea una opción para el paciente o como tratamiento inicial en el caso de detectar metástasis, niveles de PSA altos o para reducir el tamaño del tumor (Heidenreich, et al., 2011; Barceló, et al., 2014).

4.5.2.4.1. Fármacos agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas

Los fármacos agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), reducen los niveles de T después de una exacerbación en los niveles de la misma, permitiendo que el paciente conserve los testículos, aunque su tamaño se reduce de tal manera que pueden dejar de ser palpados, además causa dolor en los huesos. Entre estos medicamentos se encuentran la leuprolida (Figura 4-13a), goserelina, triptorelina e histrelina. Por otro lado, los antagonistas de LHRH como el degarelix (Figura 4-13b), se usan para reducir los niveles de T sin causar exacerbación primaria, sin embargo, su uso puede producir aumento en la producción de enzimas hepáticas (Mottet, et al., 2011).

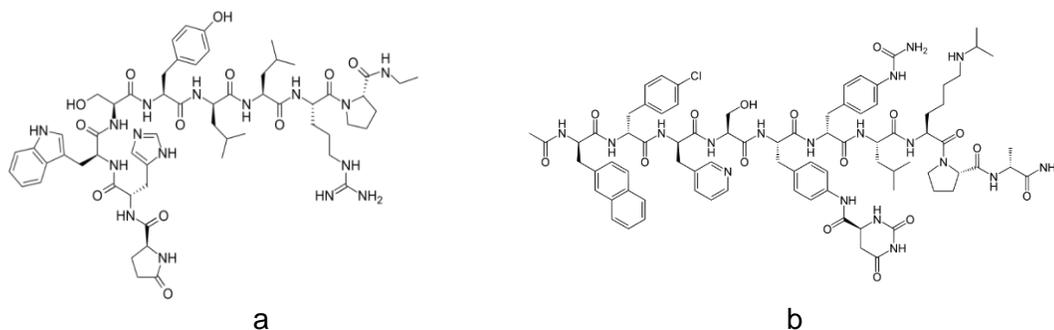


Figura 4-13. Estructura de la leuprolida (a) y degarelix (b).

4.5.2.4.2. Fármacos antiandrógenos

Los fármacos antagonistas del RA evitan su activación y transcripción génica y con ello que se produzca la respuesta androgénica. Entre estos se encuentran la flutamida, bicalutamida y nilutamida así como otros más recientes entre ellos la enzalutamida y la apalutamida (Yamaguchi, et al., 2019).

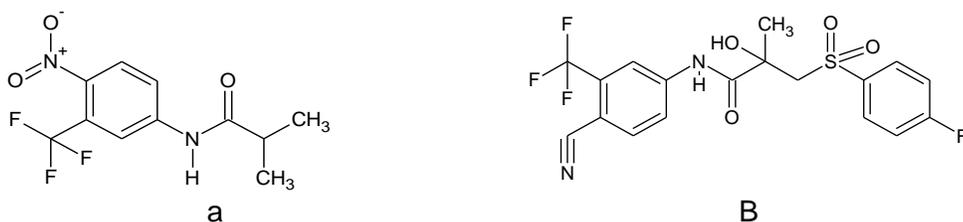


Figura 4-14. Estructuras de antiandrógenos flutamida (a) y bicalutamida (b).

Fármacos como la flutamida (Figura 4-14a) o bicalutamida (Figura 4-14b), luego de unirse al RA generan un complejo no funcional con el mismo que evita la activación génica a pesar de translocarse al núcleo de la célula blanco de andrógenos. Además, presentan

actividad agonista sobre RA mutado en caso de resistencia. La enzalutamida bloquea al RA de manera más eficiente que la bicalutamida porque es más afín por éste, generando también un complejo no funcional que no puede translocarse al núcleo. También antagoniza al RA mutado o sobre expresado en caso de resistencia, por lo cual, carece de carácter agonista parcial sobre éste (Figura 4-15) (Yamaguchi, et al., 2019; Davis, et al., 2019; Lamb & Neal, 2013).

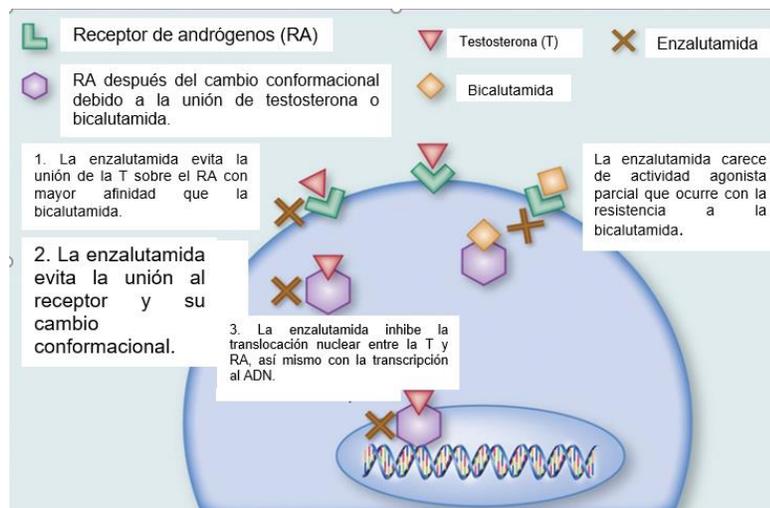


Figura 4-15. Mecanismo de acción de antiandrogénicos bicalutamida y enzalutamida (Hoffman-Censits, 2013).

4.5.2.4.3. Otros fármacos utilizados que reducen los niveles los niveles de andrógenos no testiculares

Se utilizan fármacos agonistas y antagonistas de la LHRH con la finalidad de que los testículos dejen de producir andrógenos. Sin embargo, en células de otras partes del cuerpo, como las glándulas suprarrenales y las mismas células cancerosas de la próstata, estas, pueden continuar produciendo hormonas masculinas a lo que puede estimular el crecimiento del cáncer (Alcaraz, et al., 2012). Para ello, actualmente se dispone de alternativas farmacológicas que actúan evitando la producción de andrógenos dados por estas células (Arrabal-Martína, et al., 2014). Como ocurre con la abiraterona y el ketoconazol, cuyo propósito farmacológico consiste en disminuir los niveles circulantes de andrógenos a través de la inhibición de su biosíntesis (Alcántara & Müller, 2019).

El CaP en algunas ocasiones puede mantener activada la señal mediada por el receptor androgénico, a pesar de presentarse niveles de castración adecuados. Por lo que esta producción de andrógenos puede deberse a la sobreexpresión del citocromo P-450c17

(CYP17), la cual es una enzima clave para la síntesis de andrógenos extragonadales a nivel suprarrenal, prostático e intratumoral (Arrabal-Martína, et al., 2014). Por consiguiente, al usar como tratamiento el acetato de abiraterona, este actúa como un inhibidor de la CYP17- α -hidroxilasa y la C17, 20-liasa que es capaz de evitar la síntesis extragonadal de andrógenos (Figura 4-17) (Caro, et al., 2014) .

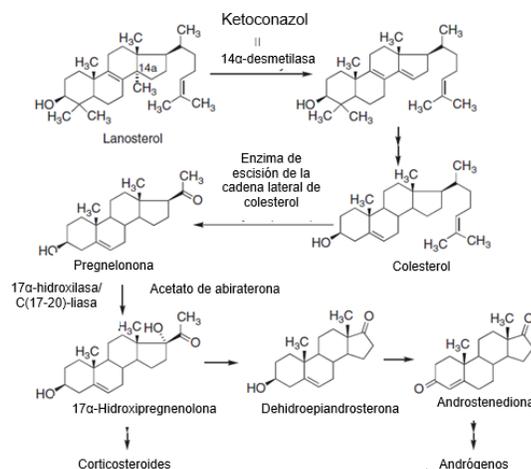


Figura 4-16. Inhibición de la 14 α -desmetilasa por el ketoconazol y la 17 α -hidroxilasa/C(17, 20)-liasa por el acetato de abiraterona (Avendaño & Menéndez, 2008).

El ketoconazol (Figura 4-16), es un fármaco antifúngico que ha sido utilizado como maniobra hormonal de segunda línea, ya que inhibe la 11-beta-hidroxilasa, el metabolismo de colesterol a pregnenolona y el CYP17. Es usado en algunas ocasiones para inhibir las enzimas dependientes del sistema del citocromo P450 que participan en la esteroideogénesis gonadal y adrenal (Arrabal-Martína, et al., 2014; Huguet, et al., 2006). Su uso ofrece a los hombres un tratamiento alternativo cuando estos son recientemente diagnosticados con cáncer de próstata avanzado, luego actúa a través de la disminución en los niveles de testosterona de una manera más rápida (Nelson, 2016).

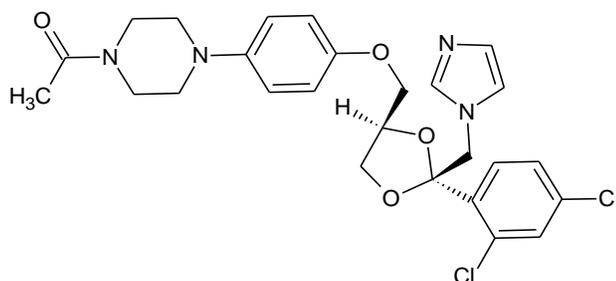


Figura 4-17. Estructura del ketoconazol.

4.6. Líquenes

Los líquenes u hongos liquenizados son organismos resultantes del consorcio entre un micobionte y uno o más organismos autótrofos fotosintéticos llamados fotobionte. El micobionte lo conforma un basidiomiceto y/o una levadora mientras que el fotobionte, un alga verde y/o una cianobacteria (Figura 4-18) (Spribille, et al., 2016; Pennisi, 2016). Como resultado de la asociación entre el micobionte y el fotobionte, se origina un nuevo ser de anatomía y morfología diferente a los organismos que le dieron origen, capaz de colonizar todo tipo de hábitats, bajo los cuales otros organismos, incluyendo a los propios constituyentes del liquen por separado, no podrían sobrevivir (Valencia-Islas, et al., 2007). Lo anterior debido a que en la asociación liquénica, el micobionte tiene el propósito de proteger al fotobionte frente a la exposición recurrente de la luz solar, la desecación y apoya en los procesos de absorción de nutrientes y minerales presentes en las superficies, mientras tanto, el fotobionte sintetiza y brinda nutrientes al micobionte partir de compuestos orgánicos como el dióxido de carbono y el nitrógeno atmosférico (Toledo, et al., 2004). Los metabolitos secundarios en el liquen son producidos por el micobionte y almacenados en las paredes de las hifas (talo). Estas sustancias liquénicas son importantes tanto para la simbiosis como para la química-ecología de los líquenes, una vez que estos compuestos actúan como alomonas, las cuales les permiten el desarrollo de ventajas adaptativas debido a sus actividades alelopáticas, fago-inhedoras, alérgicas y fotoprotectoras (Toledo, et al., 2004).

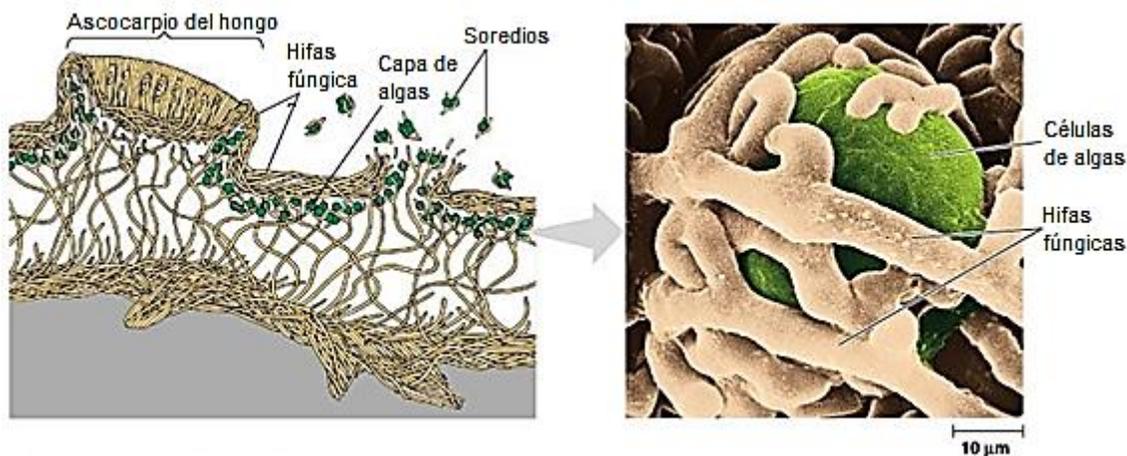


Figura 4-18. Estructura anatómica de líquenes (Cummings, 2002).

El cuerpo del líquen es denominado talo, y este generalmente consta de capas como la corteza superior e inferior, constituida de capas de algas y una médula (Barreno & Pérez-Ortega, 2003). En la naturaleza, los líquenes crecen muy lentamente. Su crecimiento radial se mide en milímetros por año. El líquen crece prácticamente en todas partes, sobre y dentro de las rocas, en el suelo y la corteza de los árboles, en casi cualquier objeto inanimado (Rankovic´ & Kosanic´, 2015). Se estima, que aproximadamente el 8 % del total de la superficie terrestre está ocupada por líquenes como organismos dominantes (Barreno & Pérez-Ortega, 2003). Se han descrito alrededor de 18500 especies diferentes de líquenes en todo el mundo y se estima que actualmente el número total de especies de líquenes en Colombia es alrededor de 3600 especies, de las cuales solo 1674 han sido catalogadas (Bernal, et al., 2016; Lücking, et al., 2019). Lo cual convierte a Colombia en uno de los países más ricos en líquenes después de Brasil, a pesar de la baja exploración botánica llevada a cabo a la fecha.

4.6.1. Usos de los líquenes

Los líquenes se han empleado a lo largo de la historia como alimento, en las prácticas médicas populares para la preparación de remedios para paliar diferentes problemas de salud, con fines cosméticos, en rituales, como adorno, para la obtención de tintes, para medir edades geológicas y monitorear la contaminación ambiental (Barreno & Pérez-Ortega, 2003).

Existen registros de usos medicinales de líquenes en culturas de África, Europa, Asia, Oceanía, América del Norte y América del Sur. La mayoría de estos usos se encuentran en América del Norte, Europa, India y China, pero esto es más probable porque es donde se ha realizado la mayor parte del trabajo etnográfico (Barreno & Pérez-Ortega, 2003). Curiosamente, no se han encontrado registros de ningún uso tradicional de líquenes en Australia (Rankovic´ & Kosanic´, 2015).

Los líquenes a menudo se usan tópicamente para curar heridas, ya sea como desinfectante o para detener el sangrado, para tratar infecciones de la piel y llagas, incluyendo en la boca. Este uso es evidente en el nombre de líquen (de *leikhe- n*, "lo que se come a su alrededor"), que proviene de la práctica griega antigua de usar una criptógama para curar una enfermedad de la piel (Illana-Esteban, 2012). Los líquenes a menudo se beben como una decocción para tratar enfermedades relacionadas con los

pulmones o el sistema digestivo (Duran & Brodo, 2019). Esto es particularmente común en Europa, pero también se encuentra en todo el mundo. Muchos otros usos de los líquenes están relacionados con la obstetricia o el tratamiento de problemas ginecológicos (Xu, et al., 2016). Esto puede estar relacionado con el uso común de líquenes para tratar infecciones de transmisión sexual y dolencias del sistema urinario.

El género de líquenes más empleado en la medicina tradicional es *Usnea*, que se conoce como liquen antibiótico dado su alto contenido de ácido úsnico que a su vez posee propiedades antimicrobianas (Duran & Brodo, 2019). Especies como *Cetraria islándica* y *Lobaria pulmonaria* son empleadas en medicina tradicional de diversas regiones del mundo para el tratamiento de enfermedades respiratorias. Otras como *U. longissima* y *Peltigera aphthosa* se emplean para el tratamiento de úlceras en la piel y mucosas (Nash, 1976). *Parmelia saxatilis* para eliminar verrugas en las manos; *Ramalina bourgeana* como diurético y *Lethariella cladonioides* para eliminar dolor de garganta, los vértigos y la neurastenia (Illana-Esteban, 2012). En Asia, el preparado ayurveda Speman® contiene la especie *Parmelia perlata* y es empleada para aliviar los síntomas de la hiperplasia prostática benigna (Marya, et al., 1995).

Muchos países han desarrollado productos farmacológicos comerciales basados en sustancias liquénicas. Por ejemplo, el ácido úsnico se utilizó en productos antisépticos en Alemania e Italia. Sin embargo, a altas dosis, se ha demostrado que el ácido úsnico exhibe efectos tóxicos y hepatotoxicidad fatal en ratones. Los líquenes islandeses se comercializaron en la formulación de remedios para el resfriado (Duran & Brodo, 2019). En Japón, se utilizaron extractos o sustancias de liquen en cosméticos, productos farmacéuticos y productos nutracéuticos. Los antibióticos de riminofenazina, ejemplificados por la clofazimina (Lamprene®), se desarrollaron como fármacos antimicobacterianos. La actividad antituberculosa de estos fármacos se debió a los compuestos activos diploicina y depsidona extraídos del liquen irlandés *Buellia canescens* (Rankovic´ & Kosanic´, 2015).

Es probable que muchos de los usos medicinales tradicionales de los líquenes estén relacionados con sus metabolitos secundarios, muchos de los cuales se sabe que son fisiológicamente activos y que actúan como antibióticos (Illana-Esteban, 2012). Sin embargo, algunos de los usos tradicionales de los líquenes también se basan en las

cualidades de los carbohidratos de líquen. En particular, las liqueninas son comunes en las Parmeliaceae y tienen una capacidad notable para absorber agua y formar un gel. Muchos de los usos tradicionales de los líquenes implican hervir el líquen para crear un mucílago que se bebe para enfermedades pulmonares o digestivas o se aplica tópicamente para otros problemas (Rankovic´ & Kosanic´, 2015).

Son escasas las especies de líquenes consumidas por el hombre ya que algunas pueden presentar componentes alérgenos o sustancias irritantes. Líquenes como el *Aspicilia jussufii*, *Cetraria islándica*, *Lobaria pulmonaria*, *Bryoria fremontii* y *Thamnolia vermicularis* son consumidas en países como Irak, Islandia, Francia, Rusia, Siberia y China como aditivos de harinas y chocolates o como especias (Illana-Esteban, 2009). Varias especies son empleadas para alimentar el ganado, en especial para rumiantes de las zonas de taiga y tundra ártica, siendo los géneros de *Cladonia* la más relevante para este propósito (Rankovic´ & Kosanic´, 2015; Illana-Esteban, 2009) por ser fuente rica de carbohidratos (Illana-Esteban, 2009).

Otros líquenes como *Cladina rangiferina* son usadas para la preparación de bebidas como el brandis, la *Parmelia paraguariensis* es usado de modo similar al tabaco, *Parmelia spp* en sistemas de medicina ayurvédica y unani, *Pseudevernia furfuracea* como aromatizante o fragancia en embalsamamiento egipcio, *Xanthoria* su uso en la casería como de madrigueras de marmotas, *Lobaria pulmonaria*, *Usnea subfusca*, *Usnea variolosa* en preparación de bebidas como la cerveza; *Anaptychia ciliaris*, *Lobaria pulmonaria*, *Parmelia karatschadalis*, *Parmotrema chinense*, *Xanthoria parietina* para la cosmética como polvo destinado en la limpieza del cabello. *Cetraria islandica*, *Flavocetraria nivalis*, *Cladina spp* en la alimentación de animales domésticos; *Cladina stellaris*, *Parmelia saxatilis*, *Xanthoria parietina* en decoración y para la obtención de tintes la *Arctoparmelia centrifuga*, *Aspicilia calcarea* entre otras (Duran & Brodo, 2019).

4.6.2. Sustancias de origen líquénico y su actividad biológica

La mayoría de los compuestos orgánicos que se encuentran en los líquenes son metabolitos secundarios y pueden encontrarse en cantidades sustanciales entre 0.1 y 10 % de su peso seco (Rankovic´ & Kosanic´, 2015). Se conocen más de 800 metabolitos secundarios de los líquenes, la mayoría son exclusivos de estos organismos y solo una

pequeña minoría son producidos por otro tipo de hongos o plantas superiores. Su biosíntesis es compleja y está influenciada de manera diversa por factores ambientales, como la luz, la exposición a los rayos UV, la elevación, las fluctuaciones de temperatura y la estacionalidad (Raggio, 2013). Las rutas biosintéticas a través de las cuales se biosintetizan estos metabolitos comprenden la del polimalonato, shikimato y mevalonato.

Las clases más abundantes de metabolitos de líquenes son los dépsidos y depsidonas, que están compuestos por dos subunidades fenólicas tipo orcinol o β -orcinol (Figura 4-19), que a su vez, varían en la longitud y estado de oxidación de sus sustituyentes en la posición 3 y/o 6 del anillo aromático, respectivamente (Raggio, 2013). Estos se biosintetizan a partir de la ruta del acetato polimalonato.



Figura 4-19. Estructuras del orcinol (a) y β -orcinol (b).

Los compuestos tipo dibenzofurano, como el ácido úsnico también se biosintetizan por dicha ruta, pero a partir de dos unidades de metilfloroacetofenona (Figura 4-20) (Calcott, et al., 2018), y se sabe que derivan de una reacción de metilación previa a la aromatización, no por metilación de floroacetofenona (Dewick, 2009).

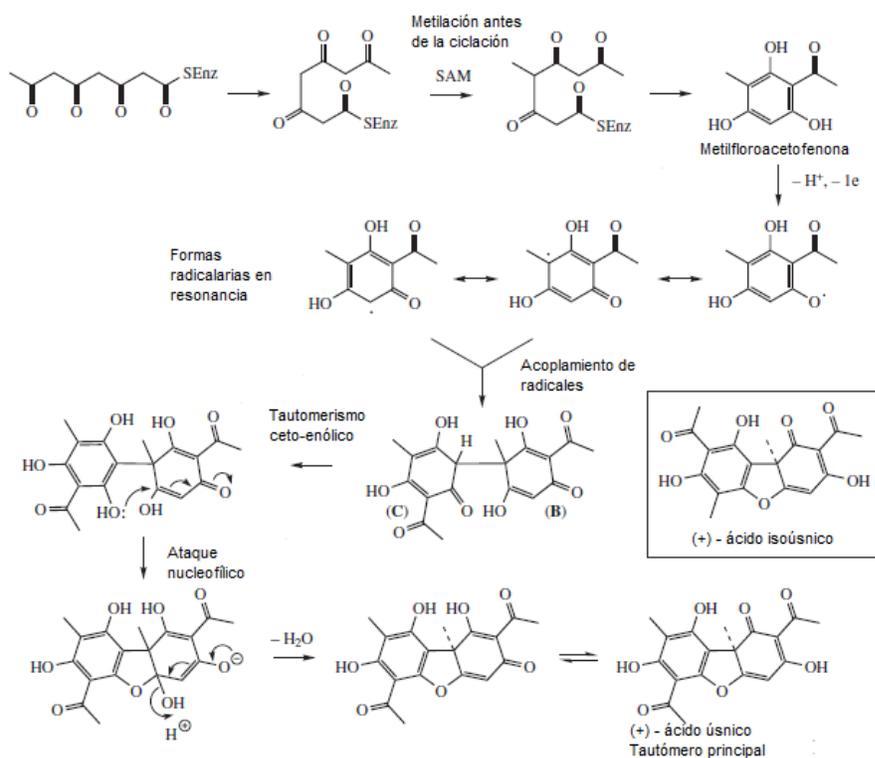


Figura 4-20. Biosíntesis del ácido úsnico (dibenzofurano) a partir del metilfluroacetofenona (Dewick, 2009)

Las dos moléculas están unidas por un mecanismo de acoplamiento oxidativo que se puede racionalizar mediante la oxidación de un electrón de un grupo fenol en metilfluroacetofenona que forma estructuras radicalarias las cuales pueden presentar resonancia (Dewick, 2009). Se produce el acoplamiento de estas estructuras radicalarias. Solo el anillo de la izquierda puede restaurarse posteriormente a la aromaticidad por tautomerismo cetona-enólico; esto no es posible en el anillo de la derecha porque el acoplamiento se produjo en la posición para con el fenol original y esta posición ya contiene un metilo. En cambio, se forma un anillo heterocíclico mediante el ataque del fenol al sistema enona (Dewick, 2009). El resultado de esta reacción es controlado por enzimas; dos grupos fenol equivalentes están presentes como nucleófilos potenciales, y también están disponibles dos sistemas enona equivalentes. Potencialmente, se podrían formar cuatro productos diferentes, pero típicamente solo se produce uno. La pérdida de agua conduce al ácido úsnico. El ácido úsnico se encuentra en ambas formas (+) y (-) en la naturaleza, según la fuente. El producto del uso del hidroxilo nucleófilo alternativo en la formación de anillos heterocíclicos es el ácido isoúsnico (Figura 4-21), también conocido como un producto natural en algunas especies de líquenes (Dewick, 2009).

Existen tres posibles rutas para la conversión de un dépsido en depsidona (Figura 4-21). A: se producen radicales libres fenóxilo y arilo por acción de peroxidadas, los cuales se acoplan entre sí para dar origen al tercer anillo (Yamazaki, 1965). B: mediante la acción de una dioxigenasa, se lleva a cabo la hidroxilación del anillo B y posteriormente, uno de los hidroxilos fenólicos del anillo A se acopla con uno de los carbonos de anillo B para que mediante una reacción de deshidratación se de origen a la depsidona (Calcott, et al., 2018). C: se lleva a cabo la hidroxilación del anillo B del dépsido por acción de una monooxigenasa, luego hay migración de acilo y reordenamiento estructural de Smiles para que mediante esterificación se de origen a la depsidona (Calcott, et al., 2018).

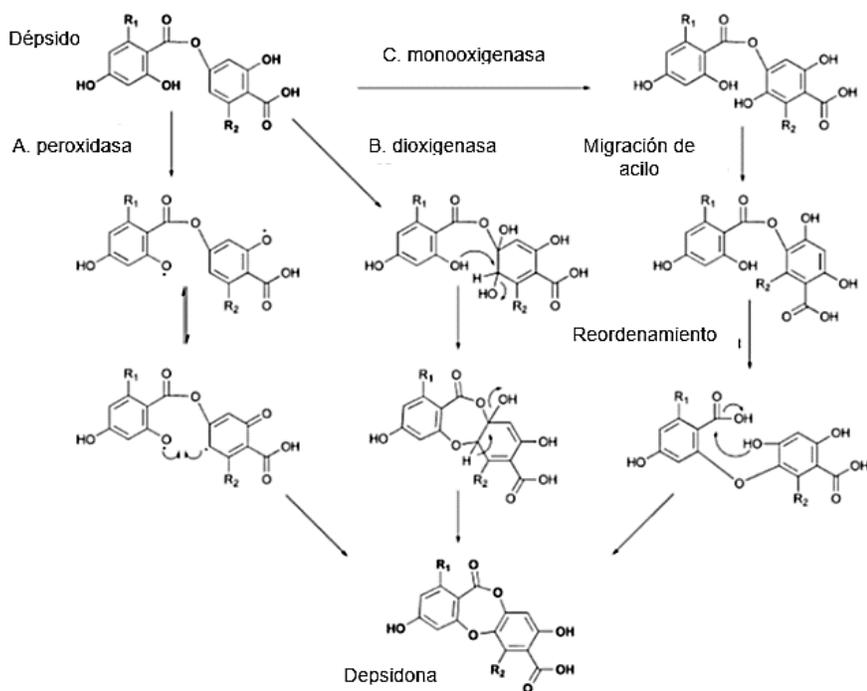


Figura 4-21. Biosíntesis de depsidonas (Calcott, et al., 2018).

Los líquenes también conducen a la producción de compuestos poliaromáticos fusionados que se derivan de una sola cadena de policétidos produciendo estructuras de tipo xantonas (Figura 4-22) (Calcott, et al., 2018).

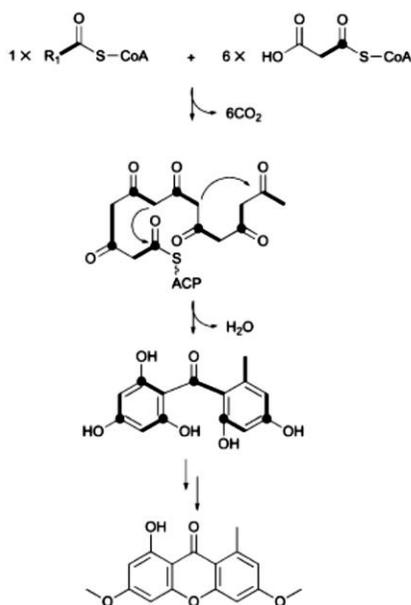


Figura 4-22. Biosíntesis de xantonas (Calcott, et al., 2018).

Cabe mencionar que la producción de las sustancias liquénicas es energéticamente exigente para el organismo (Calcott, et al., 2018). Hay evidencia significativa de que esta inversión está justificada pues dichas sustancias cumplen importantes funciones ecológicas y fisiológicas para el líquen (Calcott, et al., 2018). Por ejemplo, les permiten adaptarse a factores abióticos y ambientales, como a la alta radiación UV, al estrés oxidativo por contaminación ambiental (Valencia-Islas, et al., 2007) a alta presencia de metales pesados, a condiciones de desecación o humedad extremas (Raggio, et al., 2011), a la presencia de plantas competidoras y a la depredación por insectos, herbívoros o microbios (González-Burgos, et al., 2019). Estas sustancias están restringidas a áreas específicas del talo y esto se correlaciona con sus diferentes funciones en el líquen dando soporte a la teoría de defensa óptima, que establece que las estructuras más importantes para la aptitud física deberían defenderse químicamente mejor.

Los metabolitos secundarios de los líquenes exhiben propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, analgésicas, citotóxicas, antipiréticas, antivirales, antienviejimiento, citoprotectoras y protectoras de ADN frente a daño oxidativo, antigenotóxicas, herbicidas (*inter alia*) que podrían ser fuentes potenciales de productos farmacéuticamente útiles (Rojas, et al., 2015; Bucar, et al., 2004; Bézivin, et al., 2003; Parveen-Kumar, et al., 2016) incentivando el interés de estudiar a estos organismos. Sin

embargo, relativamente pocas sustancias han sido examinadas en detalle debido a las dificultades para obtenerlas en cantidades apropiadas.

4.6.3. Sustancias liquénicas con potencial actividad para tratar problemas de la próstata

Algunas sustancias de origen liquénico han mostrado actividad citotóxica (Xu, et al., 2016; Cardile, et al., 2017), inhibidora de la proliferación celular e inductora de apoptosis en líneas específicas de cáncer de próstata (Tabla 4-3) (Galantya, et al., 2017; Yousuf, et al., 2014) constituyéndose en candidatos idóneos para desarrollarlos como posibles fármacos para el tratamiento quimioterapéutico del cáncer de próstata.

Tabla 4-1. Sustancias liquénicas candidatas para desarrollarlas como posibles fármacos para el tratamiento quimioterapéutico del cáncer de próstata.

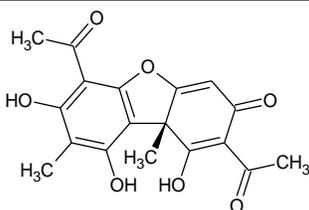
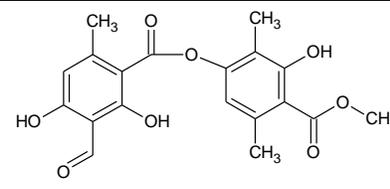
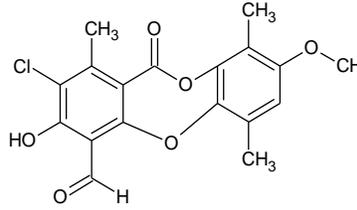
Sustancia	Actividad	Referencia
 <p>ácido úsnico</p>	Antiproliferativo de células PC-3 (adenocarcinoma de próstata mestastásico humano no dependiente de andrógenos), DU-145 (carcinoma de próstata no dependiente de andrógenos)	Kristmundsdóttir, et al., 2005; Galanty, et al., 2017
 <p>atranorina</p>	Antiproliferativo células PC-3, DU-145 y PNT2 (epitelio de próstata normal)	Galanty, et al., 2017
 <p>pannarina</p>	Inhibe el crecimiento de células DU-145	Russo, et al., 2012; Rankovic´ & Kosanic´, 2015

Tabla 4-3. (Continuación). Sustancias liquénicas candidatas para desarrollarlas como posibles fármacos para el tratamiento quimioterapéutico del cáncer de próstata.

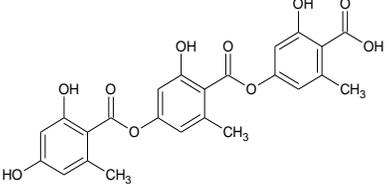
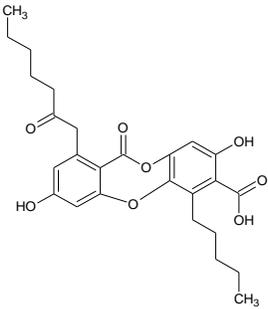
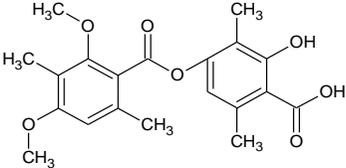
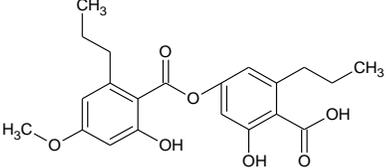
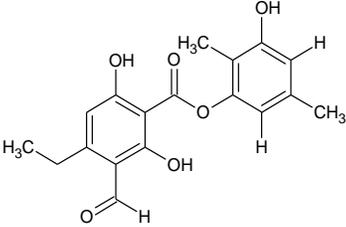
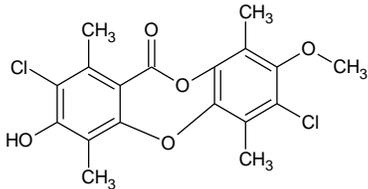
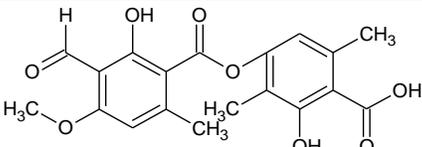
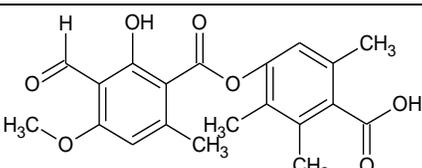
Sustancia	Actividad	Referencia
 <p>ácido girofórico</p>	<p>Proapoptótico de células LNCaP (adenocarcinoma de próstata humano sensibles a andrógenos) y DU-145 por inhibición de la expresión de Hsp70 (proteínas chaperonas de choque térmico)</p>	<p>Russo, et al., 2015</p>
 <p>ácido fisódico</p>		
 <p>ácido difractáico</p>	<p>Antriproliferativo de células PC-3</p>	<p>Russo, et al., 2012; Rankovic´ & Kosanic´, 2015</p>
 <p>ácido divaricático</p>		
 <p>thamnoliadépsido A</p>		<p>Guo, et al., 2011</p>

Tabla 4-3. (Continuación). Sustancias liquénicas candidatas para desarrollarlas como posibles fármacos para el tratamiento quimioterapéutico del cáncer de próstata.

Sustancia	Actividad	Referencia
 <p>vicanicina</p>	Antiproliferativo de células LNCaP y DU-145	Russo, et al., 2012
 <p>ácido baemicésico</p>	Antiproliferativo de células DU-145	Guo, et al., 2011; Rankovic´ & Kosanic´, 2015
 <p>ácido escumático</p>		

Por otro lado, mediante un estudio *in silico* se determinó que algunas sustancias liquénicas, presentan afinidad por el dominio de unión al ligando (LBD) y la región de activación dependiente del ligando (AF2) del receptor de andrógenos (RA) humano, siendo este último un mecanismo de acoplamiento novedoso. Por lo tanto, dichas sustancias se constituyen en candidatos idóneos en el desarrollo de fármacos para el tratamiento hormonal del CaP (Molano-Merchán, et al., 2013).

Respecto a este mismo blanco de acción, cabe mencionar que el compuesto de origen liquénico ácido atrárico posee efecto antagonista del RA *in vitro* en un modelo de línea celular de adenocarcinoma de próstata que expresa al receptor (Papaioannou, et al., 2009; Roell & Baniahmad, 2011) sin interactuar con el receptor de progesterona y el de estrógenos, íntimamente relacionados, reforzando la potencialidad de las sustancias liquénicas para constituirse en posibles fármacos para el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos endógenos. El ácido atrárico fue aislado y purificado de la

corteza del árbol *Pygeum africanum*, droga empleada para la preparación de un fitoterapéutico para el tratamiento de la HPB (Marya, et al., 1995) y constituye uno de sus principios activos reconocidos. Asimismo, este compuesto se encuentra presente el líquen *Parmelia perlata*, que a su vez constituye uno de los componentes de la preparación ayurvédica Speman®, empleada también para el alivio de la HPB y problemas de infertilidad masculina (Marya, et al., 1995). Por lo tanto, es posible atribuir los efectos de la preparación a la presencia de este compuesto.

De manera adicional, mediante otro estudio *in silico* se determinó la potencialidad de las sustancias líquénicas para unirse a la enzima 5alfa-reductasa 2 en un modelo teórico de la misma (Camacho, 2015; Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019), constituyéndose en candidatos idóneos para desarrollar fármacos para tratar la HPB. Se estableció al ácido úsnico, como la sustancia más prometedora para este fin (Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019).

5. Materiales y métodos

5.1. Lugares de realización

La selección, aislamiento, purificación y caracterización de los compuestos objeto de estudio se llevó a cabo en el Laboratorio 319 del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, mientras que la evaluación biológica *in vitro* sobre el receptor de andrógenos y las enzimas 5alfa-reductasa y la aromatasa se llevó a cabo en el laboratorio G-006 de Hormonas del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud de la universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco en la Ciudad de México.

5.2. Procedimientos experimentales generales

Para el aislamiento y la purificación de las sustancias por cromatografía de columna abierta (CC) se usó gel de sílice (0.063 – 0.200 nm, Merck). La cromatografía en capa delgada (CCD) modo analítico, se desarrolló sobre cromatofolios de aluminio (gel de sílice 60 F₂₅₄, 0,25 mm, Merck) revelando con lámpara de luz ultravioleta (254 nm) o con solución de ácido sulfúrico (20 %). La CCD en modo preparativo se desarrolló sobre cromatoplasmas de vidrio (gel de sílice 60 F₂₅₄). Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi SMP-20 y no están corregidos. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance 400-M, empleando como TMS referencia interna, procesando con el programa Mestre-C® v.3.7.4.

Los reactivos empleados fueron grado analítico (R.A.): diclorometano (99.0 %), *n*-hexano (99.5 %), tolueno (99.5 %), acetato de etilo, metanol (99.5 %), ácido acético (99.5 %), ácido fórmico (99.5 %). Los disolventes deuterados fueron los siguientes: CDCl₃, (99.8 atom % D) y DMSO-d₆ (99.9 atom % D).

Para las pruebas *in vitro*, se usó testosterona radiactiva (T³H) [2 nM] (T[1,2,6,7-³H]; actividad específica 95 Ci/mmol), mibolerona radiactiva (MIB³H) [2 nM] (17α-metil-³H-MIB; actividad específica 70 a 87 Ci/mmol) y androstendiona (4-androsten-3,17-diona [1,2,3,7-³H(N)] (4-diona[³H]; actividad específica 90 Ci/mmol) (Perkin-Elmer® Life y Analytical Sciences). La testosterona, 5alfa-dihidrotestosterona, mibolerona, androstenediona,

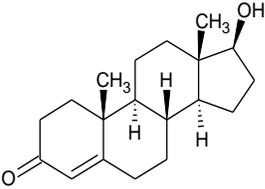
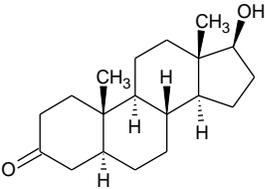
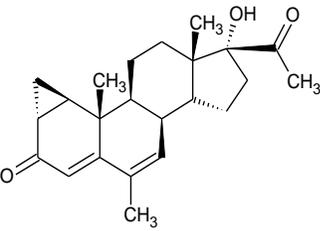
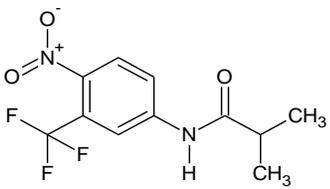
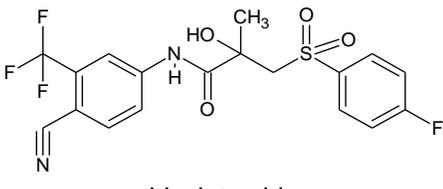
androstandiona y triamcinolona acetona (TCA) no radioactivas fueron marca Steraloids®; el NADPH y el ditiotritol (DTT) fueron marca Sigma®. El líquido de centelleo Ultima Gold marca Packard® y los cromatofolios de aluminio de alta resolución (HPTLC) Keisegel 60 (F₂₅₄ 20X20 cm) marca Merck®. Se empleó un aplicador automático Spot On™, una centrífuga Beckman modelo Optima L-70K y una centrífuga Beckman modelo Allegra 6R con rotor SW 60 Ti, Beckman Instruments, Palo Alto, CA. El analizador de centelleo fue Packard modelo Tri-Carb 2100 TR y los homogenizadores de tejidos Ultra-Turrax IKA T18 Básico, Wilmington, NC y Mill IKA A11.

5.3. Selección de las sustancias liquénicas

Las sustancias liquénicas objeto de estudio fueron seleccionadas tomando como base la afinidad (en términos de energía libre de Gibbs (ΔG°)), que presentaron para unirse al dominio de unión al ligando (LBD) del receptor de andrógenos (Molano-Merchán, et al., 2013) y/o al sitio catalítico de la enzima 5alfa-reductasa 2 (Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019) determinadas *in silico* en trabajos previos del grupo de investigación.

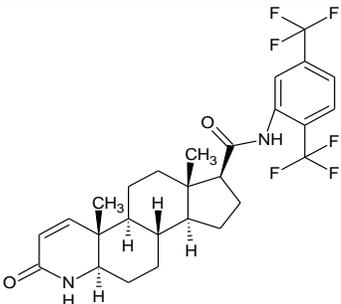
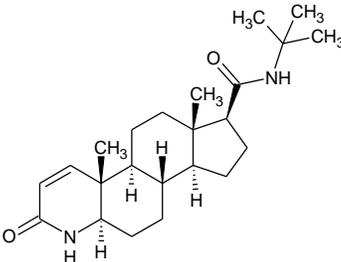
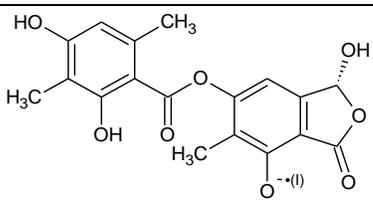
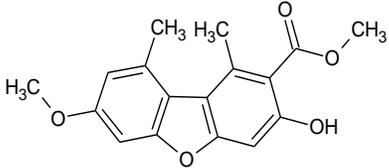
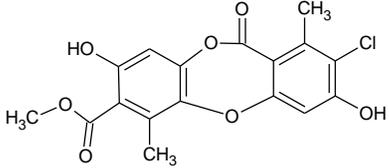
La afinidad de las sustancias liquénicas por el LBD del RA se determinó sobre la proteína de origen humano (*Homo sapiens*) con código 2AM9 en la plataforma del Protein Data Bank. Por su parte, la afinidad por el sitio catalítico de enzima 5alfa-reductasa 2 se determinó en el modelo teórico de Camacho (2015). Las sustancias liquénicas que presentaron un valor de ΔG° comparable al de los ligandos endógenos (T y/o DHT) o al de los antagonistas (ciproterona, flutamida y bicalutamida) para unirse al RA, se consideraron afines por dicho sitio (Tabla 5-1). En el caso de la selección de los posibles inhibidores de 5alfa-reductasa 2, aquellas sustancias liquénicas que presentaron un valor de ΔG° comparable al de los inhibidores finasterida y dutasterida para unirse a su sitio catalítico, se consideraron afines por dicho sitio y por lo tanto fueron seleccionados de manera preliminar para su estudio (Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019).

Tabla 5-1. Compuestos de origen liquénico candidatos a ser evaluados *in vitro* (Molano-Merchán, et al., 2013; Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019).

Compuesto	Afinidad (ΔG°) (Kcal/mol)	
	Receptor de Andrógenos	5alfa-reductasa 2
 testosterona	-10.7	-10.2
 dihidrotestosterona	-10.7	NA ^a
 ciproterona	-9.4	NA ^a
 flutamida	-7.8	NA ^a
 bicalutamida	-6.8	NA ^a

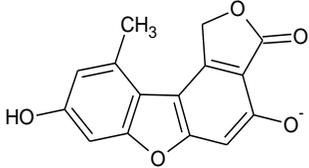
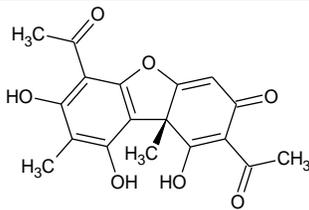
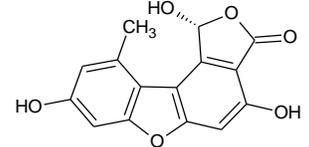
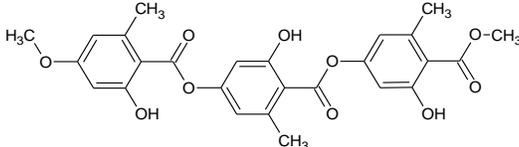
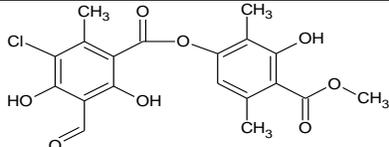
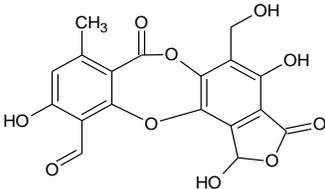
^a No aplica por tratarse de agentes que actúan sobre el RA.

Tabla 5-1. (continuación). Compuestos de origen liquénico candidatos a ser evaluados *in vitro* (Molano-Merchán, et al., 2013; Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019).

Compuesto	Afinidad (ΔG°) (Kcal/mol)	
	Receptor de Andrógenos	5 α -reductasa 2
 <p>dutasterida</p>	NA ^a	-10.4
 <p>finasterida</p>	NA ^a	-10.3
 <p>ácido ramalinaico</p>	-11.9	ND ^b
 <p>metil 6-O-metilnorascomatato</p>	-9.8	ND ^b
 <p>3'-declorolecideidina</p>	-8,9	ND ^b

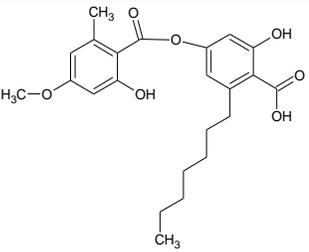
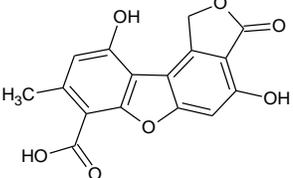
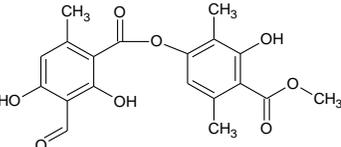
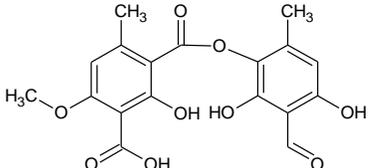
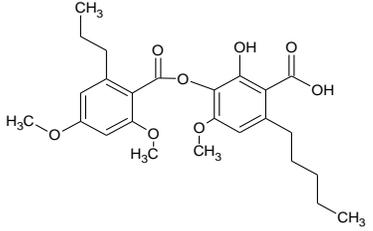
^aNo aplica por tratarse de compuestos que actúan sobre la enzima. ^bNo determinado para este blanco.

Tabla 5-1. (continuación). Compuestos de origen líquénico candidatos a ser evaluados *in vitro* (Molano-Merchán, et al., 2013; Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019).

Compuesto	Afinidad (ΔG°) (Kcal/mol)	
	Receptor de Andrógenos	5alfa-reductasa 2
 <p>strepsilina</p>	-8.3	ND ^b
 <p>ácido úsnico</p>	-8,3	-8.8
 <p>alectosarmentina</p>	-8.2	ND ^b
 <p>tenuiorina</p>	No afín	-9,2
 <p>cloratránorina</p>	No afín	-8.7
 <p>ácido salazínico</p>	No afín	-8.6

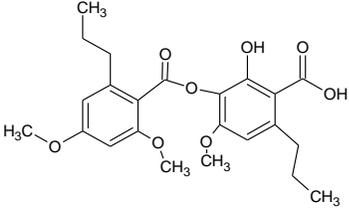
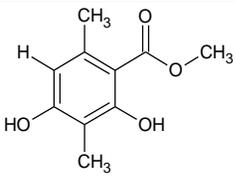
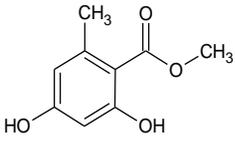
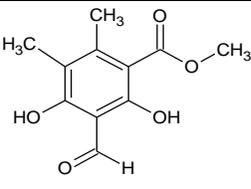
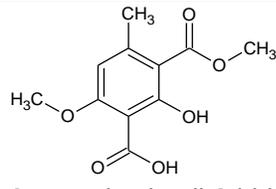
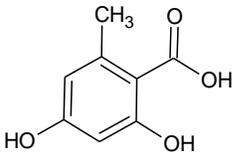
^bNo determinado para este blanco.

Tabla 5-1. (continuación). Compuestos de origen líquénico candidatos a ser evaluados *in vitro* (Molano-Merchán, et al., 2013; Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019).

Compuesto	Afinidad (ΔG°) (Kcal/mol)	
	Receptor de Andrógenos	5alfa-reductasa 2
 <p>esferoforina</p>	No afín	-8.3
 <p>ácido porfirílico</p>	No afín	-7.9
 <p>atranorina</p>	No afín	-7.8
 <p>ácido descarboxithamnólico</p>	No afín	-7.7
 <p>ácido bonínico</p>	No afín	-7.6

^bNo determinado para este blanco.

Tabla 5-1. (continuación). Compuestos de origen liquénico candidatos a ser evaluados *in vitro* (Molano-Merchán, et al., 2013; Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019).

Compuesto	Afinidad (ΔG°) (Kcal/mol)	
	Receptor de Andr6genos	5alfa-reductasa 2
 <p>ácido 2-O-metilsekikaico</p>	No afín	-7.5
 <p>ácido atrárico</p>	-6.8	-6.6
 <p>orselinato de metilo</p>	No afín	-6.5
 <p>lobarielina</p>	ND ^b	-6.1
 <p>ácido 3-metoxicarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico</p>	No afín	-6.0
 <p>ácido orselínico</p>	No afín	-5.6

^bNo determinado para este blanco.

Acto seguido, se procedió a establecer la especie de liquen en donde se podrían encontrar las sustancias candidatas, a fin de llevar a cabo su obtención. Desafortunadamente, las especies de donde se podrían obtener a los compuestos ácido ramalináico, metil 6-O-metilnorascomatato, 3'-declorolecideoidina, strepsilina, alectosarmentina, tenuorina, ácido salazínico y cloroatranorina que resultaron las más afines por su diana, no se encontraban registradas en Colombia o incluidas en los Contratos de Acceso a Recursos genéticos y sus Productos Derivados No. 227 y 248 que cobijaron el presente trabajo. Razón por la cual, nos vimos en la necesidad de aislar y purificar algunas de las sustancias restantes a partir de extractos o fracciones enriquecidas provenientes de especies que estuvieran incluidas en dichos contratos. En total se obtuvieron para su evaluación a los dépsidos: atranorina, esferoforina, ácido descarboxithamnólico y ácido bonínico. El dibenzofurano: ácido úsnico. Los compuestos monoaromáticos: lobarielina, ácido atrárico, orselinato de metilo, ácido 3-metoxicarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico y ácido orselínico.

5.4. Aislamiento y purificación de sustancias

5.4.1. Consideraciones éticas

Las fracciones y compuestos estudiados en este trabajo se encuentran cobijados por los Contratos de Acceso a Recurso Genético y sus Productos Derivados No. 227 (“Estudio Biológico y Físicoquímico de Agentes Biodinámicos de Especies Selectas de Líquenes Colombianos”) y 248 (“Contribución al estudio fitoquímico y a la validación del uso tradicional de algunas plantas medicinales y líquenes seleccionados”) en el marco del artículo 252 de la Ley 1753 de 2015 de amnistía.

Los compuestos de interés se aislaron y purificaron por métodos fitoquímicos convencionales a partir de extractos o fracciones enriquecidas en los diferentes compuestos. La atranorina y el ácido atrárico se obtuvieron de *Stereocaulon strictum*; el ácido descarboxithamnólico, el ácido úsnico y el ácido 3-metoxicarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico se obtuvieron de *Usnea roccellina*; el ácido orselínico y el orselinato de metilo de *Flavopunctelia flaventior*; la esferoforina de *Bunodophoron melanocarpum* y el ácido bonínico de *Ramalina* sp. La identidad de las sustancias fue corroborada mediante comparación de su perfil cromatográfico en CCD con un patrón auténtico, o en caso de duda, mediante la determinación y análisis de sus datos espectroscópicos (RMN ^1H y ^{13}C) comparando con los datos reportados en la literatura.

5.4.2. Purificación del ácido descarboxithamnólico (2)

Una fracción (200 mg) del líquen *Úsnea roccellina* Motyka enriquecida en ácido descarboxithamnólico, fue recristalizada de mezcla AcOEt:MeOH (1:1). Este proceso condujo a la obtención del dicho ácido (127 mg) como un sólido amorfo color amarillento soluble en MeOH y DMSO (Huneck & Yoshimura, 1996; Díaz-Santos, 2008; Rojas et al., 2015).

5.4.3. Purificación de esferoforina (3)

Una fracción (200 mg) proveniente del líquen *Bunodophoron melanocarpum* enriquecida en esferoforina, fue sometida a recristalización de mezcla *n*-hex:CHCl₃ (1:1) y posteriores lavados con CH₂Cl₂ obteniéndose a dicho compuesto (115 mg) como un sólido amorfo color blanco soluble en Me₂CO y CHCl₃ (Quilhot, et al., 1989).

5.4.4. Purificación del ácido bonínico (5)

Una fracción (100 mg) proveniente del líquen *Ramalina sp.* enriquecida en ácido bonínico, fue sometida a CCD preparativa sobre gel de sílice eluyendo con el sistema *n*-Hex:AcOEt:AcOH (85:15:5) eluciones sucesivas (3 a 6). Este proceso condujo a la obtención de dicho ácido (60 mg) como un sólido blanco (Huneck & Yoshimura, 1996; Valencia-Islas, et al., 2007).

5.4.5. Purificación del ácido 3-metoxycarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (6)

Una fracción (100 mg) proveniente del líquen *Usnea roccellina* Motyka, enriquecida en el ácido 3-metoxycarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico, fue recristalizada de mezcla tolueno-AcOEt (1:4). Este proceso condujo a la obtención de dicho compuesto (56 mg) como un sólido cristalino en forma de agujas incoloras soluble en CH₂Cl₂ y DMSO (Huneck & Yoshimura, 1996; Rojas et al., 2015).

5.4.6. Purificación del ácido atrárico (10)

Una fracción del líquen *Stereocaulon strictum* (100 mg) enriquecida en ácido atrárico (β -orcínol carboxilato de metilo), fue sometida a recristalización en mezcla *n*-hex:CHCl₃ (1:1) obteniéndose dicho compuesto (65 mg) como un sólido cristalino color amarillento soluble en CHCl₃ (Perico-Franco et al., 2015; Huneck & Yoshimura, 1996).

5.5. Determinación *in vitro* de la afinidad por el receptor de andrógenos y de la actividad inhibidora de las enzimas 5alfa-reductasa 2 y aromatasa de las sustancias liquénicas seleccionadas

5.5.1. Consideraciones éticas

Los métodos empleados cumplieron las normas establecidas para el buen uso de animales y muestras biológicas en el Laboratorio de Hormonas, aprobado por el Comité Institucional del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México.

5.5.2. Unión por el receptor de andrógenos

5.5.2.1. Preparación de la fracción citosólica de próstata de rata, representativa del receptor de andrógenos

La fracción citosólica representativa del receptor de andrógenos se preparó de acuerdo con Cabeza et al., (2008). Para ello, ratas Wistar macho se sacrificaron en cámara de CO₂ y posteriormente se les extirpó la próstata. El tejido extraído se conservó en solución salina (0.9 %), se le removió el tejido conectivo y se homogenizó en buffer de fosfato sódico (20 mM, 1:1 (w/v)) empleando un Ultra-Turrax IKA T18 básico. La suspensión resultante se centrifugó (0 °C, 37000 rpm, 1 h), el sobrenadante (citosol) localizado entre la capa lipídica y el pellet fue almacenado en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se le agregó inhibidores de proteasa (antipain, PMSF y DTT), buffer de fosfatos y fue almacenado (-71 °C) hasta su empleo.

El contenido proteico de esta fracción se determinó por duplicado a través del método de Bradford (1976). Para ello, se preparó una curva patrón de albúmina fracción V (suero bovino, Merck) a diferentes concentraciones (0.025, 0.050, 0.075 y 0.1 %) adicionada de NaCl (0.15 M; cuanto bastó para 100 µL) y de azul de Comassie (5 mL). También se preparó una curva problema de citosol (1:20, 1:30 y 1:40). Todas las muestras fueron cuantificadas espectrofotométricamente ($\lambda = 595 \text{ nm}$).

5.5.2.2. Ensayos de competencia por el receptor de andrógenos

La unión de las sustancias liquénicas por el receptor de andrógenos (RA) se determinó mediante ensayos de competencia por duplicado, empleando ligandos radiactivos tal y como lo describe Cabeza et al. (2008). El ensayo consistió en cuantificar el desplazamiento del ligando radiactivo mibolerona MIB[³H] unido al RA, por efecto de concentraciones crecientes de los compuestos de prueba, comparando dicho efecto con el causado por el mismo ligando no radiactivo (MIB fría). Conforme aumenta la concentración de MIB fría, el porcentaje de MIB[³H] unida al receptor disminuye, dada la competencia entre MIB[³H] y MIB fría por ocupar los mismos sitios de unión al receptor de andrógenos.

En tubos de ensayo con soluciones de MIB[³H], MIB fría (2×10^{-9} a 2×10^{-6} M), los compuestos de prueba (2×10^{-6} , 18×10^{-6} y 160×10^{-6} M), triamcinolona acetona (200 nM), DTT (0.5 M) y buffer TEM (pH 8.0) se agregó citosol de próstata de rata ($250 \mu\text{L} = 26,7$ mg/mL de proteína) manteniendo en baño de hielo ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 18 h). Luego, se les adicionó hidroxapatita ($500 \mu\text{L}$), buffer Tris- Na_2EDTA (pH 7.4, $250 \mu\text{L}$), incubando nuevamente en baño de hielo (15 min), agitando periódicamente (cada 5 minutos). Los tubos se centrifugaron (3.700 rpm, $0 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min); los sobrenadantes se desecharon y los pellets resultantes se lavaron con buffer tris- Na_2EDTA (1 mL, pH 7.4). Esta operación se repitió tres veces. Acto seguido, se les agregó EtOH (1 mL) y se incubaron (1 h, T ambiente, agitando cada 15 min). Luego, se sometieron a centrifugación (3700 rpm, $0 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min) y el sobrenadante se transfirió a viales con líquido de centelleo (U-Ultima Gold) para ser leída la radiactividad debida a la MIB[³H] unida al receptor. Como blanco se usó solamente mibolerona radiactiva como ligando y el citosol de próstata de rata (representativo del RA) de modo que determinaron las uniones totales. A partir de estos datos se determinó la afinidad relativa de unión (ARU) (ecuación 1) construyendo curvas de concentración vs porcentajes de unión al receptor (GraphPad Prism 6.1).

Ecuación 1. Determinación de la afinidad relativa de unión al receptor.

$$\% ARU = \frac{CI_{50} \text{ MIB}[^3H]}{CI_{50} \text{ Compuesto de prueba}} * 100$$

5.5.3. Actividad inhibidora la enzima 5alfa-reductasa 2

5.5.3.1. Preparación del homogenizado de próstata humana, representativa de la 5alfa-reductasa 2

El homogenizado de próstata humana, representativa de la enzima 5alfa-reductasa 2, se preparó de acuerdo con Cabeza et al., (2008) a partir del tejido prostático humano de un individuo de 53 años, fallecido de diabetes e insuficiencia renal, que fue donado por el Dr. Juan Soriano del Departamento de Patología del Hospital General de la Ciudad de México.

El tejido prostático se conservó en solución salina (0.9 % m/v), se le removió el tejido conectivo y se homogenizó en buffer de fosfato sódico (40 mM, 1:1 (w/v), pH 6.5) empleando un Ultra-Turrax IKA T18 básico. La suspensión resultante se centrifugó (0 °C, 4000 rpm, 1 h), el sobrenadante se desechó y al pellet se le agregaron inhibidores de proteasas (antipaína, PMSF y DTT) y buffer de fosfatos para ser almacenado (- 20 °C) hasta su empleo. El contenido proteico de esta fracción se determinó por duplicado a través del método de Bradford (1976).

5.5.3.2. Inhibición de la enzima 5alfa-reductasa 2

Para determinar la actividad inhibitoria, se emplearon sustratos radiactivos y se siguió la metodología de Bratoeff et al., (2004) por duplicado. En tubos de ensayo con testosterona tritiada (T[1,2,6,7-³H]) como sustrato de la enzima y/o diferentes concentraciones (10^{-11} a 10^{-3} M) de finasterida (inhibidor de la enzima) o de los compuestos de prueba (disueltos en DMSO) se adicionó medio de reacción (1 mL) compuesto por buffer de fosfatos (720 µL, pH 6.5, 40×10^{-3} M), DTT (100 µL, 10^{-3} M) y NADPH (100 µL, 2×10^{-3} M). La reacción entre los sustratos o inhibidores y la enzima se inició adicionando fracción enzimática (36 µg de proteína, obtenida de homogenizado de próstata humana) dejando progresar la reacción por incubación de los tubos (37.5 °C, 60 min) e interrumpiéndola por adición de CH₂Cl₂ (1 mL). Ocurrido esto, los tubos se agitaron (vórtex, 1 min) y se centrifugaron (3700 rpm, 5 min). La fracción de CH₂Cl₂ conteniendo a la dihidrotestosterona (5α-DHT) formada a partir de la reducción de la T, se separó de la mezcla anterior y se reservó. La mezcla de reacción se extrajo con porciones adicionales de CH₂Cl₂ (1 mL x 5) para retirar la 5α-DHT remanente y todas estas fracciones se reunieron y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo resultante, se disolvió en metanol (50 µL) y se aplicó mediante aplicador automático Spot On™ en una placa cromatográfica de gel de sílice empleando estándares de T y DHT no

radiactivas como referencia. Las placas se eluyeron en un sistema $\text{CHCl}_3:\text{Me}_2\text{CO}$ (9:1, tres veces) y el factor de retención (Rf) de los estándares se determinó a la luz UV para T y con ácido fosfomolibdico para la 5 α -DHT. Las bandas de las placas que tuvieron el mismo Rf que la 5 α -DHT, se cortaron y se les determinó su contenido de radiactividad (Ultima Gold); como blanco fue usada la testosterona radiactiva, DMSO y buffer de fosfatos, como control fue usado la T tritiada, DMSO, buffer de fosfatos y la fracción membranal. Para calcular la concentración que produce el 50 % de la inhibición de la enzima (CI_{50}) se evaluaron varias concentraciones diferentes (10^{-11} a 10^{-3} M) de los compuestos y con los datos obtenidos, se construyeron curvas de concentración *versus* respuesta (GraphPad Prism 6.1) a partir de las cuales se calculó la CI_{50} .

5.5.4. Actividad inhibidora la enzima aromatasa

5.5.4.1. Preparación de fracción membranal de hígado de rata representativos de la enzima aromatasa

La fracción membranal de hígado de rata, representativos de la enzima aromatasa, se prepararon de acuerdo con (Cabeza, et al., 2008). Para ello, ratas Wistar hembras se sacrificaron en cámara de CO_2 y posteriormente se les extirpó el hígado. El tejido hepático se conservó en solución salina (0.9 % m/v), se le removió el tejido conectivo y se homogenizó empleando un Ultra-Turrax IKA T18 básico en buffer de fosfato sódico (40 mM, 1:1 (w/v), pH 6.5) adicionado de inhibidores de proteasa (antipaina, PMSF y DTT). La suspensión resultante se centrifugó (0 °C, 4000 rpm, 1 h) y se le retiró la capa lipídica superficial. El sobrenadante restante (citósol) fue desechado, y el pellet se solubilizó en buffer de fosfatos sódico (20 mM, en proporción 1:1) y se almacenó (- 70 °C) hasta su uso. El contenido proteico se determinó por el método de (Bradford, 1976).

5.5.4.2. Inhibición de la aromatasa

Para determinar esta actividad se emplearon sustratos radiactivos y se siguió la metodología de Bail et al., (1998) por duplicado. En tubos de ensayo con testosterona tritiada (T[1,2,6,7- ^3H]) como sustrato de la enzima y/o diferentes concentraciones (10^{-11} a 10^{-3} M) de los compuestos de prueba (disueltos en DMSO) se adicionó medio de reacción (1 mL) compuesto por buffer de fosfatos (720 μL , pH 7.6, 100 μM) y NADPH (100 μL , 10^{-6} M). La reacción entre el sustrato y la enzima se inició adicionando fracción enzimática (30 μL de fracción de membrana hepático de rata equivalente a 4.39 mg/mL de proteína)

dejando progresar la reacción por incubación de los tubos (37.5 °C, 30 min) e interrumpiéndola por adición de éter etílico (1 mL). Ocurrido esto, los tubos se refrigeraron (4 °C, 30 min), se agitaron (vortex, 1 min) y se centrifugaron (3700 rpm, 5 min). La fracción de éter etílico se separó de la mezcla anterior y se reservó. Luego, la mezcla de reacción se extrajo con porciones adicionales de éter etílico (1 mL x 5) y todas estas fracciones se reunieron y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo resultante, se disolvió en metanol (1 mL) y se aplicó en una placa cromatográfica de gel de sílice con ayuda de aplicador automático Spot On™ (v = 80, 200, 500, 700, 800 y 900 unidad de tiempo, 65 °C para secado) junto con T y 5 α -4 Δ -androstendiona, estradiol (E₂) y androstenediona (Δ^4 diona) no radiactivas como referencia. Las placas se eluyeron en un sistema ciclo hexano: acetato de etilo (1:1) y su contenido de radioactividad fueron leídas en un bioescaner (Bioscan serial AR20-8-00022, Gas-P10 (Argon: metano, 9:1)) y corroboradas por medio del contador de centelleo. Finalmente, las placas eluidas se revelaron con lámpara UV (λ 254 nm) para la identificación de T y Δ^4 diona y con yodo para la determinación de E₂, 5 α -androstenediona y 5 α - Δ^4 diona, como blanco fue usada la testosterona radiactiva, DMSO y buffer de fosfatos, como control fue usado la T tritiada, DMSO, buffer de fosfatos y la fracción membranal. Para calcular la concentración que produce el 50 % de la inhibición de la enzima (CI₅₀) se evaluaron varias concentraciones diferentes (10⁻¹¹ a 10⁻³ M) de los compuestos y con los datos obtenidos, se construyeron curvas de concentración *versus* respuesta (GraphPad Prism 6.1) a partir de las cuales se calculó la CI₅₀.

5.6. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como el promedio del duplicado (n=2) \pm la desviación estándar (SD). La significancia fue considerada a un nivel de p < 0.05 (a través del uso de ANOVA) y coeficientes de determinación (R²). Se usó el programa GraphPad PRIMS® versión 6.01.

6. Resultados y discusión

El cáncer de próstata (CaP) y la hiperplasia prostática benigna (HPB) son problemas de salud pública en el entorno nacional y mundial, dada su alta incidencia de morbilidad y mortalidad (Organización panamericana de la Salud, 2013). Se ha establecido que ambas enfermedades son dependientes de andrógenos endógenos. Los andrógenos testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT) al interactuar con su receptor, conducen a proliferación celular como parte de su acción biológica, siendo responsables principales del inicio y progresión del CaP. Por lo tanto, como alternativa farmacológica para el tratamiento de dicha enfermedad, se recurre al bloqueo de la respuesta androgénica antagonizando al receptor de andrógenos (RA) (Lamb & Neal, 2013).

Dado que en la HPB el andrógeno responsable del crecimiento exacerbado de la próstata es la DHT, misma que se biosintetiza a partir de T por acción de la enzima 5 α -reductasa, como alternativa farmacológica para su tratamiento, se recurre a la inhibición de esta enzima evitando así la biosíntesis de dicho andrógeno (Lamb & Neal, 2013).

Considerando que el tejido prostático también sufre de la acción directa (por activación de los receptores de estrógenos que promueven proliferación celular) e indirecta (mediante el control de la producción de andrógenos por un mecanismo de retroalimentación negativa) (Lamb & Neal, 2013) de los estrógenos y que en los hombres maduros, la biosíntesis de estas hormonas estaría aumentada como consecuencia de una mayor expresión de aromatasa (P450-arom) tisular (encargada de biotransformar a los andrógenos en estrógenos), conduciendo a la aparición de CaP e HPB, la inhibición de esta enzima también constituiría una diana para el control y mitigación de dichas enfermedades (Nicholson & Ricke, 2011).

A pesar de la relevancia clínica del tratamiento farmacológico de estas enfermedades, este ha mostrado efectos adversos de tipo hormonal, como en el caso de los antagonistas del RA, agonistas y antagonistas de la LHRL y los inhibidores de la 5 α -R y P450-arom, por lo que surge la necesidad de contar con alternativas farmacológicas potencialmente más selectivas en su acción a fin de evitar dichos efectos. En la búsqueda de compuestos bioactivos potencialmente más inocuos para el tratamiento de estas enfermedades, una

gran cantidad de fuentes naturales principalmente de origen vegetal han sido exploradas para tal fin mostrando mecanismos de acción relacionados con dichas enfermedades (Applegate, et al., 2018; Papaioannou, et al., 2009). Adicionalmente, algunos registros de la medicina tradicional (Marya, et al., 1995; Papaioannou, et al., 2009) en conjunto con algunos estudios científicos han permitido determinar a los líquenes, como una fuente novedosa idónea para este propósito dada la presencia de sustancias de origen liquénico en ciertos fitomedicamentos (*Pygeum africanum* y Speman®) para tratar desórdenes de la próstata aunado con la potencial actividad de algunas de estas sustancias para interactuar de un modo no tradicional con el RA y con la enzima 5 α -R en modelos *in silico* (Molano-Merchán, et al., 2013; Papaioannou, et al., 2009; Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019) e *in vitro* (Papaioannou, et al., 2009). Además de la particularidad que presentan los líquenes para biosintetizar metabolitos únicos, resultado de la asociación simbiótica que les da origen y de las condiciones ambientales a las que se encuentran expuestos (Rankovic´ & Kosanic´, 2015).

Colombia posee una extraordinaria diversidad de líquenes, ocupando el segundo lugar mundial después de Brasil (Bernal, et al., 2016) constituyéndose en un patrimonio invaluable que puede brindar a nuestro país ventajas competitivas en el descubrimiento y desarrollo de principios activos para la industria farmacéutica y cosmética mediante el uso sostenible de nuestra biodiversidad. Sin embargo, los líquenes de Colombia son un recurso natural poco explorado con dicha finalidad enfocándose su investigación principalmente a aspectos taxonómicos (Bernal, et al., 2016).

El presente trabajo tuvo como objetivo, contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas de las sustancias liquénicas y al descubrimiento de fármacos para el tratamiento de trastornos dependientes de andrógenos endógenos como la HPB y el CaP. Las sustancias liquénicas objeto de estudio se seleccionaron tomando como base la afinidad (en términos de energía libre de Gibbs (ΔG°)), que presentaron para unirse al dominio de unión al ligando (LBD) del receptor de andrógenos (Molano-Merchán, et al., 2013) y/o al sitio catalítico de la enzima 5 α -reductasa 2 (Fonseca-García & Valencia-Islas, 2019) determinadas *in silico* en trabajos previos, en conjunto con la facilidad para su consecución a partir de líquenes colombianos incluidos en los Contratos de Acceso a Recursos genéticos y sus Productos Derivados No. 227 y 248 que cobijaron el presente trabajo.

6.1. Obtención de sustancias liquénicas

Los compuestos objeto de estudio fueron purificados por métodos fitoquímicos convencionales a partir de fracciones enriquecidas provenientes de las especies liquénicas mostradas en la Tabla 6-1. Su identidad fue corroborada mediante la comparación de su perfil cromatográfico en CCD con un patrón auténtico o en caso de duda o de no contar con un patrón de comparación, por análisis y cotejo de sus datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C (Anexo A) con los reportados en la literatura. Cabe mencionar que como ya se contaba con cantidad suficiente de los compuestos: ácido úsnico (**1**), atranorina (**4**), orselinato de metilo (**8**), lobarielina (**7**) y ácido orselínico (**9**), estos ya no fueron purificados.

Tabla 6-1. Compuestos de origen liquénico objeto de estudio.

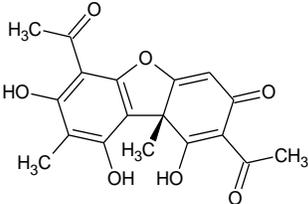
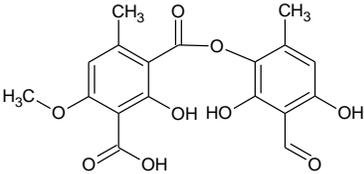
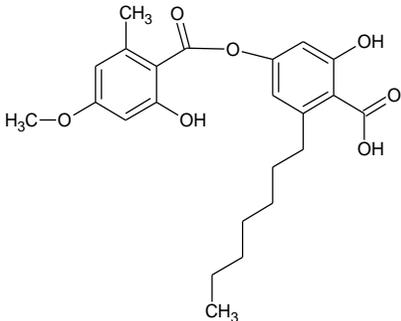
Clase estructural	Compuesto	Fuente
Dibenzofurano	 <p>ácido úsnico (1)</p>	<i>Usnea roccellina</i>
Dépsido	 <p>ácido descarboxithamnólico (2)</p>	<i>Usnea roccellina</i>
	 <p>esferoforina (3)</p>	<i>Bunodophoron melanocarpum</i>

Tabla 6.1. (continuación) Compuestos de origen líquénico objeto de estudio

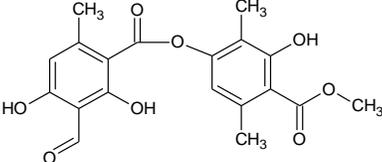
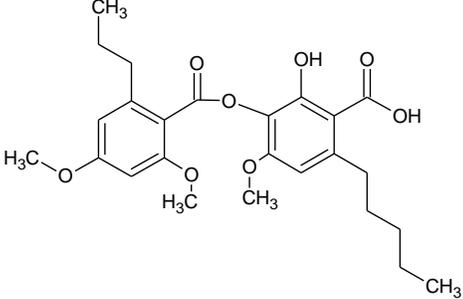
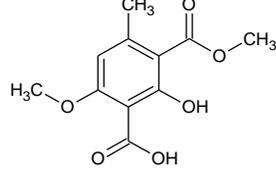
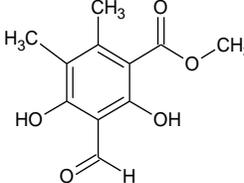
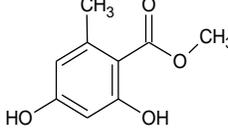
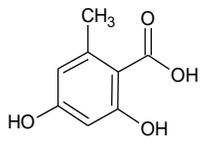
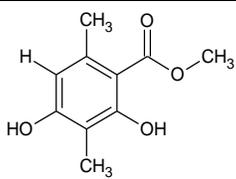
Clase estructural	Compuesto	Fuente
Dépsido	 <p style="text-align: center;">atranorina (4)</p>	<i>Stereocaulon strictum</i>
	 <p style="text-align: center;">ácido bonínico (5)</p>	<i>Ramalina</i> sp.
Monoaromático	 <p style="text-align: center;">ácido 3-metoxicarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (6)</p>	<i>Usnea roccellina</i>
	 <p style="text-align: center;">lobarielina (7)</p>	<i>Lobariella pallida</i>
	 <p style="text-align: center;">orselinato de metilo (8)</p>	<i>Flavopunctelia flaventior</i>

Tabla 6.1. (continuación) Compuestos de origen liquénico objeto de estudio

Clase estructural	Compuesto	Fuente
Monoaromático	 ácido orselínico (9)	<i>Flavopunctelia flaventior</i>
	 ácido atrárico (10)	<i>Stereocaulon strictum</i>

6.2. Confirmación de la identidad de los compuestos aislados.

Los compuestos aislados y purificados en este estudio fueron sometidos a la determinación de sus constantes físicas y datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C en modalidad unidimensional, a fin de llevar a cabo la corroboración de su identidad por no contar con un patrón purificado. Sus datos espectroscópicos se corroboraron con los reportados en la literatura (Huneck & Yoshimura, 1996; Perico-Franco, et al., 2015; Rojas, et al., 2015, *inter alia*).

6.2.1. Ácido descarboxithamnólico (2)

En el espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de **2** (Tabla 6-2, Figura A-1, Anexo A) se aprecian las señales para los dos metilos sobre los anillos aromáticos A y B (δ 2.20, 3H, s y 2.52, 3H, s, respectivamente), además de las señales para los hidrógenos del grupo metoxilo en C-4 (δ 3.88, 3H, s) y los hidrógenos aromáticos H-5 y H-2' de los anillos A y B (δ 6.64, 1H, s y 6.37, 1H, s, respectivamente). También se observa la señal correspondiente al hidrógeno del ácido carboxílico en C-3 (δ 11.03, 1H, s) y la del hidrógeno de aldehído en C-6' (δ 10.21, 1H, s).

En su espectro de RMN ^{13}C (Tabla 6-2, Figura A-2, Anexo A) se aprecian señales para sus 18 átomos de carbono, de los cuales dos corresponden a los metilos sobre los anillos aromáticos A y B (δ 21.9 y 17.5, respectivamente); uno es un carbono de metoxilo (δ 56.7); doce son carbonos de naturaleza aromática correspondientes a los anillos A y B (δ 161.1

a 105.4) y tres son carbonilos, de los cuales, uno es de un éster (δ 166.5), uno es de un ácido carboxílico (δ 170.1) y el otro es de un aldehído (δ 194.5). Cabe mencionar que los datos espectroscópicos experimentales coincidieron con los reportados en la literatura para el ácido descarboxithamnólico (Huneck & Yoshimura, 1996; Díaz-Santos, 2008), permitiendo corroborar la estructura de **2** como un dépsido con patrón estructural de β -orcinol sustituido en el anillo A por un grupo hidroxicarbonilo y en el B por un aldehído.

Tabla 6-2. Datos de RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) del ácido descarboxithamnólico (**2**).

Posición	δ_c (ppm)		δ_H (ppm) integración, mult.	
	Experimental ^a	Reportado ^b	Experimental ^a	Reportado ^b
1	111.9	111.4		
2	161.1	160.5		
3	105.4	104.8		
4	160.4	159.9		
5	106.1	105.3	6.64, 1H, s	6.69, 1H, s
6	144.7	144.7		
7	166.5	165.9		
8	170.2	169.5	11.03, 1H, s	
9	21.9	21.4	2.52, 3H, s	2.52, 3H, s
1'	159.4	158.9		
2'	107.8	107.3	6.37, 1H, s	6.40, 1H, s
3'	128.9	128.4		
4'	142.9	142.4		
5'	153.6	153.0		
6'	109.4	108.9		
8'	194.5	199.9	10.21, 1H, s	10.30, 1H, s

^a Tomado en DMSO-d₆ (¹H; 400 MHz y ¹³C 100 MHz). ^b Tomado en Me₂CO-d₆ (Días-Santos, 2008; Huneck & Yoshimura, 1996).

Tabla 6-2. (continuación) Datos de RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) del ácido descarboxithamnólico (**2**).

Posición	δ_c (ppm)		δ_H (ppm) integración, mult.	
	Experimental ^a	Reportado ^b	Experimental ^a	Reportado ^b
9'	17.5	16.9	2.20, 3H, s	2.28, 3H, s
OCH ₃	56.7	56.2	3.87, 3H, s	4.10, 3H, s

^a Tomado en DMSO-d₆ (¹H; 400 MHz y ¹³C 100 MHz). ^b Tomado en Me₂CO-d₆ (Días-Santos, 2008; Huneck & Yoshimura, 1996).

6.2.2. Esferoforina (**3**)

El espectro de **RMN** ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **3** (Tabla 6-3, Figura A-3, Anexo A) muestra las señales para los hidrógenos de los grupos metilo (δ 2.66, 3H, s) y metoxilo (δ 3.86, 3H, s) en las posiciones C-6 y C-4 del anillo aromático A, además de las correspondientes a los hidrógenos de la cadena alifática de siete carbonos en la posición C-6' sobre el anillo aromático B (δ 1.31, 8H, m; 1.66, 2H, m; 3.03, 3H, t y 0.90, 3H, t). También se aprecian las señales correspondientes a los cuatro hidrógenos de naturaleza aromática de los anillos A y B del dépsido (δ 6.41, 2H (H-3 y H-5), s; 6.68, 1H (H-5'), s y 6.78, 1H (H-3'), s, respectivamente).

En su espectro de **RMN** ¹³C (Tabla 6-3, Figura A-4, Anexo A), se aprecia la presencia de 23 átomos de carbono, de los cuales doce (δ 98.9 a 166.5) son de naturaleza aromática correspondientes a los carbonos de los anillos aromáticos A y B del dépsido. También se aprecia el carbono del metilo (δ 24.6) y el metoxilo (δ 55.5) sobre el anillo aromático A, así como los siete carbonos de la cadena alifática (δ 36.6, 31.8, 29.8, 29.1, 24.6, 22.7 y 14.1) sobre el anillo aromático B. Finalmente, se observan señales para carbonos carbonílicos, de los cuales uno es de un grupo éster (δ 169.6) y otro de un grupo hidroxicarbonilo (δ 174.9). Este análisis permitió corroborar la estructura del compuesto **3** como un dépsido con patrón estructural de orcinol cuyos datos espectroscópicos experimentales coinciden con los encontrados en la literatura para la esferoforina (Huneck & Yoshimura, 1996).

Tabla 6-3. Datos de RMN (CDCl₃, 400 MHz) de la esferoforina (**3**).

Posición	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) integración, mult.	
	Experimental ^a	Experimental ^a	Reportado ^b
1	104.2		
2	166.5		
3	98.9	6.41, 1H, s	6.46, 1H, s
4	164.9		
5	111.9	6.41, 1H, s	6.46, 1H, s
6	143.5		
7	169.6		
8	24.6	2.66, 3H, s	2.67, 3H, s
1'	108.6		
2'	154.9		
3'	109.0	6.78, 1H, s	6.78, 1H, s
4'	165.5		
5'	116.3	6.68, 1H, s	6.78, 1H, s
6'	149.9		
1''	36.6	3.03, 2H, t	2.90 -3.22, 2H, m
2''	31.8	1.66, 2H, m	1.20 – 1.54, 10H, m
3'',4'',5'',6''	29.7, 29.1, 24.6, 22.7	1.31, 8H, m	
7''	14.1	0.90, 3H, t	0.88, 3H, bt
OCH ₃	55.4	3.86, 3H, s	3.88, 3H, s
COOH	174.9		11.05, 1H, bs

^a Tomado en CDCl₃ (¹H; 400 MHz y ¹³C 100 MHz). ^b Tomado en CDCl₃ (200 MHz) (Quilhot, et al., 1989; Huneck & Yoshimura, 1996).

6.2.3. Ácido bonínico (**5**)

El espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **5** (Tabla 6-4, Figura A-5, Anexo A) muestra las señales para los hidrógenos de los metilos terminales de las cadenas alifáticas sobre los anillos aromáticos A y B (δ 0.87, 3H, t y 0.92, 3H, t) y los metoxilos (δ 3.77, 3H, s; 3.87,

3H, s y 3.91, 3H, s) en las posiciones C-2 y C-4 del anillo A y C-4' del anillo B, además las señales correspondientes a los hidrógenos de los dos metilenos de la cadena alifática sobre la posición C-6 sobre el anillo aromático A (δ 2.61, 2H, t; 1.68, 2H, tq; 2.67, 2H) y cuatro metilenos de la cadena alifática sobre la posición C-6' del anillo aromático B (δ 2.67, 2H, t; 1.61, 2H, tt; 1.24, 2H, tt; 1.28, 2H, h). También se aprecian las señales correspondientes a los tres hidrógenos de naturaleza aromática de los anillos A y B del dépsido (δ 6.41, 1H (H-3), d; 6.71, 1H (H-5), d y 6.95, 1H (H-5'), s, respectivamente).

En su espectro de **RMN ^{13}C** (Tabla 6-4, Figura A-6, Anexo A), se aprecia la presencia de 25 átomos de carbono, de los cuales doce (δ 96.7 a 161.9) son de naturaleza aromática correspondientes a los carbonos de los anillos aromáticos A y B del dépsido. También se aprecia los carbonos de los metoxilos (δ 55.5, 56.1 y 56.7) sobre los anillo aromático A y B, así como los tres carbonos de la cadena alifática (δ 35.9, 22.7 y 14.3) sobre el anillo A y los cinco carbonos de la cadena alifática (δ 35.9, 24.9, 32.2, 24.9 y 22.7) sobre el anillo aromático B. Finalmente, se observan señales para carbonos carbonílicos, de los cuales uno es de un grupo éster (δ 165.9) y otro de un grupo hidroxicarbonilo (δ 174.9). Este análisis permitió corroborar la estructura del compuesto **5** como un dépsido con patrón estructural de orcinol cuyos datos espectroscópicos experimentales coinciden con los encontrados en la literatura para el ácido bonínico (Huneck & Yoshimura, 1996).

Tabla 6-4. Datos de RMN (CDCl_3 , 400 MHz) del ácido bonínico (**5**).

Posición	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) integración, mult.	
	Experimental ^a	Experimental ^a	Reportado ^b
1	106.2		
2	158.8		
3	96.7	6.41, 1H, d	6.45, 2H, s
4	155.9		
5	115.6	6,71, 1H, d	6.45, 2H, s
6	147.0		
1'	106.2		
2'	161.9		

^a Tomado en CDCl_3 (^1H ; 400 MHz y ^{13}C 100 MHz). ^b Tomado en CDCl_3 (60 MHz), (Huneck & Yoshimura, 1996).

Tabla 6-4. (Continuación). Datos de RMN (CDCl_3 , 400 MHz) del ácido bonínico (**5**).

Posición	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) integración, mult.	
	Experimental ^a	Experimental ^a	Reportado ^b
3'	125.6		
4'	156.5		
5'	106.2	6.95, 1H, s	6.48, 1H, s
6'	144.2		
1''	35.9	2.61, 2H, t	2.78 – 3.05, 4H, m
2''	22.7	1.68, 2H, tq	1.27 – 1.86, 8H, m
3''	14.3	0.92, 3H, t	0.99 - 1.09, 6H, m
1'''	35.9	2.67, 2H, t	2.78 – 3.05, 4H, m
2'''	24.9	1.61, 2H, tt	1.27 – 1.86, 8H, m
3'''	32.2	1.24, 2H, tt	
4'''	24.9	1.28, 2H, h	1.27 – 1.86, 8H, m
5'''	22.7	0.87, 3H, t	0.99-1.09, 6H, m
OCH ₃	55.5	3.77, 3H, s	3.85, 3.91, 3.95, 9H, 3s, 3MeO
	56.1	3.87, 3H, s	
	56.7	3.91, 3H, s	
COOR	165.9		10.35, 1H, bs
COOH	174.9		11.43, 1H, bs

^a Tomado en CDCl_3 (^1H ; 400 MHz y ^{13}C 100 MHz). ^b Tomado en CDCl_3 (60 MHz), (Huneck & Yoshimura, 1996).

6.2.4. 3-metoxicarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (**6**)

El espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de **6** (Tabla 6-5, Figura A-7, Anexo A), mostró la señal para los hidrógenos del grupo metilo sobre el anillo aromático (δ 2.37, s), del éster metílico (δ 3.94, s), del grupo metoxilo (δ 4.09, s), de un hidrógeno aromático (δ 6.35) y de un fenol (δ 12.66, s).

Su espectro de RMN ^{13}C (Tabla 6-5, Figura A-8, Anexo A) exhibió señales para 11 carbonos: seis de naturaleza aromática (δ 99.4, 161.7, 117.8, 145.4, 103.3, 158.7 ppm),

de los cuales dos están oxigenados (δ 161.7 y 158.7 ppm), un grupo carboxilo (δ 170.2 ppm), un metilo (δ 20.886 ppm) y un metoxilo (δ 57.2 ppm). Lo anterior confirmó a **6** como un compuesto monoaromático con patrón de β -orcinol. Los datos experimentales coinciden con los encontrados en la literatura para dicho compuesto (Rojas, et al., 2015).

Tabla 6-5. Datos de RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) del ácido 3-metoxicarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (**6**).

Posición	δ_c (ppm)		δ_H (ppm) integración, mult.	
	Experimental ^a	Reportado ^b	Experimental ^a	Reportado ^b
1	99.4	99.3		
2	161.7	161.7	12.66, 1H, s	12.64, 1H, s
3	117.8	117.8		
4	145.4	145.4		
5	103.3	103.3	6.35, 1H, s	6.33, 1H, s
6	158.7	158.7		
7	170.2	170.2		
8	167.1	167.1		
9	20.8	20.8	2.37, 3H, s	2.35, 3H, s
OCH ₃	57.2	57.2	4.09, 3H, s	4.07, 3H, s
COOCH ₃	52.4	52.4	3.94, 3H, s	3.92, 3H, s

^a Tomado en DMSO-d₆ (¹H; 400 MHz y ¹³C 100 MHz). ^b Tomado en CDCl₃ (¹H; 400 MHz y ¹³C 100 MHz) (Rojas, et al., 2015)

6.2.5. Ácido atrárico (10)

El espectro de **RMN** ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **10** (Tabla 6-6, Figura A-9, Anexo A), mostró la señal para los hidrógenos de los grupos metilos C-8 y C-9 sobre el anillo aromático (δ 2.15, 3H, s y 2.47, 3H, s), del éster metílico (δ 3.94, 3H, s), del grupo hidroxilo en C-4 (δ 5.45, s), además de un hidrógeno aromático H-5 (δ 6.23, 1H, s) y de un fenol (δ 12.04, s).

Su espectro de **RMN** ¹³C (Tabla 6-6, Figura A-10, Anexo A) exhibió señales para 10 carbonos: seis de naturaleza aromática (δ 105.2, 158.1, 108.6, 163.1, 110.6 y 140.1 ppm), de los cuales dos están oxigenados (δ 158.2 y 163.1 ppm), dos grupo metilo (δ 7.6 y 24.1 ppm) y un metoxilo (δ 51.8 ppm). Lo anterior confirmó a **6** como un compuesto

monoaromático con patrón de β -orcinol. Los datos experimentales coinciden con los encontrados en la literatura para dicho compuesto (Huneck & Yoshimura, 1996).

Tabla 6-6. Datos de RMN (CDCl_3 , 400 MHz) de ácido atrárico (**10**).

Posición	δ_C (ppm)		δ_H (ppm) integración, m.	
	Experimental ^a	Reportado ^b	Experimental ^a	Reportado ^b
1	105.2	105.2		
2	158.1	158.0	12.04, 1H, s	12.04, 1H, s
3	108.6	108.5		
4	163.1	163.1	5.45, 1H, s	5.23, 1H, s
5	110.6	110.5	6.23, 1H, s	6.20, 1H, s
6	140.1	140.2		
7	172.6	172.6		
8	7.6	7.6	2.15, 3H, s	2.10, 3H, s
9	24.1	24.1	2.47, 3H, s	2.45, 3H, s
OCH ₃	51.8	51.8	3.94, 3H, s	3.92, 3H, s

^a Tomado en CDCl_3 (¹H; 400 MHz y ¹³C 100 MHz). ^b Tomado en CDCl_3 (50.3 MHz) (Huneck & Yoshimura, 1996).

6.3. Afinidad *in vitro* de los compuestos de origen liquénico por el receptor de andrógenos

El receptor de andrógenos es un miembro de la superfamilia de receptores de hormonas nucleares que son factores de transcripción dependientes de ligandos y consiste de un dominio amino (N)-terminal que alberga una potente función de transactivación, seguido de un dominio de unión al ADN y un dominio de unión al ligando carboxi (C)-terminal (LBD). La unión de los andrógenos al LBD induce un cambio conformacional en el RA que induce su dimerización y translocación al núcleo celular, en donde se une a los elementos de respuesta a los andrógenos en la región promotora de los genes diana. En dicho sitio, se lleva cabo la unión de las proteínas coactivadoras o correpressoras que regulan las propiedades transcripcionales del receptor (Gao, 2010).

El antagonizar al RA es el principal objetivo farmacológico de la terapia para el cáncer de próstata (CaP) (Poirier, 2008). Los fármacos antiandrogénicos (antagonistas del receptor de andrógenos) bloquean la transactivación génica mediada por el RA compitiendo con la dihidrotestosterona y la testosterona para unirse a su LBD. Por lo tanto, este tipo de agentes se aplican para las terapias hormonales de los pacientes que sufren dicho cáncer (Davis, et al., 2019).

La unión de los compuestos de origen liquénico **1** a **10** por el receptor de andrógenos, se determinó sobre fracción citosólica de próstata de rata (representativa del receptor de andrógenos), llevando a cabo ensayos de competencia entre el ligando radiactivo mibolerona (MIB^[3H]) y los compuestos de prueba. Se cuantificó el desplazamiento de MIB^[3H] unida al RA por efecto de concentraciones crecientes de dichos compuestos, incluyendo mibolerona no radiactiva (MIB) como control. Como se puede apreciar en la Figura 6-1, a medida que aumenta la concentración de MIB el porcentaje de MIB^[3H] unida al receptor disminuye, dada la competencia entre estos dos ligandos por ocupar los mismos sitios de unión al RA.

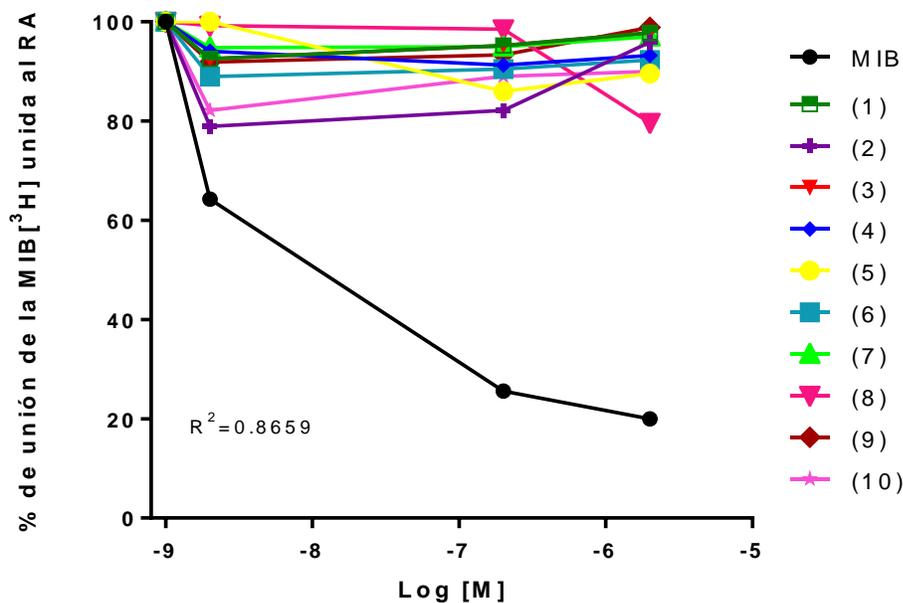


Figura 6-1. Porcentaje de unión por el receptor de andrógenos de origen murino de compuestos de origen liquénico (**1** a **10**). **1**: ácido úsnico, **2**: ácido descarboxithamnólico, **3**: esferoforina, **4**: atranorina, **5**: ácido bonínico, **6**: ácido 3-metoxycarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico, **7**: lobarielina, **8**: orselinato de metilo, **9**: ácido orselínico, **10**: ácido atrárico.

En el caso de los compuestos de prueba, se aprecian valores en los porcentajes de unión de MIB[³H] unida al LBD del RA que oscilan entre el 80 y 100 % en el rango de concentración evaluado, indicativo de que estos no poseen unión por dicho sitio del RA (Figura 6-1). Cabe mencionar, que este hallazgo estaría en concordancia con los resultados de afinidad predichos *in silico* para casi todos estos compuestos (Tabla 4-1). En el caso particular del ácido atrárico (**10**), estudios previos en otros modelos evidencian potente su actividad antiandrogénica *in vitro* (Papaioannou, et al., 2009) lo cual podría deberse a que los modelos de ensayo empleados en los estudios son diferentes y brindan distinta información. Por ejemplo, la fuente de receptor en el presente estudio fue próstata de origen murino mientras que los ensayos previos del ácido atrárico fueron realizados sobre líneas celulares de cáncer de próstata de origen humano (Papaioannou, et al., 2009). Adicionalmente, el ensayo empleado en el presente estudio solamente permite determinar la afinidad para unirse al RA, pero no permite saber si la acción final que ejercerá sobre este será como agonista o antagonista ya que no se midió la expresión génica o transactivación de este una vez interactúa con el receptor. Por lo tanto, no sería adecuado compararlos.

En dichos estudios (Papaioannou, et al., 2009) el ácido atrárico presentó actividad antagonista del RA (medida como la capacidad que posee para evitar la transactivación del receptor y la consecuente expresión génica) en líneas celulares de carcinoma de próstata humano que expresan al receptor de andrógenos en su forma mutada T877A funcional y que son dependientes (línea celular LNCaP) o independientes de andrógenos (línea celular C4-2) sin afectar aquellas líneas celulares de cáncer de próstata que no expresan al receptor (PC-3). Cabe mencionar, que las células de CaP inicialmente crecen dependientes de andrógenos; sin embargo, eventualmente desarrollan independencia de dichas hormonas y su crecimiento ya no puede detenerse por ablación androgénica ni por antiandrógenos clásicos (Alpajaro, 2019). La forma en que surge esta independencia no se comprende completamente, pero hay evidencia de que el RA muta y con ello disminuye la especificidad de la unión del ligando haciendo que incluso los antiandrógenos como hidroxiflutamida lo activen (Alpajaro, 2019). El modelo de línea celular de cáncer de próstata LNCaP humano expresa una mutación en el RA de este tipo, que convierte al antiandrogénico hidroxiflutamida en un potente agonista. Por lo tanto, el desarrollo o la identificación de nuevos compuestos que antagonicen al RA a pesar de estas mutaciones

podrían conducir a tratamientos hormonales adicionales para el CaP (Poirier, 2008). En este sentido, el ácido atrárico se convierte en un compuesto de interés para seguir profundizando en sus efectos sobre la próstata.

Otros compuestos de origen liquénico como los dépsidos atranorina, ácido difrataico y ácido divaricático han mostrado la inhibición del crecimiento de células de cáncer de próstata por medio de la inducción de la apoptosis e impedimento en la expresión de proteínas chaperonas de choque térmico (Hsp70) (Russo, et al., 2012). Por lo tanto, se confirma la potencialidad de las sustancias liquénicas para mitigar el CaP a pesar de presentar mecanismos de acción diferentes a interactuar sobre el LBD del RA.

6.4. Inhibición *in vitro* de la enzima 5alfa-reductasa isoforma 2 por los compuestos de origen liquénico

La enzima 5- Δ^4 -cetoesteroide α -reductasa (SRD5A2) o 5alfa-reductasa (5 α -R) constituye el principal objetivo farmacológico de la terapia para la hiperplasia prostática benigna (HPB). La 5alfa-reductasa es una proteína anclada a la membrana celular y es dependiente de NADPH, cataliza la reducción estereoespecífica e irreversible de una molécula de un 3-oxo-4-en-esteroide a su metabolito 5alfa-reducido (Gu, et al., 2013). Es encargada de biotransformar al andrógeno endógeno testosterona (T) en su metabolito reducido dihidrotestosterona (DHT), que posee mayor afinidad para activar al RA y causar agrandamiento de la próstata. A la fecha, se conocen 3 isoformas de la 5 α -R que presentan distribución predominante en diferentes tejidos. La isoforma 1 (5 α -R1) se encuentra predominantemente en tejido no genital, cuero cabelludo, glándulas sebáceas, hígado y cerebro; la isoforma 2 (5 α -R2) se expresa en próstata, piel genital y vesículas seminales, mientras que la isoforma 3 (5 α -R3), se ha identificado en cáncer de próstata refractario a privación hormonal (Wang, et al., 2014). Teniendo en cuenta que la isoforma 2 de la enzima se encuentra distribuida principalmente en tejido prostático y se expresa tanto en próstata normal como hiperplásica, su inhibición ha constituido un blanco terapéutico para el tratamiento de la HPB sintomática (Uemura, 2008).

La inhibición de la 5 α -R2 evita la biosíntesis de DHT resultando en niveles intraprostáticos más bajos que conducen a la disminución del crecimiento de la próstata, a un aumento en la apoptosis y a su involución, mejorando los síntomas obstructivos del tracto urinario bajo

(Uemura, et al., 2008). Además, como los niveles de T no se disminuyen en gran medida como los de DHT, hay menor pérdida de funciones sexuales masculinas consiguiéndose mejor adhesión al tratamiento. Además, los pacientes que presentan próstatas más grandes pueden lograr un mayor beneficio terapéutico necesitando al menos 6 meses de tratamiento (Deters, 2019).

La actividad inhibidora de la enzima 5 α -R2 por parte de los compuestos de origen liquénico **3**, **4**, **7** a **10**, se determinó cuantificando la cantidad de 5 α -dihidrotestosterona tritiada (5 α -DHT[³H]) producida por la fracción membranal de homogenizados de próstata humana (representativa de la enzima 5 α -R2) a partir de testosterona radiactiva (T[1,2,6,7-³H]), en presencia de los compuestos de prueba o de finasterida (F) empleada como control positivo. Los resultados del ensayo se reportan como concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) que representa la concentración a la cual se inhibe la actividad enzimática de la 5 α -R2 en un 50 %. Cabe mencionar que, dada la solubilidad y/o cantidad de compuesto o de enzima con la que se contaba en el momento, solo se evaluaron los compuestos en mención. Como puede apreciarse en la Tabla 6-7 (Figura B-1 y B-2, Anexo B), solamente el ácido atrárico y esferoforina (CI₅₀ = 17.27 \pm 0.1234 y 50.28 \pm 0.5849 nM, respectivamente) inhibieron significativamente a la enzima, siendo más potente el ácido atrárico que la esferoforina y ambos, ligeramente menos potentes que la finasterida (CI₅₀ = 8.5 \pm 0.2 nM) (p<0.0001). Cabe mencionar que este hallazgo estaría acorde con los resultados de afinidad por la 5 α -R2 predichos *in silico* (Tabla 5-1) donde según el ranking obtenido, la esferoforina y el ácido atrárico, posiblemente serían menos afines por la enzima que la finasterida. Además, la atranorina y demás compuestos ensayados también serían afín por la enzima, sin embargo, en el presente estudio estos resultaron inactivos.

Tabla 6-7. Actividad inhibidora de la enzima 5alfa-reductasa isoforma 2 de los compuestos de origen liquénico.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)
esferoforina (3)	50.28 \pm 0.5849
atranorina (4)	> 100 000*
lobarielina (7)	> 100 000*
oselinato de metilo (8)	> 100 000*

*Inactivo a la máxima concentración evaluada. (n=2)

Tabla 6-8. (Continuación) Actividad inhibidora de la enzima 5 α -reductasa isoforma 2 de los compuestos de origen liquénico.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)
ácido orselínico (9)	> 100 000*
ácido atrárico (10)	17.27 \pm 0.1234
Finasterida	8.5 \pm 0.20

*Inactivo a la máxima concentración evaluada. (n=2)

Comparando la estructura del ácido atrárico (10) con los compuestos monoaromáticos orselinato de metilo (8) y ácido orselínico (9) vs su actividad inhibidora de la enzima 5 α -R2 (Figura 6-2), se aprecia que el patrón de β -orcinol (presente en 10), es una característica estructural importante para la actividad.

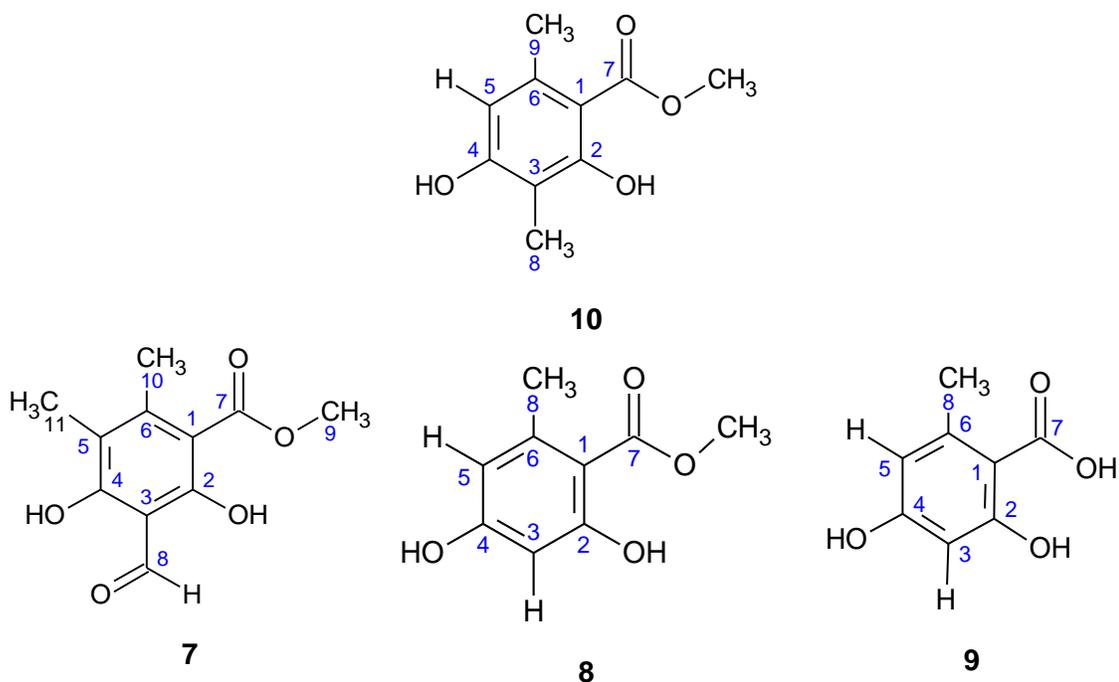


Figura 6-2. Comparación estructural del ácido atrárico (10), lobarielina (7), orselinato de metilo (8) y ácido orselínico (9).

Comparando la estructura química del ácido atrárico con la de la lobarielina (7) (Figura 6-2) *versus* su actividad inhibidora de la enzima 5 α -R2, se puede apreciar que ambos compuestos poseen el patrón de β -orcinol en su estructura, sin embargo, la oxidación del metilo sobre C-3 del anillo aromático, como ocurre en el caso de lobarielina, afecta

notablemente la actividad inhibidora ya que dicho compuesto resultó inactivo. Además, se aprecia que muy posiblemente, la presencia de un grupo metilo adicional, sobre el C-5 del anillo aromático (como ocurre en la lobarielina) hace que no se presente un efecto inhibidor.

Comparando entre sí, la estructura química de los dépsidos esferoforina (**3**) y atranorina (**4**) (Figura 6-3) *versus* su actividad inhibidora de la enzima 5 α -R2, se aprecia que **3** no posee el patrón del β -orcinol sobre el anillo A mientras **4** si lo presenta. Por lo tanto, se puede inferir para los dépsidos, dicho patrón no resultaría tan importante para la actividad pues **3** resultó activo y **4** inactivo. Por otro lado, se podría pensar, que la carencia de actividad del compuesto **4** puede deberse a que, pese la presencia del patrón de β -orcinol sobre este compuesto, el hecho de que su carbono en la posición C-3 se encuentre oxidado a un aldehído, afectaría negativamente la actividad inhibidora de la enzima, tal y como ocurre en el caso de la lobarielina (**7**). Considerando que la estructura del anillo B de la atranorina corresponde al ácido atrárico, era de esperarse que la atranorina hubiera presentado alguna actividad inhibidora de la enzima, sin embargo, en este estudio no se presentó. Muy posiblemente, esto se puede deber a que la atranorina al ser un dépsido y por ende, una molécula más grande, el anillo A genere impedimento estérico al anillo B para que este pueda interactuar con el sitio catalítico de la enzima.

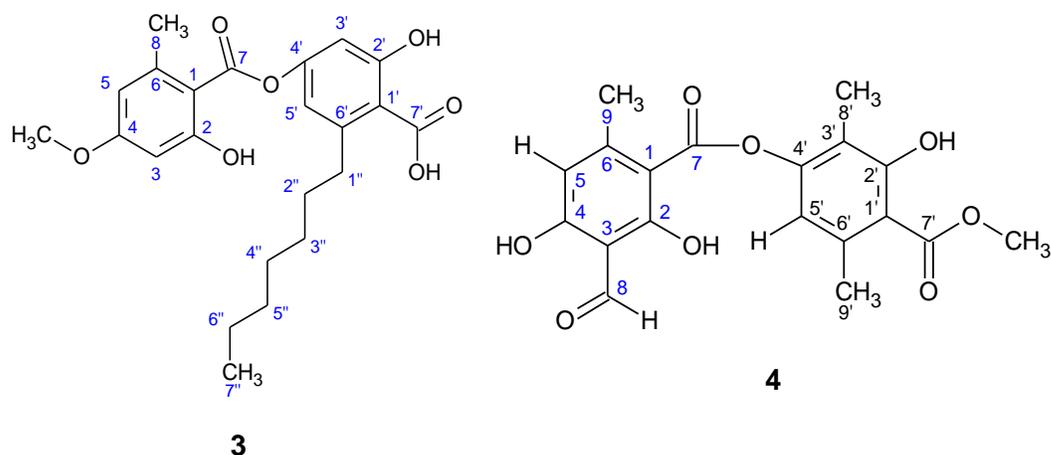


Figura 6-3. Comparación estructural de la esferoforina (**3**) y la atranorina (**4**).

Finalmente, al comparar las estructuras químicas del ácido atrárico (**10**) con la esferoforina (**3**) (Figura 6-4) *vs* su actividad inhibidora de la enzima 5 α -R2, se aprecia que el patrón de β -orcinol es una característica importante para la actividad, en donde el grupo metilo sobre

el C-3 del anillo aromático del compuesto debe encontrarse sin oxidar, como en el caso del compuesto **10**, el cual resultó ser el compuesto más activo en este estudio.

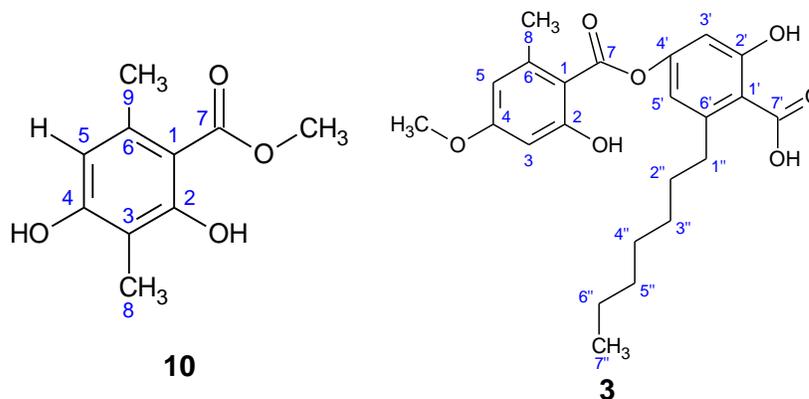


Figura 6-4. Comparación estructural del ácido atrático (**10**) y la esferoforina (**3**).

Hasta donde tenemos conocimiento, por primera vez en este estudio, se reporta la actividad inhibidora de la enzima 5 α -R2 por parte de sustancias de origen liquénico, por lo cual, estos resultados constituyen un aporte al estado del arte de las actividades biológicas mostradas por este tipo de compuestos y abre un nuevo campo de investigación para explorar su potencial sobre dicho blanco de acción. Cabe mencionar que a pesar de que se ha reportado que el ácido atrático puede modular la acción de andrógenos al ser un antagonista del receptor de andrógenos, es importante destacar la actividad inhibidora de la enzima 5 α -R2 encontrada en este estudio, lo cual lo convierte en un agente con doble mecanismo de acción y contribuye a validar el por qué es importante que este compuesto se encuentre presente en el fitoterapéutico a base de la corteza de ciruelo africano (*Pygeum africanum*) y en la preparación ayurvedica Speman®, que como se mencionó, se usan para el tratamiento de los síntomas del tracto urinario bajo y la HPB en la medicina tradicional (Chung & Kaplan, 2010).

6.5. Inhibición *in vitro* de la enzima aromatasa por los compuestos de origen liquénico

La aromatasa (P450-arom) es una enzima que se localiza en el retículo endoplásmico de la célula, hace parte de la superfamilia de enzimas del citocromo P450 encargada de aromatizar a los andrógenos en estrógenos, influyendo en la relación andrógeno/estrógeno en los diferentes tejidos. La androstenediona y la testosterona son sus sustratos fisiológicos más importantes a los cuales aromatiza para dar lugar a la estrona y estradiol,

respectivamente cuyo proceso tiene lugar en varios tejidos (gónadas, tejido adiposo, hueso, cerebro, arterias coronarias) incluida la próstata (Shuk-Mei, 2004).

Aproximadamente el 60 % del estradiol en circulación en el hombre se deriva de la secreción testicular directa o de la conversión de andrógenos testiculares, el restante deriva de la conversión periférica de andrógenos suprarrenales (Shuk-Mei, 2004). Una sobre producción de estrógenos en hombres adultos, puede desencadenar trastornos como la ginecomastia y su deficiencia, pérdida de masa ósea, por lo tanto, los estrógenos tienen un papel importante en la fisiología masculina (García-Figueroa, et al., 2015).

Además, los estrógenos (principalmente estradiol) ejercen efectos importantes en condiciones fisiológicas y patológicas de la próstata. Por ejemplo, durante el tercer trimestre del desarrollo fetal, la proporción plasmática de estrógenos vs andrógenos se modifica favoreciendo el predominio de los primeros como consecuencia de un incremento en los niveles plasmáticos de estrógenos maternos. Estos se han correlacionado con la presencia de metaplasia escamosa en la próstata fetal, que desaparece después del nacimiento cuando estas hormonas regresan a sus niveles normales (Binet, et al., 2017). También entre la cuarta y quinta décadas de vida del varón, la producción normal de andrógenos empieza a disminuir, al tiempo que los niveles de estrógenos aumentan junto con los niveles plasmáticos de proteína fijadora de hormonas sexuales, ocasionando disminución de T plasmática libre (Applegate, et al., 2018). Aunado a esto, el incremento en la masa corporal y del tejido adiposo del individuo, posibilitan una mayor expresión de aromatasas tisulares y con ello, un aumento en la tasa de conversión de testosterona a estradiol, trayendo como consecuencia un aumento en la relación de estrógenos vs andrógenos que afecta nuevamente el crecimiento de la próstata y que propicia la aparición de trastornos con proliferación celular aumentada tales como HPB y CaP, cuya incidencia es mayor en estas etapas de la vida (American Cancer Society, 2018). Además, el papel de los estrógenos en el crecimiento de la próstata está respaldado por la observación de que los andrógenos no aromatizables no pueden inducir la hipertrofia de la próstata y a que la administración de T y estrógenos sinérgicamente induce una mayor hipertrofia de la próstata en comparación con la T sola (Applegate, et al., 2018). De hecho, la inducción de proliferación anormal e hipertrofia celular es una respuesta común a los estrógenos en diversos tejidos, por lo que son considerados carcinógenos potenciales (Applegate, et al., 2018) tanto en cáncer de mama como de próstata. Adicionalmente, se han observado altos

niveles del receptor de estrógenos alfa y aromatasa y bajo nivel de receptor de estrógenos beta en los tejidos prostáticos de pacientes con HPB. Por ello, interferir con la señalización estrogénica o androgénica se ha considerado tratamiento importante y efectivo para la terapia del CaP e HBP.

Los inhibidores de la aromatasa se usan actualmente en el tratamiento del cáncer de mama avanzado en mujeres posmenopáusicas. Su efecto en CaP especialmente en el resistente a castración e HPB también se ha investigado, sin embargo, no se ha demostrado un efecto totalmente beneficioso dado que estas enfermedades son multifactoriales (Avendaño & Menéndez, 2008).

En el presente estudio se determinó la actividad inhibidora de la P450-arom por parte de los compuestos de origen liquénico **2**, **4**, **7** a **10**. Para ello, se llevó a cabo la cuantificación del estradiol tritiado ($E_2[{}^3H]$) producido por catálisis dada por citosol hepático de rata (representativa de la enzima P450-arom) a partir de testosterona radiactiva ($T[1,2,6,7-{}^3H]$) en presencia de los compuestos liquénicos o de anastrozol, empleado como control positivo. Los resultados del ensayo se reportan como concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) representativa de la concentración a la cual se inhibe la actividad enzimática de la P450-arom en un 50 %.

Dada la cantidad de enzima con la que se contaba en el momento del ensayo y la solubilidad de algunas sustancias liquénicas en medio de la reacción, solo fue posible estimar el efecto de los compuestos en mención. Como se puede apreciar en la Tabla 6-8, (Figuras B-3 y B-4, Anexo B); solamente los compuestos atranorina (**4**) y ácido atrárico (**10**) ($CI_{50} = 49.31 \pm 0.0694$ y 65.20 ± 0.1810 nM, respectivamente) inhibieron significativamente a la aromatasa; siendo más potente la atranorina que el ácido atrárico y ambos, ligeramente menos potentes que el fármaco anastrozol ($CI_{50} = 22.46 \pm 0.58$ nM) ($p < 0.0001$).

Tabla 6-9. Actividad inhibidora de la aromatasa de los compuestos de origen liquénico.

Compuesto	CI_{50} (nM)
ácido descarboxithamnólico (2)	> 100 000*
atranorina (4)	49.31 ± 0.0694

*Inactivo a la máxima concentración evaluada. (n=2)

Tabla 6-10. (continuación) Actividad inhibidora de la aromatasa de los compuestos de origen líquénico.

Compuesto	CI ₅₀ (nM)
lobarielina (7)	> 100 000*
orselinato de metilo (8)	> 100 000*
ácido orselínico (9)	> 100 000*
ácido atrárico (10)	65.20 ± 0.1810
Anastrozol	22.46 ± 0.58

*Inactivo a la máxima concentración evaluada. (n=2)

Comparando la estructura química del ácido atrárico (10) con los compuestos monoaromáticos orselinato de metilo (8) y ácido orselínico (9) frente a su actividad inhibidora de la enzima P450-arom (Figura 6-2), se evidencia nuevamente que el patrón del β-orcinol es una característica estructural importante para la actividad, pues el ácido atrárico que presenta dicha característica resultó ser inhibidor de la enzima.

Por su parte, comparando la estructura química del ácido atrárico (10) con la de la lobarielina (7) (Figura 6-2) frente a su actividad inhibidora de la P450-arom, se aprecia nuevamente que a pesar de que ambos compuestos poseen el patrón de β-orcinol en su estructura, la oxidación del metilo sobre C-3 del anillo aromático (como ocurre en 7) afecta notablemente la actividad indistinto a la presencia de un grupo metilo adicional sobre el C-5 del anillo aromático (como ocurre en la lobarielina).

Comparando entre sí, la estructura química de los dépsidos ácido descaboxithamnólico (2) y atranorina (4) (Figura 6-5) *versus* su actividad inhibidora de la enzima P450-arom, se confirma que el patrón de β-orcinol sin oxidar es importante para la actividad, pues el compuesto 4 que presenta dicha característica estructural en su anillo B, resultó activa mientras que 2 que posee doble el patrón de β-orcinol en estado oxidado en sus anillos A y B, resultó inactivo.

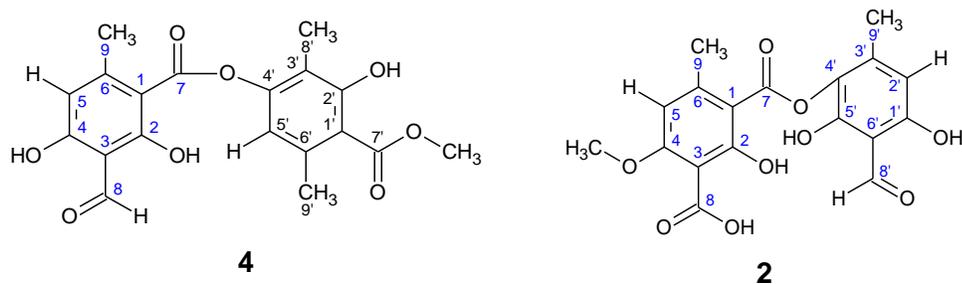


Figura 6-5. Comparación estructural de la atranorina (**4**) y el ácido descarboxithamnólico (**2**).

Comparando entre sí, la estructura química del ácido atrárico (**10**) con el dépsido atranorina (**4**) (Figura 6-6) *versus* su actividad inhibitora de la enzima P450-arom, se confirma que el patrón de β -orcinol sin oxidar, presente en ambos compuestos, es importante para la actividad, ya que ambos compuestos resultaron activos. Considerando que el anillo B del compuesto **4** corresponde a la estructura del ácido atrárico, era de esperarse que dicha sustancia fuera activa.

Estudios previos han reportado el potencial de algunos extractos de líquenes para inhibir a la P450-arom entre ellos, las especies *Cetrariella delisei*, *Melanelia hepaticum* y *Sphaerophorus globosus* (Ingólfssdóttir, et al., 2000), sin embargo, hasta donde tenemos conocimiento, por primera vez en este estudio, se reporta la actividad inhibitora de la enzima P450-arom por sustancias puras de origen liquénico, por lo cual, los resultados aquí reportados constituyen un aporte al estado del arte de las propiedades biológicas de este tipo de compuestos y abre un nuevo campo de investigación para explorar su potencial sobre dicho blanco de acción involucrado en el desarrollo de enfermedades dependientes de andrógenos o de estrógenos.

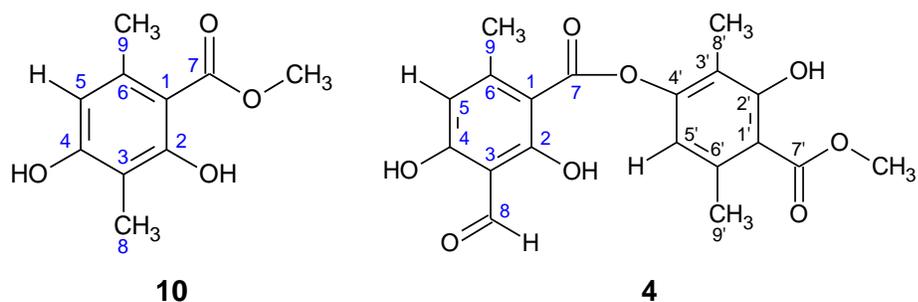


Figura 6-3. Comparación estructural del ácido atrárico (**10**) y la atranorina (**4**).

A partir de los hallazgos de este estudio se puede considerar a la esferoforina como un agente inhibidor de la 5 α R-2 sin afinidad por el RA. La atranorina, como un agente inhibidor de la P450-arom sin afinidad por RA que no inhibe a la 5 α R-2. Mientras que el ácido atrárico es un agente con acción inhibidora de las enzimas 5 α R-2 y P450-arom y con antagonismo por el receptor de andrógenos como previamente se ha reportado, convirtiéndose en candidatos para ser evaluados *in vivo* en modelos de HPB, CaP e incluso cáncer de mama.

7. Conclusiones

- Se obtuvieron para su evaluación a las sustancias de origen liquénico ácido úsnico (1), ácido descarboxithamnólico (2), esferoforina (3), atranorina (4), ácido bonínico (5), ácido 3-metoxycarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (6), lobarielina (7), orselinato de metilo (8), ácido orselínico (9) y ácido atrárico (10), tomando como base la afinidad *in silico* que habían presentado para unirse al dominio de unión al ligando del receptor de andrógenos o al sitio catalítico de la 5alfa-reductasa así como también la facilidad para su consecución a partir de fuente natural de origen colombiano.
 - Los compuestos de origen liquénico ácido descarboxithamnólico (2), esferoforina (3), ácido bonínico (5), ácido 3-metoxycarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (6) y ácido atrárico (10) fueron aislados y purificados a partir de fracciones enriquecidas y su estructura se corroboró por comparación de sus datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C con los reportados en la literatura.
 - Los compuestos no presentaron afinidad para unirse al receptor de andrógenos de origen murino ya que no lograron desplazar al ligando radiactivo miboleron tritiada del sitio de unión del receptor.
 - Los compuestos esferoforina (3) y ácido atrárico (10) inhibieron significativamente a la enzima 5alfa-reductasa isoforma 2 de origen humano, siendo más potente 10 ($\text{CI}_{50} = 17.27 \pm 0.1234 \text{ nM}$) que 3 ($\text{CI}_{50} = 50.28 \pm 0.5849 \text{ nM}$) y ambos, ligeramente menos potentes que la finasterida ($\text{CI}_{50} = 8.5 \pm 0.2 \text{ nM}$) empleada como control. Este hallazgo está acorde con los resultados de afinidad por dicha enzima predichos *in silico* para estos compuestos. En consecuencia, los compuestos 3 y 10 se convierten en candidatos para evaluarlos *in vivo* y considerarlos como posibles fármacos para el tratamiento de la HPB y de otros desórdenes dependientes del andrógeno dihidrotestosterona.
 - Los compuestos atranorina (4) y ácido atrárico (10) inhibieron significativamente a la enzima aromatasa de origen murino siendo 4 ($\text{CI}_{50} = 49.31 \pm 0.0694 \text{ nM}$) más
-

potente que **10** ($CI_{50} = 65.20 \pm 0.1810$ nM) y ambos, ligeramente menos potentes que el fármaco anastrozol (22.46 ± 0.58 nM) empleado como control. En consecuencia, los compuestos **4** y **10** se convierten en candidatos para evaluarlos *in vivo* y considerarlos como posibles fármacos para el tratamiento de desórdenes dependientes de un exceso de andrógenos o de estrógenos.

- Se encontró que el patrón de β -orcinol, cuyo grupo metilo sobre C-3 del anillo aromático debe encontrarse sin oxidar, es una característica estructural importante para que las sustancias liquénicas tipo dépsidos y compuestos monoaromáticos inhiban a la enzima aromatasa, sin embargo, en el caso de la inhibición de la enzima 5alfa-reductasa, si bien dicha característica resultó importante para los compuestos monoaromáticos para los dépsidos no resultó concluyente.
- Los hallazgos de este estudio constituyen un aporte al estado del arte sobre las propiedades biológicas de las sustancias de origen liquénico y dadas las actividades biológicas presentadas por éstas, permite valorarlas como posibles compuestos candidatos de fármacos para el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos y/o de estrógenos, entre ellos, el CaP, la HPB y el cáncer de mama.

7.1. Recomendaciones

- Determinar la actividad antiandrogénica *in vivo* del ácido atrárico y la esferoforina en modelos preclínicos.
 - Determinar la actividad antiestrogénica *in vivo* del ácido atrárico y la atranorina en modelos preclínicos.
 - Hacer un cribado *in silico* de sustancias de origen liquénico sobre la enzima aromatasa a fin de encontrar nuevos compuestos prototipo que inhiban dicha diana.
-

8. Referencias

- Alcántara, A., & Müller, C. (2019). Inhibidores de la 5alfa-reductasa: nuevas evidencias sobre los beneficios y los daños más allá de la hiperplasia benigna de próstata. *Actas Urológicas Españolas*, 49(1), 52-53. doi:10.1016/j.acuro.2018.05.003.
- Alpajaro, S. H. (2019). Non-metastatic castration resistant prostate cancer: a review of current and emerging medical therapies. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 22, 16–23. doi:10.1038/s41391-018-0078-1.
- American Cancer Society. (2017). Radioterapia para el cáncer de próstata. Recuperado el 2017 de octubre de 1, de Posibles efectos secundarios de la radioterapia de rayos externos: <http://www.urologiacolombiana.com/userfiles/file/3%20-%20EVALUAC%20DE%20LA%20CALID%20DE%20VIDA%20ASOC%20A%20LA%20SALUD.pdf>
- American Cancer Society. (2018). Cancer statistic center. Recuperado el 18 de junio de 2018, de https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.69543891.292885510.1538083013-1444346786.1538083013#!/.
- Applegate, C., Rowles III, J., Ranard, K., Jeon, S., & Erdman Jr., J. (2018). Soy consumption and the risk of prostate cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, 10(40), 1-25. doi:10.3390/nu10010040.
- Arrabal-Martína, M., Anglada-Curadob, F., Cózar-Olmoc, J., Soler-Martínezd, J., Moreno-Jiméneze, J., Castiñeiras-Fernández, J., . . . Zuluaga-Gómez, A. (2014). Acetato de abiraterona prequimioterapia. Propuesta de un algoritmo de tratamiento en el carcinoma de próstata resistente a castración. *Actas Urológicas Españolas*, 37(5), 327–333. doi:10.1016/j.acuro.2013.10.008
- Astobieta-Odrizola, A., Ibarluzea-González, G., Pereira-Arias, J., & Gallego-Sánchez, J. (2007). La farmacocinética/farmacodinámica de los iPDE5. ¿Clínicamente significativos? La farmacocinética clínica de los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 en disfunción eréctil. *Revista Internacional de Andrología*, 5(1), 59-62. doi:doi.org/10.1016/S1698-031X(07)74034-7.
- Avendaño, C., & Menéndez, C. (2008). Anticancer drugs that inhibit hormone action. En *Medicinal chemistry of anticancer drugs* (págs. 54-90). Madrid: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-444-52824-7.00003-2.
- Bačkorová, M., Bačkor, M., Mikeš, J., Jendželovský, R., & Fedoročko, P. (2011). Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicology in Vitro*, 25(1), 37-44.
- Bačkorová, M., Jendželovský, R., Kello, M., Bačkor, M., Mikeš, J., & Fedoročko, P. (2012). Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26(1), 462–468.
- Barceló, A., Ramos, M., de la Iglesia, M., & Zaforteza, M. (2014). Tratamiento del cáncer de próstata en función de la esperanza de vida, la comorbilidad y las guías de práctica clínica. *An. Sist. Sanit. Navar.*, 37(3), 339-348.
- Barreno, E., & Pérez-Ortega, S. (2003). Biología de los Líquenes. En *Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias* (págs. 65-82). Principado de Asturias: KRK. Recuperado el 27 de
-

noviembre de 2013, de Biología de los Liqueños:
http://www.uv.es/barreno/Biologia_de_los_liquenes.pdf

- Bernal, R., Gradstein, S., & Celis, M. (2016). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia (Primera ed., Vol. 1). Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Lohézic-Le Dévéhat, F., & Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 10(6-7), 499-503.
- Binet, A., Gorduza, D., Kallas-Chemaly, A., Gay, C.-L., Margain, L., Scalabre, A., & Mouriquand, P. (2017). Desarrollo genital normal y patológico. *EMC - Urología*, 49(2), 1-10. doi:10.1016/S1761-3310(17)83675-6.
- Bjerklund, T. (2007). Crioterapia prostática como tratamiento primario en pacientes con cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*, 31(6).
- Bourgeois, G., Suire, C., & Vivas, N. (1999). Atraric acid, a marker for epiphytic lichens in the wood used in cooperage: Identification and quantification by GC/MS/(MS). *Analisis*, 27, 281-283.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- Brodie, A., Njar, V., Furtado-Macedo, L., Tadas-Sean, V., & Sabnis, G. (2009). Steroidogenic Enzyme Inhibitors and Hormone Dependent Cancer. *Urol Oncol*, 27(1), 53-63. doi:10.1016/j.urolonc.2008.07.036.
- Bucar, F., Schneider, I., Ögmundsdóttir, H., & Ingólfssdóttir, K. (2004). Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. *Phytomedicine*, 11(7-8), 602-606.
- Burnett-Bowie, S., Roupenian, K., Dere, M., Lee, H., & Leder, B. (2009). Effects of aromatase inhibition in hypogonadal older men: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Endocrinol*, 70(1), 116-123. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03327.x.
- Bustos, E. & -D. (2012). Reproducción Estacional en el Macho. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1266-1279. doi:10.4067/S0717-95022012000400004
- Cabeza, M., Bratoeff, E., Ramírez, E., Heuze, I., Recillas, S., Berrios, H., . . . Perez, V. (2008). Biological activity of novel progesterone derivatives having a bulky ester side chain at C-3. *Steroids*, 73(8), 838-843.
- Cajina, J. (2012). Cancer. Recuperado el 27 de noviembre de 2013, de Organización Panamericana de la Salud: https://www.paho.org/nic/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=647&Itemid=
- Calcott, M. J., Ackerley, D. F., Knight, A., Keyzers, R. A., & Owen, J. G. (2018). Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chemical Society Reviews*, 47(5), 1730-1760. doi:10.1039/c7cs00431a.
- Camacho, N. D. (2015). Predicción computacional de la estructura terciaria de la enzima 5alfa-reductasa tipo II humana y estudio de su acoplamiento molecular. Bogotá.
- Cardile, V., Graziano, A., Avola, R., Piovano, M., & Russo, A. (2017). Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid. *Chemico-Biological Interactions*, 263(1), 36-45. doi:10.1016/j.cbi.2016.12.007.
-

- Caro, J., Cortijo, S., Escribano, I., Serrano, O., & Ferrari, J. (2014). Uso, efectividad y seguridad de abiraterona en cáncer de próstata. *Farmacía Hospitalaria*, 38(2), 118-122. doi:10.7399/FH.2014.38.2.1154.
- Caro-Zapata, F. L., Vásquez-Franco, A., Correa-Galeano, É. D., & García-Valencia, J. (2017). Complicaciones infecciosas después de prostatectomía abierta y resección transuretral de próstata en pacientes con hiperplasia prostática benigna. *IATREIA*, 31(3), 274-283. doi:10.17533/udea.iatreia.v31n3a05.
- Carrero-López, V., Cózar-Olmo, J., & Minana-López, B. (2016). Hiperplasia prostática benigna y síntomas del tracto urinario inferior. Revisión de las evidencias actuales. *Actas Urológicas Españolas*, 40(5), 288-294. doi:10.1016/j.acuro.2015.12.008.
- Carruba, G. (2007). Estrogen and prostate cancer: an eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(4), 899-911. doi:https://doi.org/10.1002/jcb.21529
- Cataño, J., & Morales, C. (2009). Evaluación de la calidad de vida asociada a la salud en los pacientes sometidos a prostatectomía radical abierta por carcinoma de próstata clínicamente localizado. *Urología Colombiana*, 18(3), 22-30. Obtenido de <http://www.urologiacolombiana.com/userfiles/file/3%20-%20EVALUAC%20DE%20LA%20CALID%20DE%20VIDA%20ASOC%20A%20LA%20SALUD.pdf>
- Chávez, V., Ramos, L., García-Becerra, R., & Vilchis, F. (2015). Hamster SRD5A3 lacks steroid 5 α -reductase activity *in vitro*. *Steroids*, 94, 41-50. doi:10.1016/j.steroids.2014.11.005.
- Chomcheon, P., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Kengtong, S., Mahidol, C., . . . Kittakoop, P. (2009). Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. *Phytochemistry*, 70(3), 407-413.
- Chottanapund, S., Van Duursen, M., Zwartsen, A., Timtavorn, S., Navasumrit, P., Kittakoop, P., . . . Van den Berg, M. (2017). Depsidones inhibit aromatase activity and tumor cell proliferation in a co-culture of human primary breast adipose fibroblasts and T47D breast tumor cells. *Toxicology Reports*, 4, 165-171.
- Chung, D. E., & Kaplan, S. A. (2010). Papel actual de la terapia combinada en los Síntomas del Tracto Urinario Inferior (STUI) masculino. *Archivos Españoles de Urología*, 63(5), 323-332. Obtenido de <http://scielo.isciii.es/pdf/urol/v63n5/01.pdf>.
- Convalía, E. J., Cano-García, M. d., Miján-Ortiz, J. L., Arrabal-Martín, M. A.-P., & Cózar-Olmo, J. M. (2017). Deprivación androgénica en cáncer de próstata y riesgo de aparición de litiasis renal. Resultados de un estudio de casos y controles. *Medicina Clínica*, 148(11), 495-497. doi:10.1016/j.medcli.2017.01.021
- Cummings, B. (2002). Fungi. En *Biology* (Vol. VI, pág. Pearson education). Pearson Education. Obtenido de <https://slideplayer.com/slide/7998445/>.
- Davis, I., Martin, A., Stockler, M., Begbie, S., K.N, C., Chowdhury, S., . . . Pook, D. (2019). Enzalutamide with standard first-line therapy in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.*, 381(2), 121-131. doi:10.1056/NEJMoa1903835.
- De la Taille, A., Vacherot, F., Salomon, L., Druel, C., Gil Diez de Medina, S., Abbou, C., . . . Chopin, D. (2001). Hormone-refractory prostate cancer: a multi-step and multi-event process. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 4, 204-212. doi:10.1038/sj.pcan.4500534.
-

- Denmeade, S., & Isaacs, J. (2002). A history of prostate cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, 2(5), 389-396. doi:10.1038/nrc801.
- Deters, L. A. (10 de agosto de 2019). Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) Treatment & Management. Recuperado el 23 de julio de 2018, de Medscape: <https://emedicine.medscape.com/article/437359-treatment>.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach* (Tercera ed.). Great Britain: Wiley.
- Duran, S., & Brodo, I. (2019). Lichens of North America Information. Recuperado el 2019 de septiembre de 18, de http://www.sharnoffphotos.com/lichen_info/usetype.html
- Eisenreich, W., Nihat, K., & Beck, A. (2011). Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens. *Phytochem Rev*, 10, 45–456. doi:10.1007/s11101-011-9215-3.
- Espinoza, J. L., Hernández-Aguilar, M. E., Aranda Abreu, G. E., Rojas Durán, F., Manzo Denes, J., Coria Ávila, G. A., . . . Soto Cid, A. H. (2013). El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática. *eNeurobiología*, 4(8), 1-23.
- Fine, S., & Ginsberg, P. (2008). Alpha-adrenergic receptor antagonists in older patients with benign prostatic hyperplasia: issues and potential complications. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 109(1), 3-4.
- Fonseca-García, I., & Valencia-Islas, N. (2019). Estudio de acoplamiento molecular entre enzima 5 α -Reductasa (Isoforma II) y algunas sustancias de origen liquénico con posible actividad frente a la hiperplasia prostática benigna. Bogotá.
- Foster, H., Barry, M., Gandhi, M., Kaplan, S., Kohler, T., Lerner, L., . . . McVary, K. (2018). Surgical management of lower urinary tract symptoms attributed to benign prostatic hyperplasia. Recuperado el 27 de julio de 2018, de [https://www.auanet.org/guidelines/benign-prostatic-hyperplasia/lower-urinary-tract-symptoms-\(2018\)](https://www.auanet.org/guidelines/benign-prostatic-hyperplasia/lower-urinary-tract-symptoms-(2018)).
- Galanty, A., Koczurkiewicz, P., Wnuk, D., Paw, M., Karnas, E., Podolak, I., . . . Michalik, M. (2017). Usnic acid and atranorin exert selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate and melanoma cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 40, 161–169.
- Gao, W. (2010). Androgen receptor as a therapeutic target. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1277-1284.
- Gao, W., Bohl, C., & Dalton, J. (2005). Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev*, 105(9), 3352-3370. doi:10.1021/cr020456u.
- García, C. B. (2013). Enfermedades endocrinas en el adulto mayor. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(5), 866-873. doi:10.1016/S0716-8640(13)70234-7.
- García-Figueroa, I., Candia, M. N., Pereda-Meira, C. M., & Laborí-Carda, C. M. (2015). Papel de los estrógenos y sus receptores en las enfermedades benignas y malignas prostáticas: Parte 1. *Revista Mexicana de Urología*, 75(5), 283-291. doi:10.1016/j.uromx.2015.06.007.
- Ghosh, D., Lo, J., & Egbuta, C. (2016). Recent progress in the discovery of next generation inhibitors of aromatase from the structure-function perspective. *J Med Chem*, 59(11), 5131-5148. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01281.
-

- Gómez-Chang, E., Larrea, F., & Martínez-Montes, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(1), 24-36.
- González, C., Roso, L. E., Castro, J. C., & Reyes, J. A. (2007). Estudio en farmacovigilancia en pacientes con Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) sintomática tratados con tamsulosina 0,4mg en 8 ciudades de Colombia. *Urología Colombiana*, 107-117. Obtenido de <http://www.urologiacolombiana.com/revistas/abril-2007/014.pdf>.
- González-Burgos, E., Fernández-Moriano, C., & Gómez-Serranillos, M. P. (2019). Conocimientos actuales sobre el género *Parmelia* : interés ecológico, fitoquímica, actividades biológicas y potencial terapéutico. *Fitoquímica*, 165, 1-14. doi:10.1016/j.phytochem.2019.112051.
- Grossmann, M., Cheung, A., & Zajac, J. (2013). Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(4), 603–616.
- Gu, X., Na, R., Huang, T., Wang, L., Tao, S., Tian, L., . . . Qi, J. (2013). SRD5A1 and SRD5A2 are associated with treatment for benign prostatic hyperplasia with the combination of 5 α -reductase inhibitors and α -adrenergic receptor antagonists. *The Journal of Urology*, 190(2), 615-619. doi:doi.org/10.1016/j.juro.2013.03.024.
- Harris, W., Mostaghel, E., Nelson, P., & Montgomery, B. (2009). Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nature clinical practice urology*, 6(2), 76-85. doi:doi:10.1038/ncpuro1296.
- Heidenreicha, A., Bellmunt, J., Bollac, M., Joniaud, S., Masone, M., Matveevf, V., . . . Zattoni k, F. (2011). Guía de la EAU sobre el cáncer de próstata. Parte I: cribado, diagnóstico y tratamiento del cáncer clínicamente localizado. *Actas Urológicas Españolas*, 35(9), 501-514. doi:10.1016/j.acuro.2011.04.004.
- Hiramatsu, M., Maehara, I., Ozaki, M., Harada, N., Orikasa, S., & Sasano, H. (1997). Aromatase in hyperplasia and carcinoma of the human prostate. *The Prostate*, 31, 118-124. doi:10.1002/(SICI)1097-0045(19970501)31:2<118::AID-PROS7>3.0.CO;2-J.
- Hoffman-Censits, J. &. (2013). Enzalutamide: a novel antiandrogen for patients with castrate-resistant prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(6), 1335-1339. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2910.
- Huguet, J., Maroto, P., Palou, J., & Villavicencio, H. (2006). Cáncer de próstata hormonorresistente. Cambios en las estrategias terapéuticas desde la demostración de la utilidad de la quimioterapia. *Actas Urológicas Españolas*, 30(2), 123-133.
- Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996). *Identification of lichen substances*. Berlin: Springer.
- Illana-Esteban, C. (2009). Líquenes comestibles. *Bol. Soc. Micol*, 33, 273-282.
- Illana-Esteban, C. (2012). Líquenes usados en medicina tradicional. *Bol. Soc. Micol. Madrid*, 36, 163-174.
- Imperato-McGinley, J., & Zhu, Y. (2002). Androgens and male physiology the syndrome of 5 α -reductase-2 deficiency. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198(1-2), 51-59. doi:https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00368-4.
- Ingólfssdóttir, K., Gudmundsdóttir, G., Ögmundsdóttir, H., Paulus, K., Haraldsdóttir, S., Kristinsson, H., & Bauer, R. (2002). Effects of tenuiorin and methyl orsellinate from the lichen *Peltigera leucophlebia* on 5-/15-lipoxygenases and proliferation of malignant cell lines in vitro. *Phytomedicine*, 9(7), 654-658.
-

- Instituto Nacional de Cancerología. (2017). En Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia (Cuarta ed., págs. 1-120). Bogotá. Obtenido de https://www.cancer.gov.co/ATLAS_de_Mortalidad_por_cancer_en_Colombia.pdf
- Jesús-Tran, K. P., Pierre-Luc, C., Cantin, L., Blanchet, J., Labrie, F., & Breton, R. (2006). Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Science*, 15(5), 987-999.
- Kahokehr, A., & Gilling, P. J. (2014). Landmarks in BPH—from an etiology to medical and surgical management. *Nature Reviews Urology*, 11, 118-122. doi:doi:10.1038/nrurol.2013.318.
- Kristmundsdóttir, T., Jónsdóttir, E., Ögmundsdóttir, H. M., & Ingólfssdóttir, K. (2005). Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 539–543. doi:10.1016/j.ejps.2005.01.011.
- Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. (2009). *Berne y Levy Fisiología* (6a ed.). Barcelona: Elsevier Imprint.
- Lamb, A., & Neal, D. (2013). Role of the androgen receptor in prostate cancer. *Trends in Urology & Men's Health*, 4(3), 26-30. Obtenido de <http://trendsinsenhealth.com/article/role-androgen-receptor-prostate-cancer/>
- Lee, S., Chan, C., & Lai, Y. (2017). The global burden of lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia: A systematic review and metanalysis. *Nature*, 7(7984), 1-10. doi:10.1038/s41598-017-06628-8.
- Lokajová, V., Bačkorová, M., & Bačkor, M. (2014). Allelopathic effects of lichen secondary metabolites and their naturally occurring mixtures on cultures of aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *South African Journal of Botany*, 93, 86-91. doi:10.1016/j.sajb.2014.03.015.
- López-Ramos, H., Gómez, P., Moreno, M., Patiño, G., Rasch-Isla, A., Dallos, A., . . . Vega, J. (2014). Guía de manejo de la hiperplasia prostática benigna. *Revista urología colombiana*, 24(3), 187.e1-187.e32. doi:10.1016/j.uroco.2015.04.005.
- Lücking, R., Moncada, B., Martínez-Habibe, M., Salgado-Negret, B., Celis, M., Rojas-Zamora, O., . . . Borsch, T. (2019). Lichen diversity in colombian caribbean dry forest remnants. *Caldasia*, 41(1), 194-214. doi:10.15446/caldasia.v41n1.71060.
- Makridakis, N., di Salle, E., & Reichardt, J. (2000). Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 alpha-reductase type II. *Pharmacogenetics*, 10(5), 407-13. doi:10.1097/00008571-200007000-00004.
- Manzarbeitia, F., Navarrete, R., & Fernández-Aceñero, M. (2010). Aspectos histopatológicos iniciales de la hiperplasia benigna de próstata: nódulos mixo-inflamatorios. *Actas Urológicas Españolas*, 34(6), 549-554. doi:<https://doi.org/10.1016/j.acuro.2010.02.028>.
- Marya, S., Pradeep-Garg, Gupta, A., & Sharma, V. (1995). Role of Speman in Benign Prostatic Hyperplasia. *Surgical Journal of North India*, 11(2), 126-131.
- MedlinePlus. (2019). Biblioteca Nacional de Medicina de los EE. UU. Recuperado el 25 de agosto de 2019, de https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_presentations/100047_3.htm.
- Molano-Merchán, M. P., Valencia-Islas, N. A., & González, F. D. (2013). Estudio computacional de la potencial actividad sobre el receptor de andrógenos de metabolitos secundarios de líquenes (págs. 1-131). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
-

- Morán, E., Budía, A., Broseta, E., & Boronat, F. (2013). Fitoterapia en Urología. Evidencia científica actual de su aplicación en hiperplasia benigna de próstata y adenocarcinoma de próstata. *Actas Urológicas Españolas*, 37(2), 114-119. doi:10.1016/j.acuro.2012.07.005.
- Mottet, N., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M., Matveev, V., . . . Heidenreichk, A. (2011). Guía de la EAU sobre el cáncer de próstata. Parte II: tratamiento del cáncer de próstata avanzado, recidivante y resistente a la castración. *Actas Urológicas Españolas*, 35(10), 565-579. doi:10.1016/j.acuro.2011.03.011.
- Nash, D. (1976). Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(7), 323-325.
- National Institutes of Health. (2019b). Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado el 18 de junio de 2019, de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/prostata/pro>.
- Nazarko, L. (2004). Benign prostatic hyperplasia: Diagnosis and treatment. *Nursing & Residential Care*, 6(10), 484-487.
- Nelson, W. G. (2016). Commentary on Huggins and Hodges: "Studies on Prostatic Cancer". *Cancer Research*, 76(2), 186-187. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3172.
- Nicholson, T. M., & Ricke, W. A. (2011). Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: Past, present and future. *Differentiation*, 82(4-5), 184–199.
- Núñez-Arango, L. M., & Valencia-Islas, N. A. (2012). Estudio químico, actividad antioxidante y potencial antienvjecimiento del líquen *Flavopunctelia flaventior* (Stirt.) Hale. (Departamento de farmacia ed.). Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia.
- Organización Panamericana de la Salud. (2013). Cáncer en las Américas. Perfiles de País. Recuperado el 27 de noviembre de 2018, de Organización Panamericana de la Salud: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=23457&Itemid=270&lang=es.
- Papaioannou, M., Schleich, S., Prade, I., Degen, S., Roell, D., Schubert, U., . . . Baniahmad, A. (2009). The natural compound atraric acid is an antagonist of the human androgen receptor inhibiting cellular invasiveness and prostate cancer cell growth. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8B), 2210-2223.
- Parveen-Kumar, G., Santosh-Kumar, V., & Anil-Kumar, S. (2016). Pharmacological and phytochemical aspects of lichen *Parmelia perlata*: a review. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm*, 7(1), 102-106. doi:10.7897/2277-4343.07138.
- Pennisi, E. (2016). A lichen ménage à trois. Genomic and imaging studies of lichen add a third symbiotic partner to the textbook pair. *Science AAAS*, 353(6297), 337.
- Perico-Franco, L., Soriano-García, M., Cerbón, M., González-Sánchez, I., & Valencia-Islas, N. (2015). Secondary metabolites and cytotoxic potential of *Lobariella pallida* and *Stereocaulon strictum* var. *compressum*, two lichens from Colombian páramo region. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 3(4), 31-38.
- Pinedo-Pichilingue, A., Martín-San Martín, G., & Carreazo, N. (2016). Discriminación entre hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata mediante el uso de PSA index en consulta externa de urología. *Revista Internacional de Andrología*, 14(1), 13-18. doi:10.1016/j.androl.2015.07.005.
- Pizňak, M., & Bačkor, M. (2019). Lichens affect boreal forest ecology and plant metabolism. *South African Journal of Botany*, 124, 530-539. doi:10.1016/j.sajb.2019.06.025.
-

- Poirier, D. (2008). New cancer drugs targeting the biosynthesis of estrogens and androgens. *Drug development research*, 69, 304-318.
- Quilhot, W., Garbarion, J., Piovano, M., Chamy, M., Gambaro, V., Oyarzu, M., . . . Fiedler, P. (1989). Studies on Chilean lichens. XI secondary metabolites from Antarctic lichens. *Ser. Ciento INACH*, 39, 75-89.
- Raggio, J., Pintado, A., Ascaso, C., De La Torre, R., De Los Ríos, A., Wierzchos, J., . . . Sancho, L. (2011). Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology*, 11(4), 281-292. doi:10.1089/ast.2010.0588.
- Raggio, J. (2013). Fotosíntesis, crecimiento y resistencia a ambientes extremos en líquenes de regiones polares y alpinas. Madrid: Tesis.
- Ramírez, F. (13 de junio de 2013). Uno de cada tres hombres mayores de 50 años tiene cáncer de próstata. Recuperado el 27 de noviembre de 2013, de Ministerio de Salud y Protección Social; Boletín de Prensa No 179: www.minsalud.gov.co/Paginas/Uno-de-cada-tres-hombres-mayores-de-50-años-tiene-cancer-prostata.aspx.
- Rando, A. B. (2002). Resección transuretral de próstata. *Asociación Española de Enfermería en Urología* (84), 37-42. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3101130>.
- Rankovic´, B., & Kosanic´, M. (2015). Application of lichen secondary metabolites in medicine and pharmacy. En B. Rankovic (Ed.), *Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites* (págs. 17-21). Kragujevac: Springer.
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of prostate cancer. *world J Oncol*, 10(2), 63-89. doi:10.14740/wjon1191. Epub 2019 Apr 20.
- Risbridger, G., & Taylor, R. (2005). Physiology of the male accessory sex structures: The prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. En J. D. Neill, & P. Wassarman (Edits.), *Physiology of reproduction* (3 ed., Vol. 1, pág. 1154).
- Roell, D., & Baniahmad, A. (2011). The natural compounds atraric acid and N-butylbenzene-sulfonamide as antagonists of the human androgen receptor and inhibitors of prostate cancer cell growth. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 322, 1-8.
- Rojas, F., Manzo Nedes, J., Soto Cid, A. H., Aranda Breu, G. E., Juárez Ávila, G. A., Toledo Cárdenas, R., . . . Hernández Aguilar, M. E. (2011). El receptor de andrógenos en la fisiopatología prostática. *eNeurobiología*, 2(4), 1-15.
- Rojas, J., Díaz-Santos, M., & Valencia-Islas, N. (2015). Metabolites with antioxidant and photo-protective properties from *Úsnea roccellina* Motyka, a lichen from Colombian Andes. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 3(4), 18-26.
- Russo, A., Caggia, S., Piovano, M., Garbarino, J., & Cardile, V. (2012). Effect of vicinacin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: Role of Hsp70 protein. *Chemico-Biological Interactions*, 195(1), 1-10.
- Russo, A., Cardile, V., Piovano, M., Caggia, S., Espinoza, C., & Garbarino, J. (2010). *Chemico-biological Interactions*, 184, 352–358. doi:10.1016/j.cbi.2010.01.032
- Shuk-Mei, H. (2004). Estrogens and Anti-Estrogens: key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. *Journal of Cellular Biochemistry*, 91, 491–503. doi:10.1002/jcb.10759.
-

- Smith, M., Kaufman, D., George, D., Oh, W., Kazanis, M., Manola, J., & Kantoff, P. (2002). Selective aromatase inhibition for patients with androgen-independent prostate carcinoma a phase II study of letrozole. *American Cancer Society*, 95(9), 1864–1868. doi:10.1016/j.mce.2008.08.013
- Spribile, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M., . . . McCutcheon, J. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 353(6298), 488-492. doi:10.1126/science.aaf8287.
- Steven, A., & Kaplan, M. D. (2007). Utilidad de los antagonistas de los receptores muscarínicos en el tratamiento de los varones con síntomas del tracto urinario inferior secundarios a HBP. *Actas Urológicas Españolas*, 31(2), 86-91. doi:10.1016/S0210-4806(07)73604-5.
- Tan, M., LI-Jun , Xu, H., Melcher, K., & Yong, E.-I. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36, 3-23.
- Toledo, F., García, A., León, F., & Bermejo, J. (2004). Ecología química en hongos y líquenes. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 28(109), 509-528. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Javier_Marante/publication/260227622_Ecologia_a_Quimica_en_Hongos_y_Liquenes/links/56eeaeef008aea35d5b9a038d/Ecologia-Quimica-en-Hongos-y-Liquenes.pdf
- Tran, C., Ouk, S., Clegg, N., Chen, Y., Watson, P., Arora, V., . . . Sawyers, C. (2009). Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*, 324(5928), 787–790. doi:10.1126/science.116817.
- Uemura, M. T. (2008). Novel 5 α -steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Science*, 99, 81-86. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00656.x.
- Valencia-Islas, N., Zambrano, A., & Rojas, J. (2007). Ozone reactivity and free radical scavenging behavior of phenolic secondary metabolites in lichens Exposed to Chronic Oxidant Air Pollution from Mexico City. *J Chem Ecol*, 33(8), 1619-1634. doi:10.1007/s10886-007-9330-1.
- Wang, K., F. D., Jin, S., Xing, N., & Niu, Y. (2014). Differential expression of 5-alpha reductase isozymes in the prostate and its clinical implications. *Asian Journal of Andrology*, 16(2), 274-279. doi:10.4103/1008-682X.123664.
- Wigley, W., Prihoda, J., Mowszowicz, I., Mendonca, B., New, M., Wilson, J., & Russell, D. (1994). Natural mutagenesis study of the human steroid 5 alpha-reductase 2 isozyme. *Biochemistry*, 33(5), 1265-70. doi:10.1021/bi00171a029.
- World Health Organization. (2019a). Global Cancer Observatory. Recuperado el 20 de junio de 2019, de <https://gco.iarc.fr/today/home>.
- Xu, M., Heidmarsson, S., Olafsdottir, E., Buonfiglio, R., Kogej, T., & Omarsdottir, S. (2016). Secondary metabolites from cetrarioid lichens: Chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential. *Phytomedicine*, 23(5), 441–459.
- Yamaguchi, N., Morizane, S. Y., Iwamoto, H., Hikita, K., Sejima, T., & Takenaka, A. (2019). Flutamide as an alternative anti-androgen agent and predictor of the efficacy of novel androgen receptor-targeted agents. *Anticancer Res.*, 39(7), 3879-3885. doi:10.21873/anticancer.13538.
- Yamazaki, M. M. (1965). Biosynthesis of Lichen Depsides, lecanoric acid and atranorin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 13(8), 1015–1017. doi:10.1248/cpb.13.1015
- Yousuf, S., Choudhary, M. I., & Atta-ur-Rahman. (2014). Lichens: chemistry and biological activities. *Studies in natural products chemistry*, 43, 223-259. doi:10.1016/B978-0-444-63430-6.00007-2.
-

Anexo A: Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

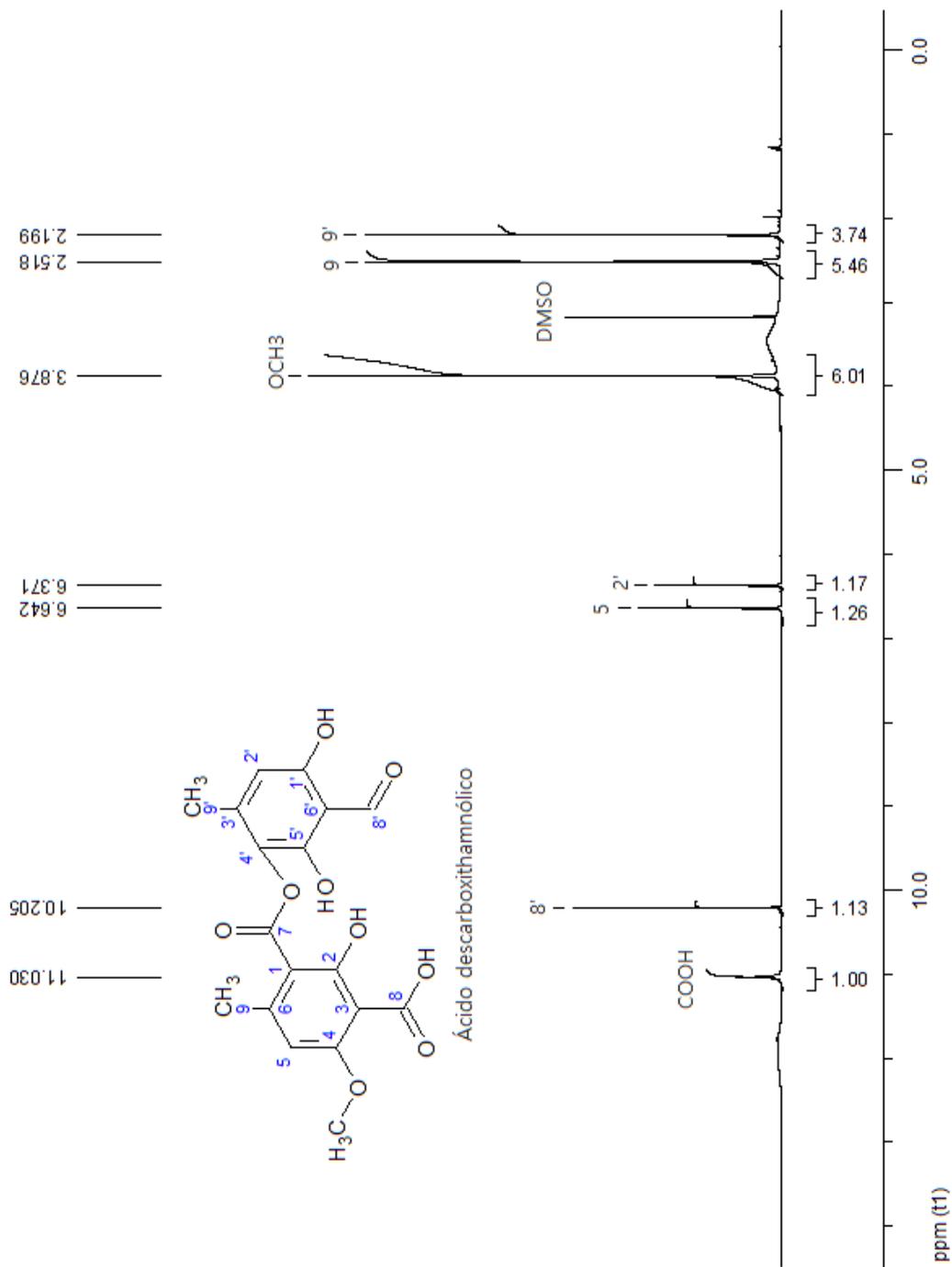


Figura A-1. Espectro ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) del ácido descarboxithamnónico (2).

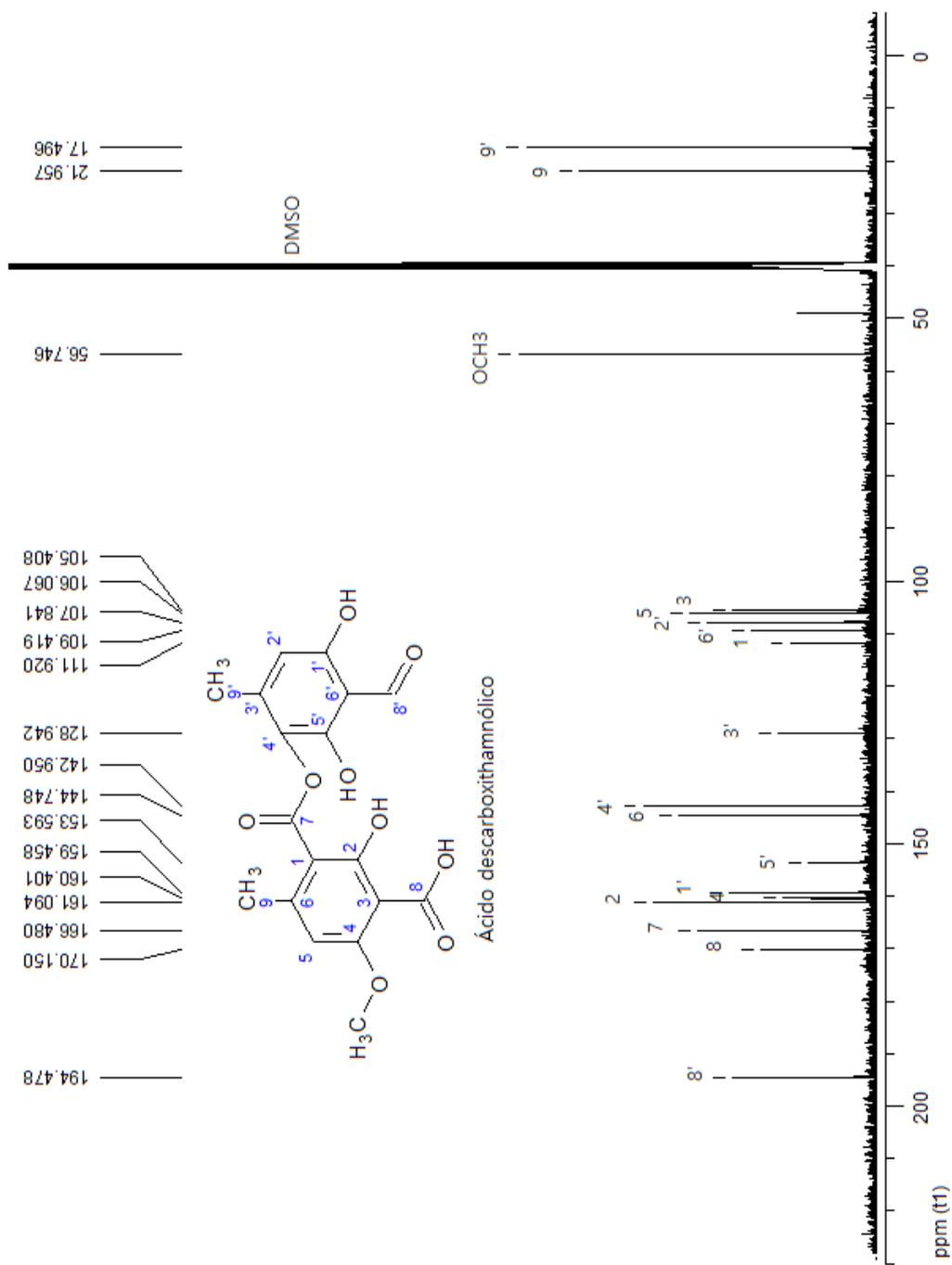


Figura A-2. Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) del ácido descarboxithamnónico (2).

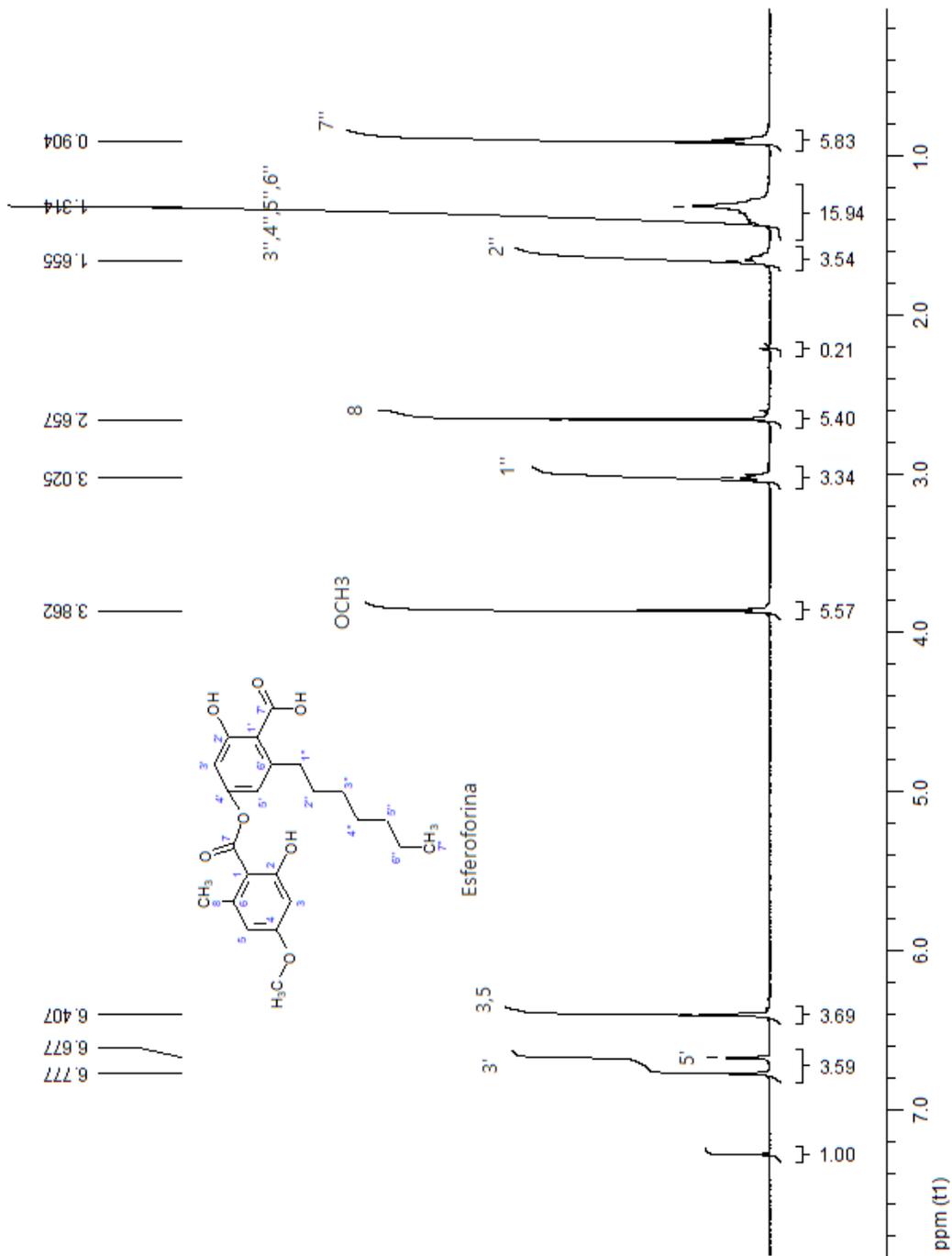


Figura A-3. Espectro ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) de la esferoforina (3).

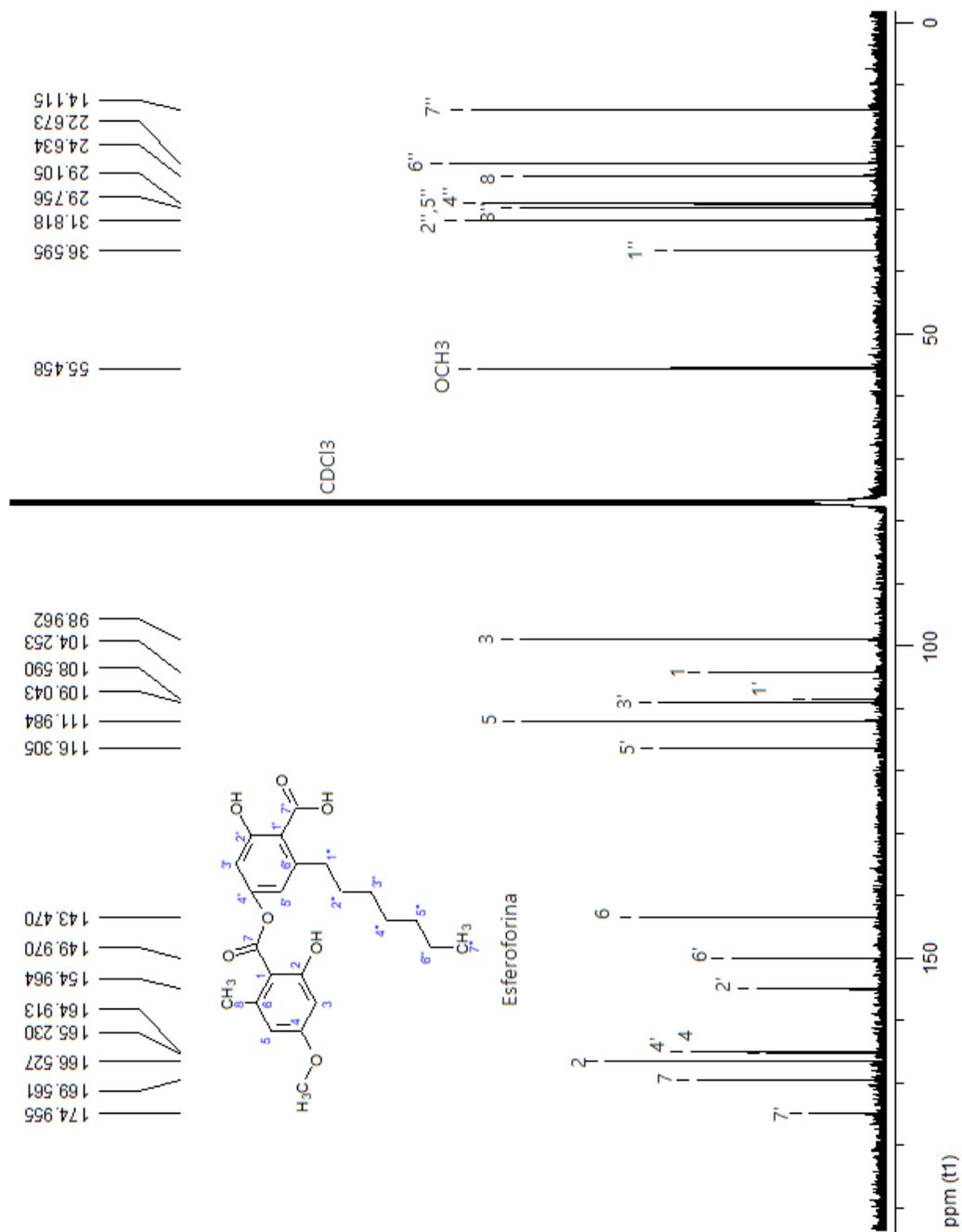
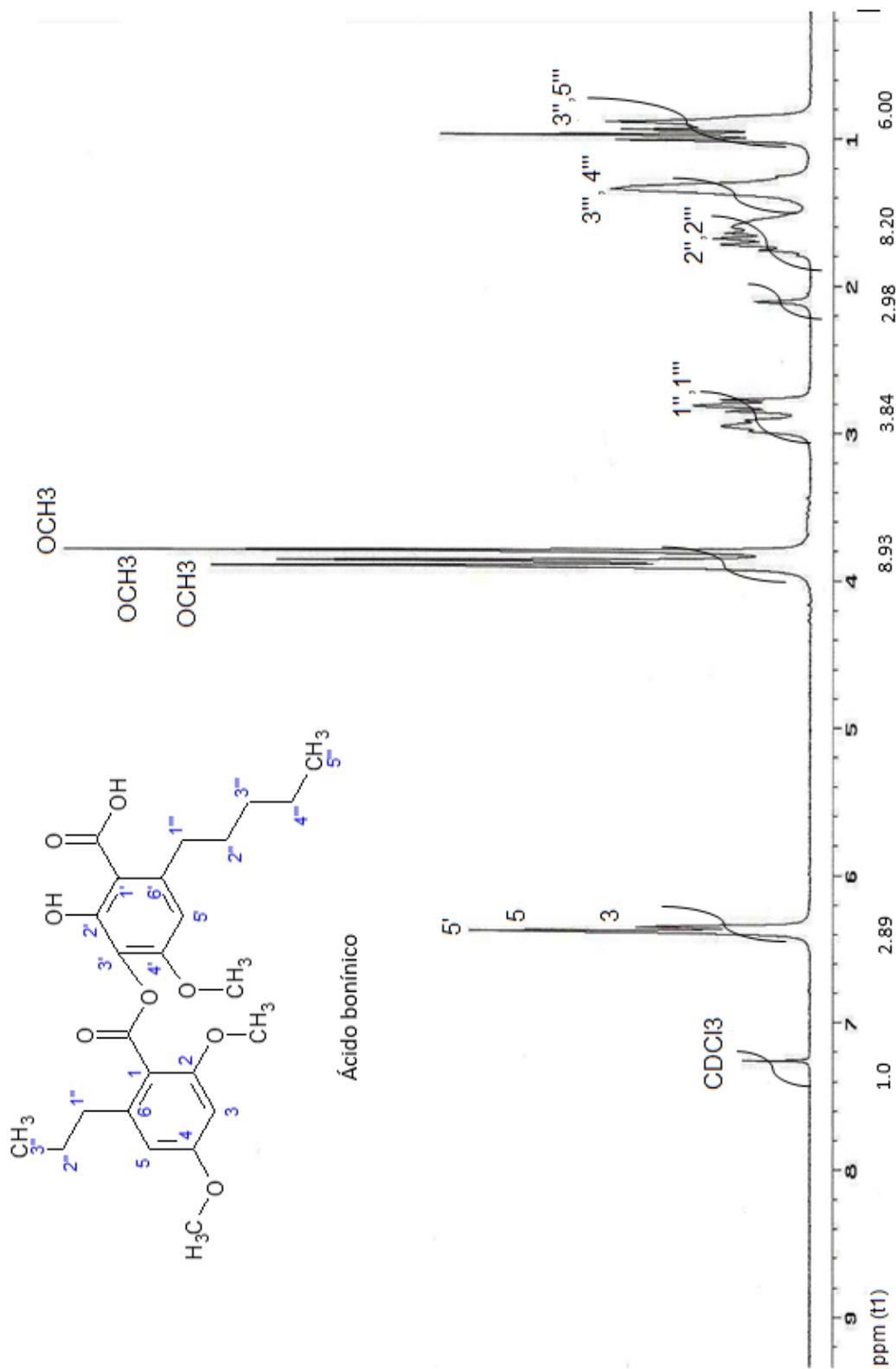


Figura A-4. Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) de la esferoforina (3).

Figura A-5. Espectro ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) del ácido bonínico (5).

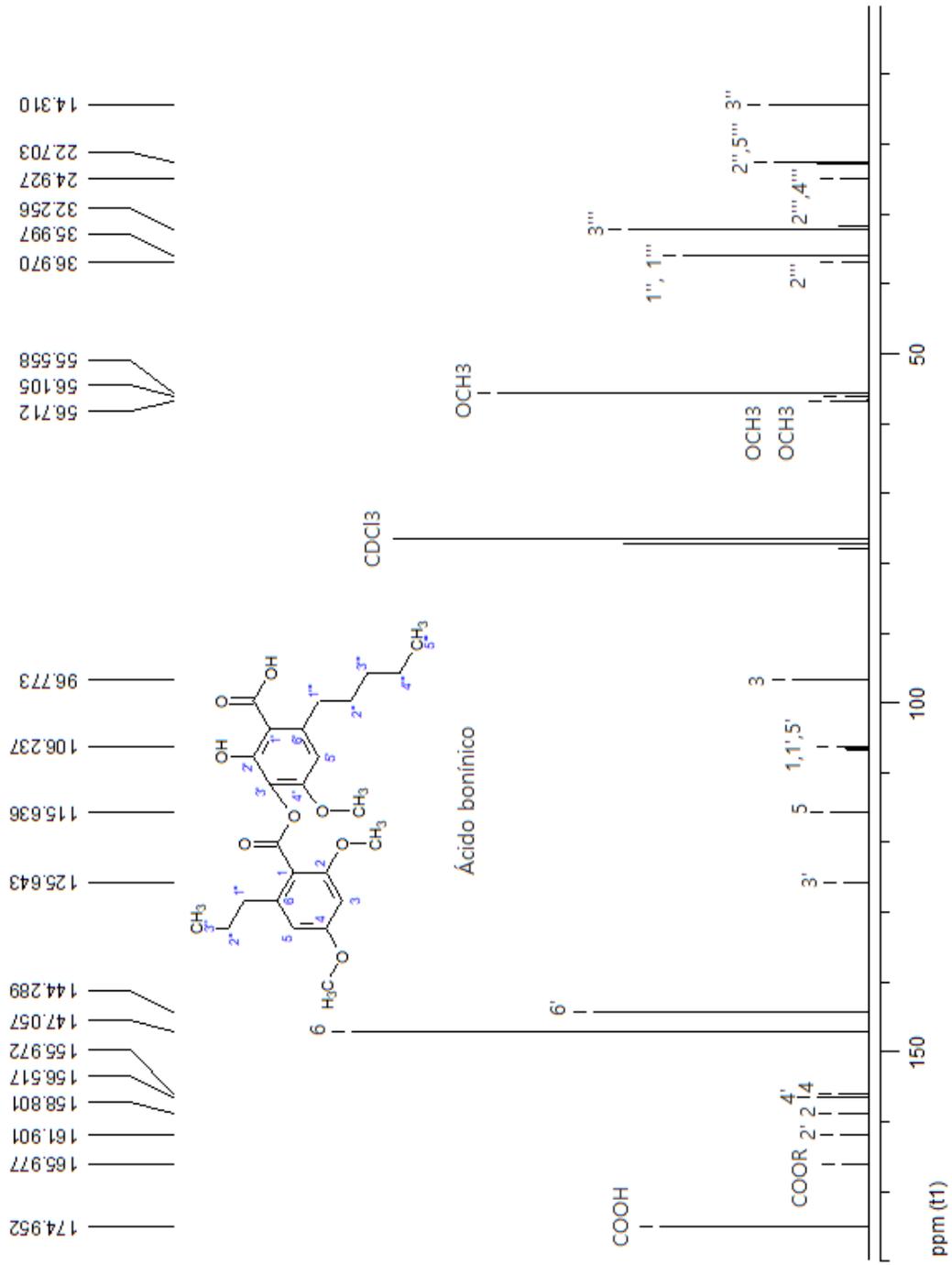


Figura A-6. Espectro ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) del ácido bonínico (5).

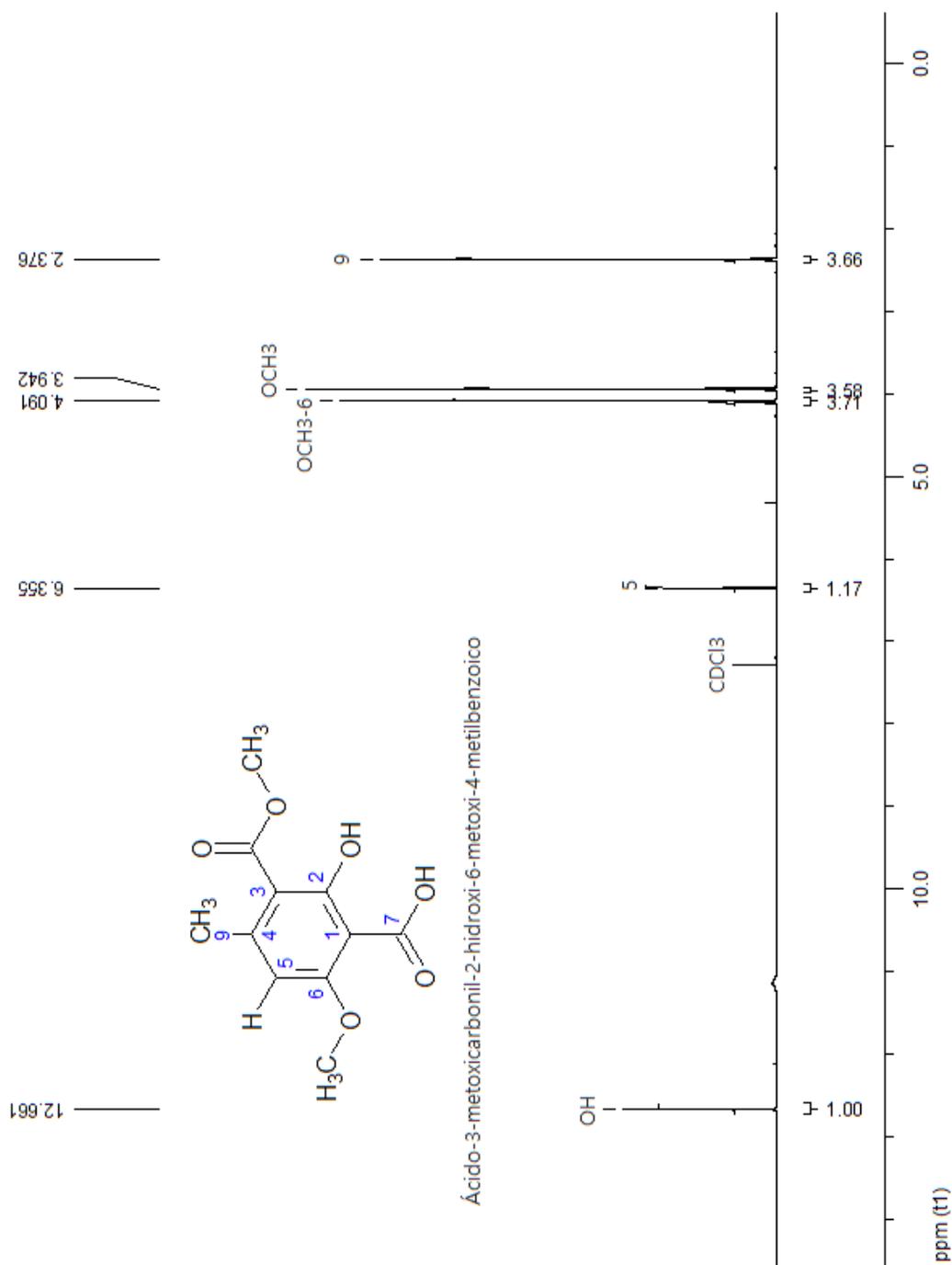
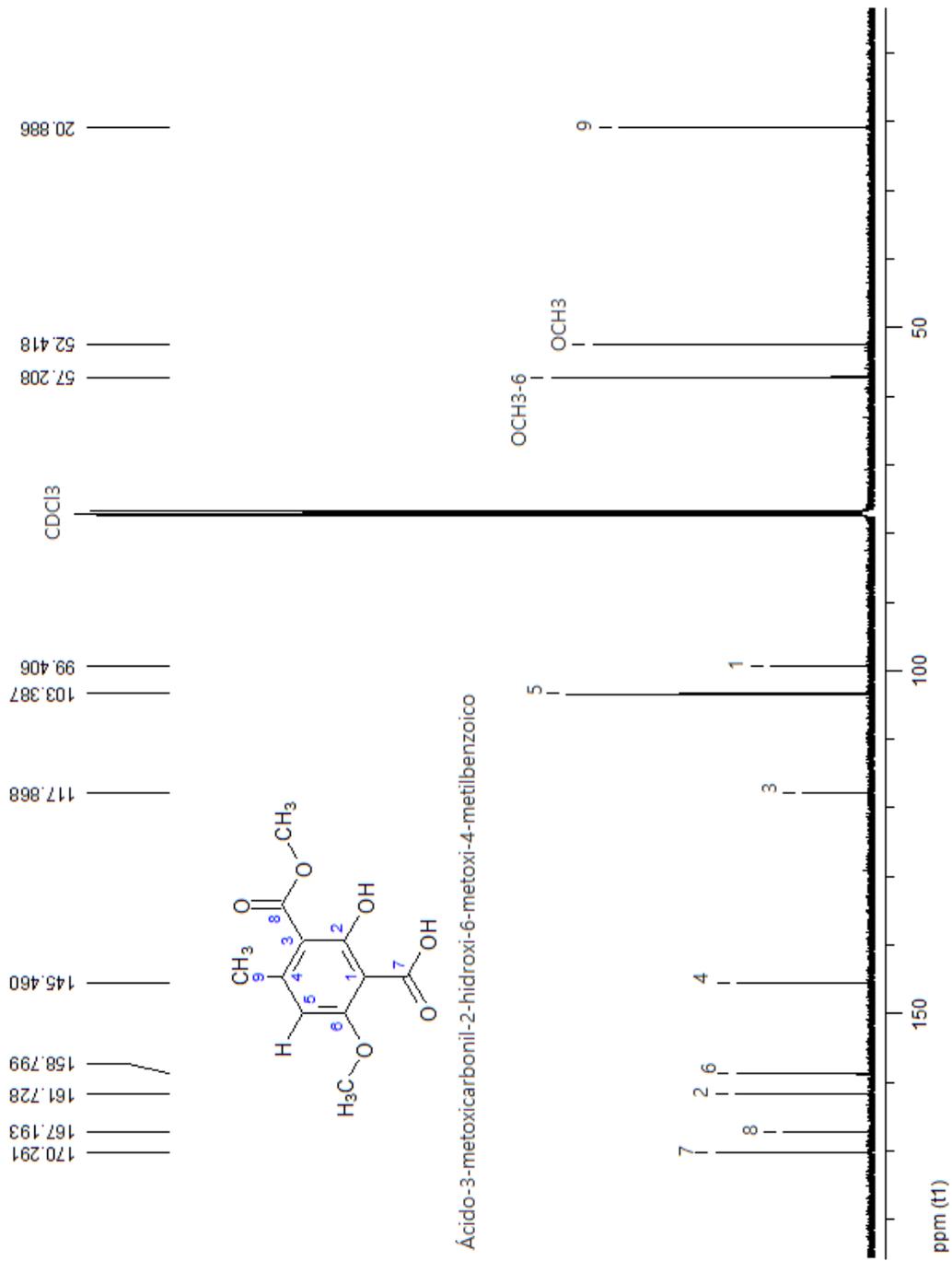


Figura A-7. Espectro ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) del ácido 3-metoxicarbonil-2-hidroxi-6-metoxi-4-metilbenzoico (6)



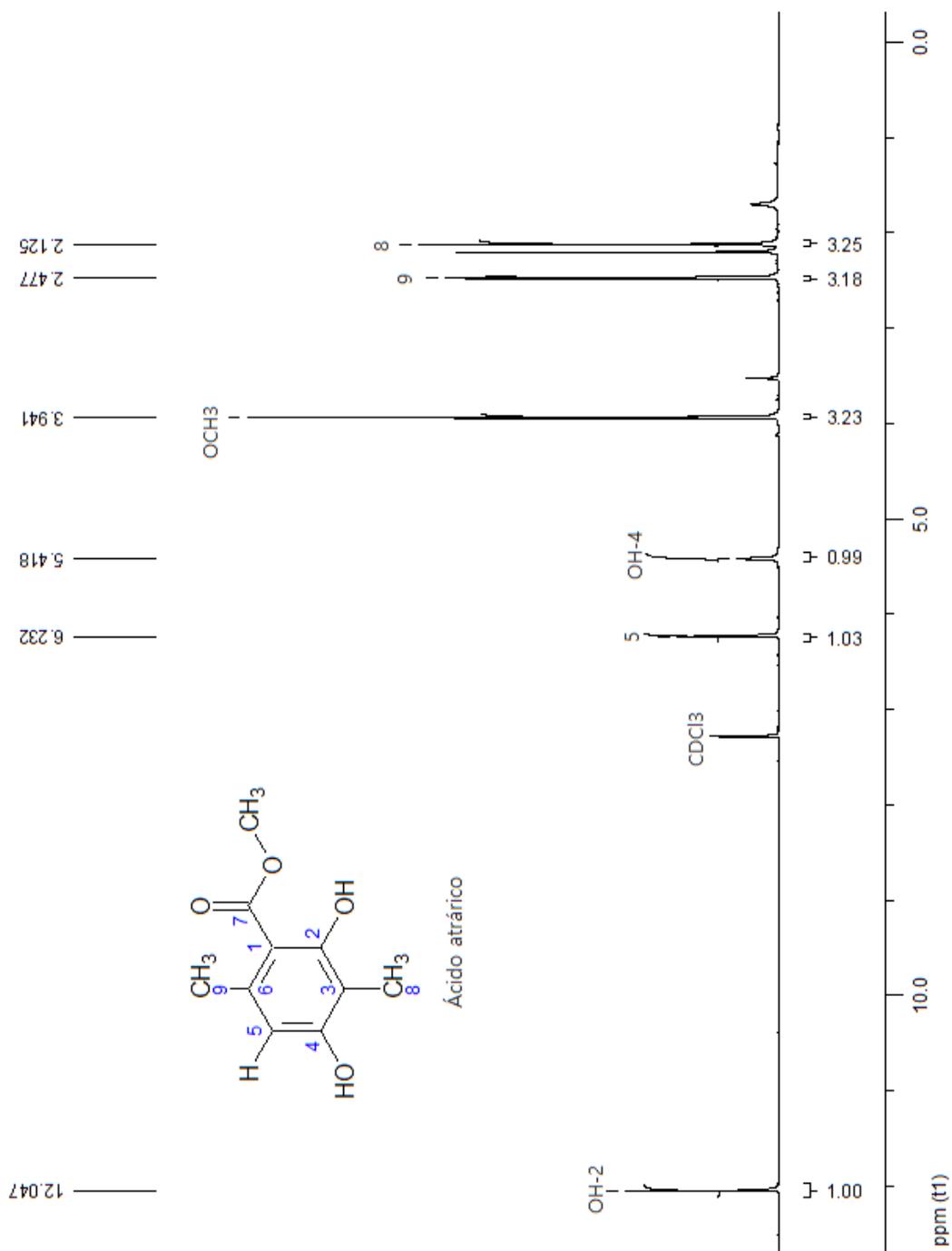


Figura A-9. Espectro ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) del ácido atrárico (10).

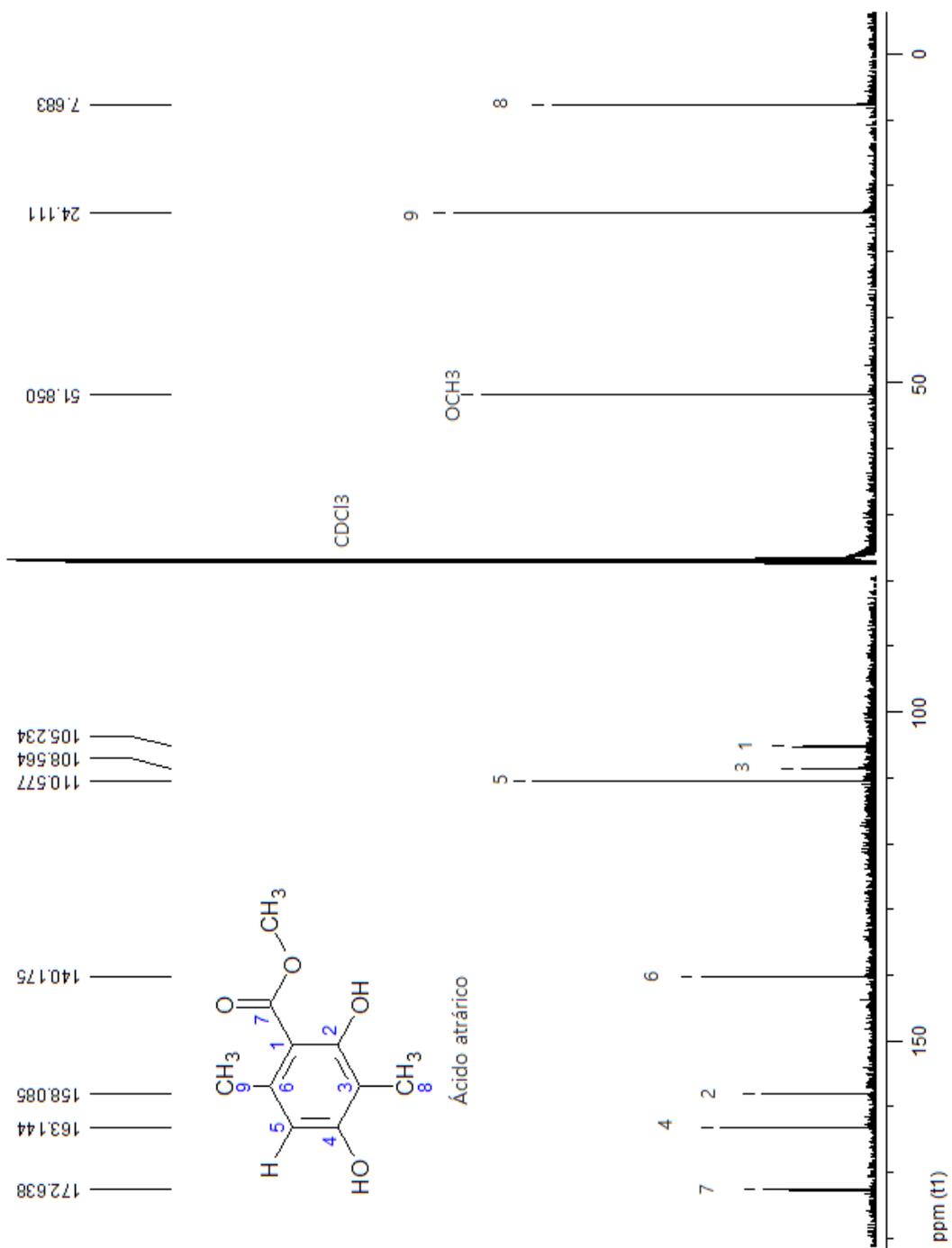


Figura A-10. Espectro ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) del ácido atrático (10).

Anexo B: Inhibición de la 5 α -R2 y P450-arom

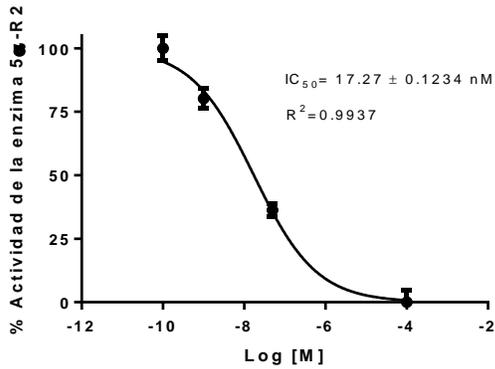


Figura B-1. Inhibición de la enzima 5 α -R2 por el ácido atrárico (10)

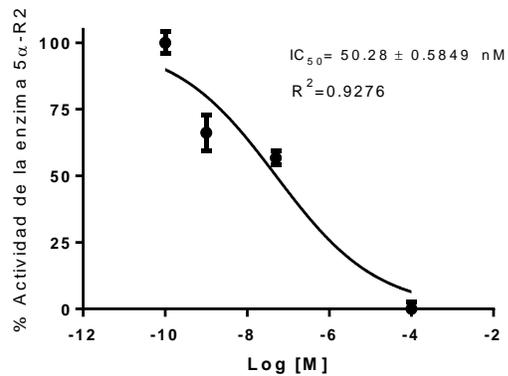


Figura B-2. Inhibición de la enzima 5 α -R2 por la esferoforina (3)

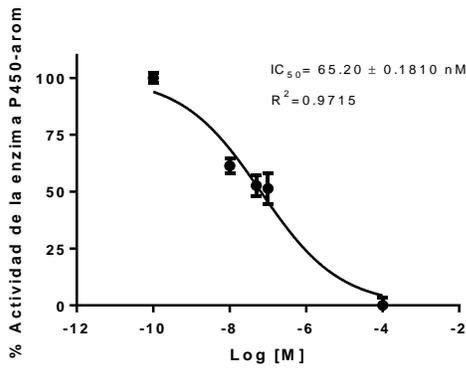


Figura B-3. Inhibición de la enzima P450-arom por el ácido atrárico (10)

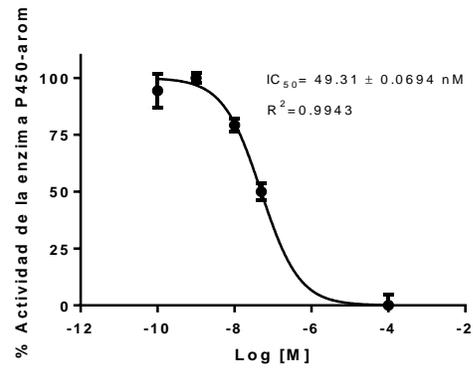


Figura B-4. Inhibición de la enzima P450-arom por la atranorina (4)