

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Determinación de la actividad *in vivo* sobre la biosíntesis y acción de andrógenos endógenos de sustancias liquénicas seleccionadas

Johan Arturo López Ladino

Universidad Nacional de Colombia

Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2021

Determinación de la actividad *in vivo* sobre la biosíntesis y acción de andrógenos endógenos de sustancias liquénicas seleccionadas

Determination of the *in vivo* activity on the biosynthesis and action of endogenous androgens of selected lichenic substances

Johan Arturo López Ladino

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias – Farmacología

Director (a):

Dra. Norma Angélica Valencia Islas

Línea de Investigación:

Farmacología básica

Grupos de Investigación:

Grupo de Investigación en Química Medicinal

Grupo de Investigación en Estudios Biológicos y Fisicoquímicos de líquenes colombianos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de farmacia

Bogotá, Colombia

2021

Para mí, la ciencia es otro idioma que utilizamos para hablar sobre los mismos milagros de los que habla la fe.

Kala

¿Aún somos muy jóvenes, sabes?! ¡Deja de lado tus miedos y ve a perseguir aquello que quieres! El solo hecho de animarte a hacerlo cambiará tu vida.

Kaori Miyazono

Agradecimientos

Agradezco a la vida por permitirme vivir esta etapa de crecimiento tanto personal como profesional, por los retos y desafíos que me permitieron mejorar día a día.

A mis papás Patty y Diego, a mi abuela Alicia, a mi tía Pily y demás familia, quienes estuvieron incondicionalmente apoyándome en esta etapa, quienes han sido inspiración constante, como también ejemplo de amor, disciplina y persistencia. Ni la partida de los seres queridos de este mundo puede romper los lazos de amor.

A mi directora de tesis, Doctora Norma Angélica Valencia Islas, por su acompañamiento y enseñanzas, por su labor de docente y por su amistad.

Al grupo de investigación en Química Medicinal y al grupo de investigación en Estudios Biológicos y Físicoquímicos de Líquenes Colombianos, al profesor Doctor José Leopoldo Rojas, al Maestro en Ciencias Roberto Dávila, a la candidata a Doctora Lissy Núñez, a David, a Yenifer, y demás miembros.

A Maggie, quien fue motivación constante, un apoyo infinito en todo sentido en este proceso, tanto en los buenos momentos como en los difíciles. Gracias por tantas enseñanzas, por ayudarme a ser mejor persona, por acompañarme hasta el final.

A Andrea y a Gustavo, por el compromiso y profesionalismo permanente, por acompañarme en la experimentación y en otros espacios, por permitirme compartirles un poco de amor por la academia y por la ciencia.

A la Universidad Nacional de Colombia, al Departamento de Farmacia y a la Facultad de Ciencias, por permitirme hacer parte de este programa de Maestría, por el apoyo mediante la Beca Auxiliar Docente y la confianza depositada en mí.

A los profesores Maestro en Ciencias Helber Barbosa y Doctora Yolima Baena por haber depositado su confianza en mí para acompañarlos en sus cursos de pregrado, por su amistad y apoyo. Al Doctor Jesús Becerra, Doctor Milton Crosby, y demás docentes del Departamento de Farmacia con quienes tuve la oportunidad de compartir y aprender. Al profesor Doctor Luis Fernando Ospina, por su acompañamiento y enseñanzas en el bioterio, así como también por el apoyo con los animales de experimentación.

A mi primo Eduard, a mi amigo Alberto, demás compañeros y profesores del Grupo de Investigación en Productos Naturales con Actividad Biológica por su amistad, apoyo, enseñanzas y por abrirme las puertas para compartir espacios académicos y personales.

A mis compañeros de maestría y amigos Patricia Zuluaga, Yeison Rodríguez, Diane Martínez, Angie Sánchez y demás compañeros de posgrado del Departamento de Farmacia por sus enseñanzas, consejos y amistad.

A mis pupilos de pregrado, quienes fueron inspiración para encontrar en la academia más razones para pertenecer a ella en el futuro. Por los buenos momentos durante las clases, en los pasillos y por acompañarme a vivir de otros modos esta etapa.

A los miembros del jurado por sus observaciones y valiosos aportes.

Por último, volver a agradecer a mi familia por creer en mí.

Resumen

Con la finalidad de contribuir al descubrimiento de fármacos para el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos endógenos, como el cáncer de próstata (CP) y la hiperplasia prostática benigna (HPB), que a su vez son problemas de salud pública en el entorno nacional y mundial, dada su alta morbilidad y mortalidad en los hombres maduros, en el presente trabajo se determinó la actividad *in vivo* de los compuestos de origen liquénico: esferoforina (**1**) y ácido atrárico (**2**), mismos que presentaron actividad *in vitro* sobre blancos involucrados en la biosíntesis y/o acción de andrógenos endógenos.

Los compuestos **1** y **2** se obtuvieron a partir de los líquenes *Bunodophoron melanocarpum* y *Stereocaulon strictum*, respectivamente, empleando técnicas fitoquímicas convencionales. Su identidad se confirmó mediante la determinación de sus datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C comparando con los reportados en la literatura. La determinación de la actividad *in vivo* sobre la biosíntesis y/o acción de andrógenos endógenos se llevó a cabo mediante el ensayo Hershberger en ratas macho Wistar adultas. Los animales se sometieron a gonadectomía bajo anestesia de ketamina (75 mg/kg peso corporal (pc) y xilacina (10 mg/kg pc) vía intraperitoneal diez días antes del experimento. Luego, se dividieron al azar en 5 grupos de 7 individuos. Tres grupos fueron los controles y se administraron con aceite vegetal (AV) (200 μL , vehículo); testosterona propionato (TP) (0.4 mg/kg pc disuelto en vehículo) y TP (0.4 mg/kg pc) + finasterida (F) (control positivo) (1 mg/kg pc, disuelto en vehículo) vía subcutánea (SC). Del cuarto al quinto grupo, los compuestos de prueba (2 mg/kg pc disueltos en vehículo (200 μL)) + TP (0.4 mg /kg pc) se administraron diariamente (10 días) vía SC. Al día siguiente de la última administración, los animales se sacrificaron, se extirparon sus órganos dependientes (próstata, vesículas seminales, músculo bulbocavernoso, glándulas de Cowper y glande) y no dependientes (hígado, riñones y glándulas suprarrenales) de andrógenos y se pesaron, expresando estos datos como mg de órgano por 100 g de peso corporal. Adicionalmente, las próstatas fueron sometidas a análisis histopatológico semi-cuantitativo

por histoscore para observar algunas características que podrían suponer un posible efecto antiandrogénico en dicho órgano.

Considerando que **1** y **2** comparando con F y AV, no disminuyeron de manera significativa ($p < 0.05$) el peso de los órganos dependientes de andrógenos endógenos, no presentaron efecto antiandrogénico *in vivo* a la dosis evaluada. Tampoco presentaron efecto *in vivo* sobre el peso y morfología de los órganos no dependientes de andrógenos, indicando de manera preliminar que no poseen efecto tóxico evidente a corto plazo. A nivel histológico, el tejido prostático de los animales tratados con TP presentó características hiperplásicas (en un 100 %) mientras que el tratado con TP + **F** presentó menor porcentaje de éstas (50 %), indicando un efecto protector de este fármaco ante la inducción de hiperplasia por dicho andrógeno. El tejido tratado con TP + **1** o TP + **2** también presentó menor porcentaje de características hiperplásicas (40 y 60 %) infiriendo un efecto protector *in vivo* (en un 60 y 40 %, respectivamente) de estos compuestos. La esferoforina y el ácido atrárico son candidatos para estudios más profundos que permitan desarrollarlos como fármacos para el posible tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos endógenos.

Palabras clave: sustancias liquénicas, antiandrógenos, próstata.

Abstract

With the objective to contribute the discovering of drugs to treat the disorders endogen androgen-dependent like prostate cancer (CP) and prostatic benign hyperplasia, which are public health problem worldwide and in Colombia because their high morbidity and mortality in mature men, in this investigation the *in vivo* activity of the lichen origin compounds sphaerophorin (1) and atraric acid (2) was evaluated. These compounds have been active *in vitro* on targets involved in the biosynthesis and action of endogen androgens.

The compounds 1 y 2 were obtained from the lichens *Bunodophoron melanocarpum* and *Stereocaulon strictum* using phytochemical techniques. Their identity was confirmed by their spectroscopic RMN ^1H and ^{13}C data that was compared with the literature. The *in vivo* activity on the biosynthesis and action of endogen androgens was determined by Hershberger bioassay using male Wistar rats. The animals were castrated under anesthesia (Ketamine 75 mg/kg and xilacine 10 mg/kg) intraperitoneal ten days before the experiment. Then, the rats were distributed randomly in 5 groups of 7 individuals each one. Three groups were the controls: vegetal oil (AV) (200 μL , vehicle); testosterone propionate (TP) (0.4 mg/kg dissolved in the vehicle); and TP (0.4 mg/kg) + finasteride (F) (positive control) (1 mg/kg dissolved in 200 μL of vehicle) subcutaneously. The fourth and fifth groups had the test compounds (both 2 mg/kg dissolved in 200 μL of vehicle) + TP (0.4 mg/kg) that were administrated once daily for 10 days subcutaneously. The day after the last administration, the animals were sacrificed and their organs androgen dependents (prostate, seminal vesicles, bulbocavernosus muscle, Cowper glands and glans) and no androgen dependents (adrenal glands, kidneys, and liver) were obtained and weight. This data was expressed as mg of organ per 100 grams of corporal weight. Additionally, the prostates were analyzed semiquantitatively using histoscore to observe some characteristics that could be a possible antiandrogenic effect in that organ.

Considering that 1 and 2 did not decrease significantly ($p < 0.05$) the weight of the androgen-dependent organs, can be concluded the compounds did not have

antiandrogenic effect *in vivo* at the evaluated dose. They also had no *in vivo* effect on the non-androgen-dependent organs showing no toxic effect preliminarily at short term. Histologically, the prostatic tissue treated with TP was hyperplasic (100%) meanwhile the TP + F had a lower hyperplasic proportion showing that this drug has a protective effect on hyperplasia induced by this androgen. The tissue treated with TP + 1 or TP + 2 also showed a lower proportion of the hyperplasic characteristics (40 and 60% respectively) showing a protective effect *in vivo*. The sphaeorporin and the atraric acid are candidates to continue deeper studies that let develop them as drugs to the possible treatment of androgen-dependent diseases.

Keywords: lichen origin compounds, antiandrogens, prostate.

Contenido

1. Marco teórico y antecedentes	26
1.1 Los andrógenos endógenos testosterona y dihidrotestosterona y su rol biológico	26
1.2 Cáncer de próstata.....	32
1.2.1 Etiología y fisiopatología.....	32
1.2.2 Epidemiología.....	35
1.2.3 Diagnóstico.....	36
1.2.4 Tratamiento	38
1.3 Hiperplasia prostática benigna	44
1.3.1 Etiología y fisiopatología.....	44
1.3.2 Diagnóstico.....	46
1.3.3 Tratamiento	46
1.4 Hongos liquenizados.....	50
1.4.1 Sustancias de origen liquénico	51
1.4.2 Sustancias de origen liquénico como fuente potencial de fármacos para tratar problemas de la próstata.....	54
2. Materiales y métodos.....	58
2.1 Lugares de realización	58
2.2 Obtención de los compuestos	58
2.2.1 Procedimientos experimentales generales.....	58
2.2.2 Consideraciones éticas.....	59
2.2.3 Obtención de esferoforina.....	59
2.2.4 Obtención del ácido atrárico	60
2.2.5 Extracción y purificación de finasterida	61
2.3 Determinación del efecto <i>in vivo</i> sobre la biosíntesis y/o acción de andrógenos endógenos de las sustancias liquénicas mediante el ensayo Hershberger.....	61
2.3.1 Animales de experimentación	61
2.3.2 Consideraciones éticas.....	62
2.3.3 Materiales	62
2.3.4 Orquiectomías	62
2.3.5 Administración de los tratamientos	63
2.3.6 Necropsias.....	63
2.4 Análisis histopatológico de las próstatas	64
2.5 Análisis estadístico.....	66

3. Resultados y discusión	67
3.1 Obtención de las sustancias liquénicas objeto de estudio.....	68
3.1.1 Confirmación de la identidad de las sustancias liquénicas	69
3.1.2 Esferoforina (1).....	69
3.1.3 Ácido atrárico (2).....	72
3.2 Determinación del efecto <i>in vivo</i> sobre la biosíntesis y/o acción de andrógenos endógenos de las sustancias liquénicas purificadas	74
3.3 Análisis histopatológicos de próstatas para determinar posible efecto protector <i>in vivo</i> de las sustancias liquénicas al efecto de la administración de andrógenos	81
3.4 Relación entre la estructura química de las sustancias liquénicas estudiadas y su efecto protector <i>in vivo</i> ante la inducción de hiperplasia en tejido prostático por administración de testosterona	87
4. Conclusiones	90
5. Recomendaciones	91
Anexo A: Aval del Comité de ética de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.....	104
Anexo B: Espectros	106
Anexo C: Coeficientes de variación de los índices de los órganos	116
Anexo D: Test de Shapiro-Wilk	117
Anexo E: Análisis de varianza (ANOVA)	119
Anexo F: Prueba de Tukey	127

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-gónada	28
Figura 2. Biosíntesis de hormonas esteroidales a partir de colesterol	29
Figura 3. Mecanismo de acción del receptor de andrógeno en célula prostática.....	31
Figura 4. Histología de adenocarcinoma de próstata	34
Figura 5. Histología de adenocarcinoma, hiperplasia y neoplasia prostática intraepitelial	35
Figura 6. Incidencia de cáncer en hombres y mujeres en Colombia en el año 2020	36
Figura 7. Antiandrógenos no esteroidales	41
Figura 8. Mecanismos de acción de fármacos usados para tratamiento de CP	43
Figura 9. Próstata normal e hiperplasia prostática benigna	44
Figura 10. Resección transuretral de la próstata	47
Figura 11. Esquema de la sección transversal de un hongo liquenizado.....	51
Figura 12. Biosíntesis de sustancias liquénicas mediante la ruta del acetato- polimalonato	52
Figura 13. Clases estructurales de metabolitos secundarios biosintetizados por la ruta del acetato-polimalonato	53
Figura 14. Correlaciones HMBC (H→C) clave en la determinación estructural de la esferoforina (1).....	71
Figura 15. Correlaciones HMBC (H→C) clave en la determinación estructural del ácido atrácico (2).	73
Figura 16. Órganos extraídos tras necropsia en ensayo Hershberger. Órganos dependientes de andrógenos endógenos: glande, próstata, músculo bulbocavernoso, glándulas de Cowper y vesículas seminales.	75

Figura 17. Efecto (anti)-androgénico <i>in vivo</i> de las sustancias de origen líquénico esferoforina (1) y ácido atrárico (2) en rata	77
Figura 18. Efecto <i>in vivo</i> de las sustancias de origen líquénico esferoforina (1) y ácido atrárico (2) sobre órganos de rata no dependientes de andrógenos	79
Figura 19. Hallazgos histopatológicos en tejidos prostáticos de rata sometidos a diferentes tratamientos <i>in vivo</i>	85
Figura 20. Estructura de patrones de orcinol y β -orcinol y compuestos de origen líquénico objeto de estudio.....	89
Figura 21. Espectro de Infrarrojo de la esferoforina (KBr).	106
Figura 22. Resonancia Magnética Nuclear de ^1H de la esferoforina (400 MHz (CDCl_3)).	107
Figura 23. Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C de la esferoforina (101 MHz (CDCl_3)).	108
Figura 24. Espectro HMQC de la esferoforina (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 101 MHz (CDCl_3)).	109
Figura 25. Espectro HMBC de la esferoforina (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 101 MHz (CDCl_3)).	110
Figura 26. Espectro de Infrarrojo del ácido atrárico (KBr).	111
Figura 27. Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del ácido atrárico (400 MHz (CDCl_3)).	112
Figura 28. Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del ácido atrárico (101 MHz (CDCl_3)).	113
Figura 29. Espectro HMQC del ácido atrárico (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 101 MHz (CDCl_3)).	114
Figura 30. Espectro HMBC del ácido atrárico (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 101 MHz (CDCl_3)).	115

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Fármacos usados en terapia de privación de andrógenos	39
Tabla 2. Propiedades de las isoenzimas 5 α -reductasa	45
Tabla 3. Grupos farmacológicos para manejo de HPB	49
Tabla 4. Propiedades antiproliferativas y proapoptóticas de sustancias liquénicas sobre la próstata.	54
Tabla 5. Sustancias liquénicas con potencial para afectar la biosíntesis y/o acción de andrógenos.	57
Tabla 6. Cromatografía en columna sobre gel de sílice de fracción enriquecida en esferoforina.	59
Tabla 7. Cromatografía en columna sobre Sephadex LH-20 de la fracción FE2s.	60
Tabla 8. Cromatografía en columna sobre Sephadex LH-20 de la fracción F4.	60
Tabla 9. Cromatografía en columna sobre gel de sílice de las tabletas de finasterida	61
Tabla 10. Grupos de experimentación para la evaluación de la actividad antiandrogénica <i>in vivo</i> de la esferoforina y el ácido atrárico.	63
Tabla 11. Aspectos histopatológicos evaluados a los tejidos prostáticos ventrales tratados con sustancias liquénicas o controles y puntuación asignada.....	65
Tabla 12. Compuestos de origen liquénico objeto de estudio	69
Tabla 13. Datos de Resonancia Magnética Nuclear para la esferoforina (1).....	71
Tabla 14. Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido atrárico (2).	73
Tabla 15. Hallazgos histopatológicos en tejido prostático de rata sometido a diferentes tratamientos <i>in vivo</i> . Análisis semicuantitativo.	83
Tabla 16. Puntuación (histoscore) de características presentes en tejidos prostáticos de rata sometidos a diferentes tratamientos <i>in vivo</i>	87

Planteamiento del problema y justificación

Las enfermedades dependientes de andrógenos endógenos, entre ellas el cáncer de próstata (CP) y la hiperplasia prostática benigna (HPB), constituyen problemas de salud pública dada su elevada incidencia y prevalencia en los hombres maduros. El CP es el más prevalente a nivel mundial, seguido del colorrectal, constituyéndose en la segunda causa de muerte debida a cáncer entre los hombres maduros (Kelly et al., 2018). Se estima que para el año 2030 se presenten 1.7 millones de nuevos casos a nivel mundial, con una mortalidad cercana a los 499 mil individuos (Poveda-Matiz et al., 2014).

En Colombia, el CP también es el más prevalente en dichos individuos, seguido del de estómago (Globocan, 2021a). Sus casos se han cuadruplicado entre los años 1990 y 2013 aumentando su incidencia a 13200 casos nuevos por año (Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al., 2015), por ello, el Instituto Nacional de Cancerología lo ha incluido dentro de las líneas prioritarias de investigación en lo relacionado a su etiología, patología, control del riesgo, detección precoz, diagnóstico y tratamiento (Ministerio de Salud y Protección Social, 2012). Asimismo, el Ministerio de Salud y Protección Social lo ha incluido en el Plan Nacional de Detección Temprana, enfocando sus esfuerzos a su diagnóstico en estadios tempranos, mejorando así, su pronóstico (Instituto Nacional de Cancerología, 2017; Ministerio de Salud y Protección Social, 2012).

Por su parte, la hiperplasia prostática benigna (HPB), definida como el crecimiento excesivo del tejido prostático por un aumento en el número de sus células (Caro-Zapata et al., 2018; Instituto Nacional del Cáncer, 2011a), también constituye un problema de salud pública dada su alta prevalencia en los hombres maduros (40 % en la población masculina durante la quinta década de vida y hasta un 90 % durante la novena década de vida) (Lim, 2017; Sociedad Colombiana de Urología, 2014). Cabe mencionar que respecto a este

padecimiento, no se cuenta con una clara descripción de su epidemiología a nivel mundial ni nacional y sus datos de incidencia pueden estar mal estimados debido a que su diagnóstico se inicia por los síntomas del tracto urinario inferior que provoca en los individuos, mismos que podrían incluir condiciones de la vejiga diferentes a la HPB (Arlandis Guzmán et al., 2009). A pesar de ello, se estima su prevalencia mundial del 26.2 % en hombres mayores de los 45 años de edad (Caro-Zapata et al., 2018; Lee et al., 2017).

Entre las opciones terapéuticas más utilizadas para el tratamiento del CP localizado y de la HPB sintomática, la cirugía de extirpación de la próstata completa o de parte de ella es la más recurrida (Daniyal et al., 2014), la cual, al ser una terapia invasiva, afecta la calidad de vida de los pacientes, dados los problemas postoperatorios que se pueden presentar, entre ellos, disfunción eréctil, limitación de la actividad física intensa e incontinencia urinaria (Cataño y Morales, 2009). Por ello, el tratamiento farmacológico ha adquirido importancia porque ayuda a disminuir el tamaño prostático sin necesidad de cirugía (Fitzpatrick y Artibani, 2006).

Considerando que el CP y la HPB son enfermedades dependientes de andrógenos endógenos, su tratamiento se ha enfocado a modular la biosíntesis y/o acción de dichas hormonas (Daniyal et al., 2014; Fitzpatrick y Artibani, 2006; Helsen et al., 2014). Los principales andrógenos en el hombre son la testosterona (T) y su metabolito reducido dihidrotestosterona (DHT), siendo la T, la forma circulante principal (ca. 95 %). Esta hormona es secretada principalmente por las células Leydig de los testículos en respuesta a la estimulación de la hormona luteinizante (LH), mientras que una pequeña cantidad, es producida por la corteza suprarrenal y el hígado. A su vez, la DHT es biosintetizada a partir de T, en tejidos que expresan a la enzima esteroide 5 α -reductasa (EC 1.3.99.5) (5 α R), como la próstata (Swerdloff et al., 2017).

Tanto T como DHT ejercen sus efectos fisiológicos por activación del receptor de andrógenos (RA), un receptor nuclear de hormona esteroidal inducible por ligando (Gao et al., 2005), permitiendo regular las funciones de los órganos dependientes de andrógenos mediante mecanismos genómicos y/o no genómicos. Las acciones genómicas de los andrógenos se constituyen en el mecanismo de acción "clásico", donde la unión de estos ligandos al receptor provoca que éste asuma una conformación especial que conduce a la activación o inactivación de la transcripción génica que se traduce en respuestas intracelulares como la proliferación celular (Gao et al., 2005). Por ello, el antagonismo del

RA constituye un blanco farmacológico para el tratamiento del CP (Lamb y Neal, 2013) ya que reprime la proliferación celular. Por otro lado, el mecanismo de acción no genómico es definido como aquellas respuestas que se generan independiente a la activación de segundos mensajeros, a la concentración de calcio intracelular y otros receptores como PI3K y adenilato ciclasa (Bottino y Lanari, 2010; Shtivelman et al., 2014).

A pesar de que ambos andrógenos interactúan con el RA, la DHT es más afín por éste, además de que posee mayor potencia para regular la expresión génica y la proliferación celular, siendo considerada como la responsable del agrandamiento prostático (Vickman et al., 2020). Una sobreexpresión de la 5 α R (como ocurre en el tejido prostático hiperplásico en comparación con el normal) da como resultado cantidades elevadas de DHT disponibles para exacerbar el crecimiento de la próstata, por lo cual la inhibición de dicha enzima es una herramienta valiosa para reducir la proliferación y el crecimiento prostático en la HPB (Edwards, 2008; Vickman et al., 2020).

Dado que el CP depende del agonismo causado tanto por T como DHT sobre el RA, su tratamiento farmacológico se ha enfocado al empleo de agentes que modifiquen la biosíntesis de T (mediante el agonismo o antagonismo del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina a nivel del eje hipotálamo hipofisario gonadal) o que impidan la unión tanto de T como DHT por el RA (Helsen et al., 2014; Stein et al., 2014; Sternberg et al., 2014; Gamat y McNeel, 2017). Estas estrategias conocidas como terapia de privación de andrógenos (TPA) o castración química, puede llevarse a cabo también de manera quirúrgica mediante extirpación de los testículos (Gillesen et al., 2015), sin embargo, como es poco aceptada por los pacientes, adquiere relevancia el tratamiento farmacológico (Gamat y McNeel, 2017).

A pesar de que la mayoría de los pacientes con CP responden inicialmente a la terapia de privación de andrógenos, con el tiempo pueden progresar a un CP resistente a la castración (CRPC) (Crona et al., 2015; Uemura et al., 2007; K. Wang et al., 2014) cuyos posibles mecanismos de resistencia incluyen la hiperactividad del RA a través de la sobreexpresión de cofactores o mutaciones somáticas promiscuas específicas que permiten que una variedad de otras hormonas esteroidales y antiandrógenos clásicos como el acetato de ciproterona, flutamida y bicalutamida, actúen como ligandos activos (Crona et al., 2015). Cabe mencionar que a la fecha, se ha desarrollado a la enzalutamida (MDV-3100) como fármaco novedoso que puede ser usado en el tratamiento de CRPC

porque antagoniza al RA mutado (Beer et al., 2014). Sin embargo, todavía queda la necesidad de contar con un arsenal de fármacos mayor que presenten nuevos mecanismos de acción que puedan eludir estos mecanismos de resistencia mediados por el RA a fin de mejorar la supervivencia de los pacientes (Centenera et al., 2018).

Como se mencionó, dado que la HPB es una enfermedad que depende principalmente de la DHT, una de las estrategias farmacológicas para su tratamiento se ha enfocado en el uso de fármacos que disminuyan su biosíntesis, mediante la inhibición de la 5 α R (Bratoeff et al., 1997), constituyéndose en uno de los blancos estratégicos para conseguirlo (Sarma y Wei, 2012; Uemura et al., 2007). A la fecha se conocen varios grupos químicos de inhibidores de esta enzima (Aggarwal et al., 2010), siendo los de mayor eficacia clínica los 4-azaesteroides a los que pertenecen la finasterida y la dutasterida (Kurup et al., 2000) que si bien, han resultado muy efectivos en el tratamiento de la HPB, también han mostrado efectos adversos de tipo hormonal entre ellos, impotencia sexual, ginecomastia y disfunción eréctil (Pérez Guerra et al., 2011). Adicionalmente, se han empleado como agentes quimiopreventivos de CP fuera de indicación (off-label) generando alerta por parte de las agencias regulatorias de medicamentos porque su uso continuo puede aumentar el riesgo de desarrollar CP agresivo y cáncer de mama masculino (Cappeta y Stengel, 2013; FDA, 2011).

Dados los inconvenientes que el manejo quirúrgico y farmacológico de la HPB y el CP presentan, la búsqueda de nuevas entidades químicas bioactivas que puedan modular la biosíntesis y/o acción de andrógenos endógenos incluyendo mecanismos potencialmente novedosos, se encuentra justificada, porque permitiría contribuir a un manejo alternativo seguro y eficaz de estas patologías (Centenera et al., 2018; Chowdhury et al., 2019).

En esta búsqueda, la biodiversidad colombiana adquiere un rol relevante a nivel mundial como fuente prometedora de nuevas entidades químicas bioactivas, dada su alta abundancia de recursos naturales vegetales, animales y de origen fúngico (Bernal et al., 2016). De particular interés para este trabajo son los recursos de origen fúngico, a los cuales pertenecen los hongos liquenizados, también llamados líquenes, que son organismos resultantes de la asociación simbiótica entre un hongo llamado micobionte, un alga y/o cianobacteria llamado fotobionte y en ocasiones una levadura como tercer componente (Pennisi, 2016). Resultado de dicha asociación, se origina un organismo anatómica, morfológica y fisiológicamente diferente de los organismos que lo componen

(Nash, 2008), el cual es capaz de prosperar bajo condiciones ambientales extremas en alta radiación solar, temperatura, desecación o humedad; salinidad y contaminación ambiental, entre otros, donde sus constituyentes individuales no podrían sobrevivir por sí mismos (Parasyri et al., 2018; Valencia-Islas et al., 2007). Esto se ha asociado, a que bajo tales condiciones, estos organismos biosintetizan metabolitos secundarios únicos con propiedades biológicas que les permiten protegerse o adaptarse a dichas condiciones extremas, constituyéndose así en una fuente original de compuestos bioactivos (Ranković et al., 2015) que podrían convertirse en fármacos. Adicionalmente, considerando que Colombia ocupa el segundo lugar mundial en biodiversidad de líquenes, a pesar de la baja exploración botánica hecha en el país (Bernal et al., 2016), se incrementa la posibilidad de encontrar sustancias novedosas con diversas propiedades farmacéuticas, entre ellas terapéuticas y cosméticas.

Los estudios científicos, han confirmado que las sustancias aisladas de líquenes son una fuente idónea para la obtención de fármacos para el tratamiento de la HPB y CP (Cardile et al., 2016; Russo et al., 2006). En estudios llevados a cabo en 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 líquénicas presentan mayor afinidad por el RA que sus ligandos endógenos T y DHT (Molano-Merchán y Valencia-Islas, 2013), encontrándose también un mecanismo de interacción novedoso que consiste en unirse a la función de activación dependiente del ligando (AF2) en vez de hacerlo sobre dominio de unión al ligando (LBD) que constituye el sitio bloqueado por los fármacos antiandrogénicos tradicionales (Cardile et al., 2016). Adicionalmente otros investigadores (Papaioannou et al., 2009) determinaron que el compuesto de origen líquénico ácido atrárico, posee efecto antiandrogénico *in vitro* 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 del mismo (PC3 o CV1). En estudios recientes de nuestro grupo, se ha confirmado que las sustancias de origen líquénico son inhibidores *in vitro* de enzimas involucradas en la biosíntesis de andrógenos, encontrándose que la esferoforina y el ácido atrárico inhiben a la enzima 5 α R de origen humano, siendo ligeramente menos potentes que el fármaco finasterida (Polanía-Patiño, 2020) mientras que el ácido atrárico y la atranorina inhiben a la enzima aromatasa encargada de biotransformar a los andrógenos en estrógenos, siendo ambos compuestos ligeramente menos potentes que el fármaco anastrozol (Polanía-Patiño,

2020). Lo anterior convierte a dichas sustancias en candidatos idóneos para evaluarlos *in vivo* a fin de considerarlos como posibles fármacos para el tratamiento de desórdenes dependientes de un exceso de andrógenos o de estrógenos. Cabe mencionar que a la fecha se carece de estudios que hayan evaluado la actividad de dichas sustancias *in vivo*. Con base en estas consideraciones, en el presente trabajo, se determinó la actividad moduladora de la acción y/o biosíntesis de andrógenos endógenos de las sustancias de origen liquénico ácido atrárico y esferoforina en un modelo preclínico. Lo anterior, con la finalidad de valorarlos como posibles fármacos para el tratamiento de patologías dependientes de hormonas masculinas entre ellas el CP y la HPB.

Hipótesis

Considerando que en estudios *in vitro* los compuestos de origen liquénico ácido atrárico y esferoforina inhibieron enzimas involucradas en la biosíntesis de andrógenos y/o antagonizaron al receptor de dichas hormonas, es altamente probable que presenten actividad *in vivo*, constituyéndose en compuestos candidatos para el desarrollo de fármacos que sirvan en el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos endógenos como el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna.

Objetivos

Objetivo general

Determinar mediante el ensayo Hershberger el efecto (anti)-androgénico *in vivo* de algunas sustancias liquénicas con actividad inhibidora *in vitro* de la enzima 5 α -reductasa o antagonismo por el receptor de andrógenos, con la finalidad de contribuir al descubrimiento de alternativas farmacológicas potencialmente mejoradas para el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos endógenos.

Objetivos específicos

- Obtener las sustancias objeto de estudio a partir de fracciones enriquecidas, confirmando su identidad tras comparación con patrones.
- Evaluar actividad (anti)-androgénica *in vivo* de las sustancias purificadas, mediante ensayo Hershberger en ratas, comparando su efecto frente a sustancias activas con dicha actividad.
- Establecer posibles relaciones entre la estructura y la actividad (anti)-androgénica presentadas por las sustancias evaluadas.

1. Marco teórico y antecedentes

1.1 Los andrógenos endógenos testosterona y dihidrotestosterona y su rol biológico

Los andrógenos son sustancias endógenas de naturaleza esteroidea, que se encargan de proporcionar las características masculinas a los varones a través de la activación del receptor de andrógenos (RA) en los tejidos blanco (Schiffer et al., 2018; Walters y Handelsman, 2018). También cumplen funciones reproductivas en las mujeres como el deseo sexual, y son precursores de los estrógenos mediante su aromatización por la enzima aromatasa (Schiffer et al., 2018; Walters y Handelsman, 2018). Los andrógenos principales en el hombre son la testosterona (T) y su metabolito reducido, diez veces más potente a nivel de RA, dihidrotestosterona (DHT), mientras que en la mujer, el principal andrógeno es la testosterona (Walters y Handelsman, 2018).

Los andrógenos no sólo regulan funciones sexuales sino también comportamentales a lo largo de la vida de hombres y mujeres, estando presentes desde la etapa prenatal donde permiten el desarrollo de los tejidos reproductivos (Davey y Grossmann, 2016; Gleicher et al., 2016). Así, T tiene efecto sobre múltiples tejidos, por ejemplo, estimula el crecimiento del músculo esquelético, aumenta la densidad mineral ósea, suprime al sistema inmunológico e incrementa la producción de la hormona adiponectina que promueve el metabolismo de las grasas (Handelsman et al., 2018; Manieri et al., 2019; Roved et al., 2017). Por su parte, la DHT posee efectos androgénicos similares a los de la testosterona, entre ellos, el aumento de la síntesis de óxido nítrico en endotelio, la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias y la estimulación de la eritropoyesis (Sakhri y Gooren, 2007; Swerdloff et al., 2017).

En el hombre, tanto T como DHT promueven el desarrollo prostático, de los genitales externos y de los demás órganos masculinos (Pejčić et al., 2017). En los hombres maduros, los niveles sanguíneos de T son hasta 10 veces mayores que los de DHT, en contraste con los niveles intra-prostáticos que son aproximadamente 5 veces mayores. Especialmente en el estroma prostático, se alcanzan hasta 10 veces las concentraciones de DHT respecto al epitelio. De este modo, la proliferación celular se desencadena principalmente en el estroma, como respuesta al efecto de la DHT sobre el RA (Friedrich et al., 2008; Pejčić et al., 2017).

En el hombre, la testosterona es producida desde la semana seis del embarazo por las células de Leydig de los testículos mientras que en la mujer, es biosintetizada en los ovarios desde el primer trimestre de gestación a partir de dehidroepiandrosterona y androstenediona (Burger, 2002; McEwan y Brinkmann, 2000). Ambos procesos biosintéticos, están mediados por el eje hipotálamo hipofisiario gonadal (**Figura 1**), que inicia en el hipotálamo mediante la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH), acoplándose al receptor de LHRH en la hipófisis, generando como respuesta la secreción de hormona leutinizante (LH), la cual ejerce su acción en las gónadas (en el caso de la **Figura 1**, se explica el proceso que ocurre en el varón) mediante la activación de su receptor, estimulando así la producción de T a partir de colesterol (**Figura 2**) (Denmeade e Isaacs, 2002; McEwan y Brinkmann, 2000).

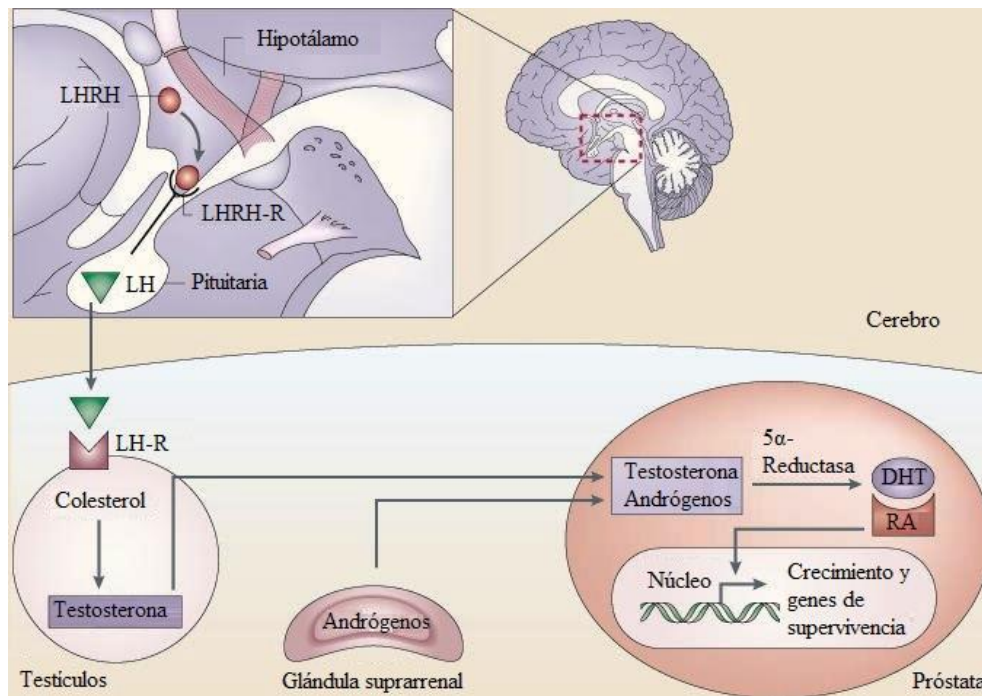


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Denmeade e Isaacs, 2002). LHRH = Hormona liberadora de hormona gonadotropina; LHRH-R = Receptor de LHRH; LH = Hormona leutinizante; LH-R = Receptor de LH; DHT = Dihidrotestosterona; RA = Receptor de andrógenos.

Una vez biosintetizada la T en las gónadas (**Figura 2**), ésta llega al tejido blanco y difunde al citoplasma de las células que lo conforman, donde es reducida a DHT por la enzima 5 α -reductasa (5 α R). Lo anterior, como un mecanismo de amplificación androgénica, pues producto de dicha reducción, la DHT es diez veces más potente que T para interactuar con el RA (McEwan y Brinkmann, 2000; McHenry et al., 2014). También en el estroma del tejido blanco se lleva a cabo dicha reducción (McEwan y Brinkmann, 2000).

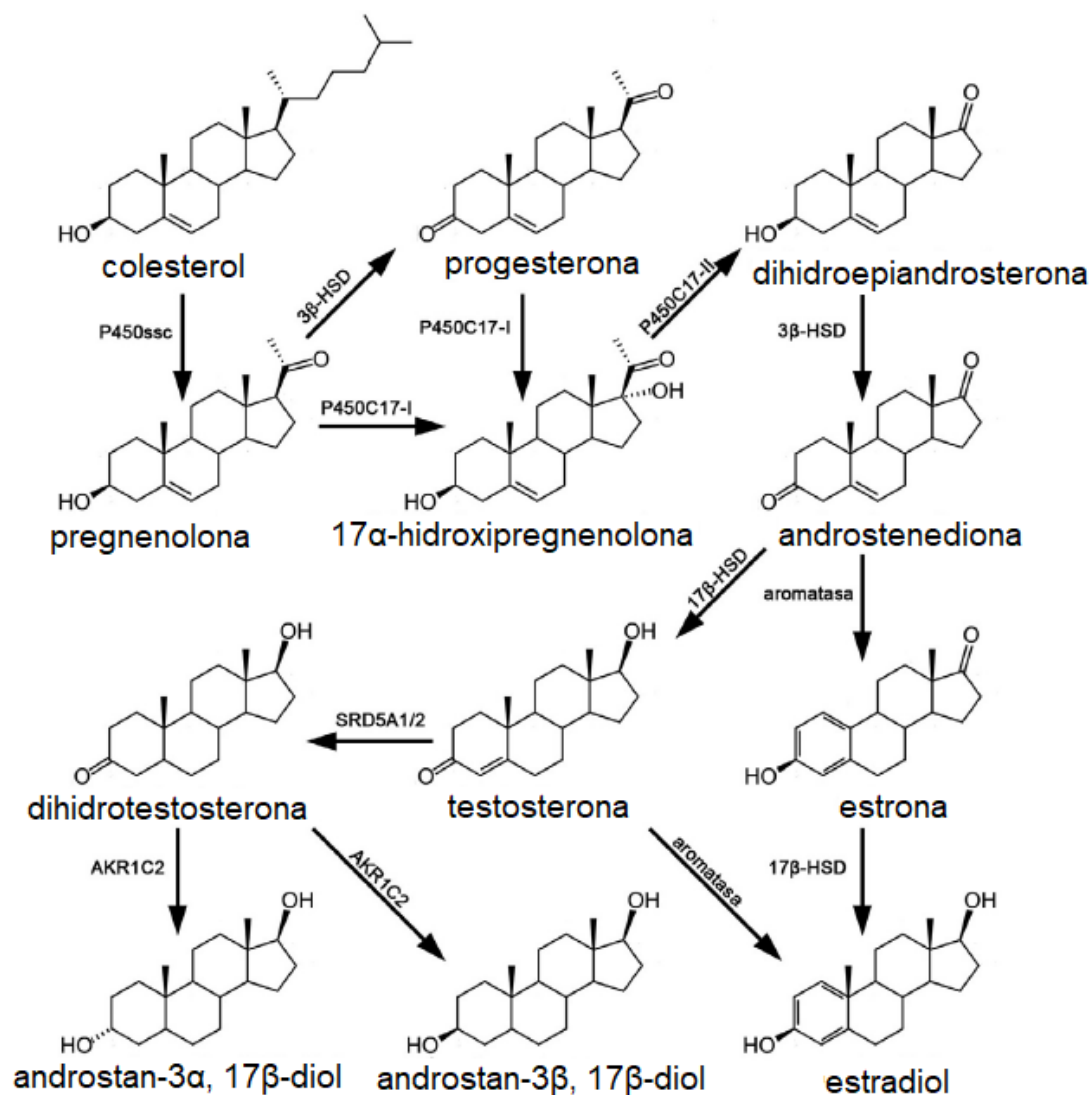


Figura 2. Biosíntesis de hormonas esteroidales a partir de colesterol. (McHenry et al., 2014). P450ssc = citocromo P450 enzima de clivaje de cadena lateral de colesterol; P450C17-I = citocromo P450 esteroide 17 α -monooxigenasa; HSD = hidroxiesteroide deshidrogenasa; SRD5A 1/2 = enzima 5 α -reductasa 1 y/o 2; AKR1C2 = aldo-ceto reductasa familia 1 miembro C2.

El RA es una proteína de 919 aminoácidos que tiene 3 grandes dominios: el N-terminal con función moduladora, el de unión a ADN y el de unión a ligando, además de una pequeña región que conecta estos dos últimos dominios llamada bisagra (Gao et al., 2005; Rojas-Durán et al., 2011). Adicionalmente, dos funciones de transactivación han sido reportadas en este receptor nuclear: la AF1 que se encuentra en la región N-terminal y es independiente del ligando, y la AF2, dependiente del mismo (Gao et al., 2005). El RA

(Figura 3) se encuentra en el citoplasma celular asociado al complejo de proteínas chaperonas de choque térmico (HSP70) a través de interacciones con el dominio de unión al ligando. Tras el acoplamiento de su ligando endógeno, ocurre una serie de cambios conformacionales que disocian a las proteínas de choque térmico del RA, permitiendo la dimerización de éste y su fosforilación para ser translocado al núcleo celular, en donde se une a elementos de respuesta a andrógenos en el ADN (una secuencia de seis nucleótidos 5'-TGTTCT-3'). Tras el reclutamiento de proteínas co-reguladoras de la transcripción, que involucran tanto coactivadores como correpresores, se inicia el proceso de expresión de genes reguladores por el RA (Lamb y Neal, 2013; McEwan y Brinkmann, 2000).

De manera adicional, se ha identificado una vía no genómica para la activación de la respuesta androgénica, presente en músculo esquelético, osteoblastos y células de cáncer de próstata, en la que el RA interactúa con otras proteínas citoplasmáticas generando los cambios conformacionales ya mencionados, activando señalización por cinasas o modulación de niveles intracelulares de calcio, participando así en otros procesos, tales como, el crecimiento de músculo esquelético y la formación de hueso (Brooke et al., 2015; Gao et al., 2005).

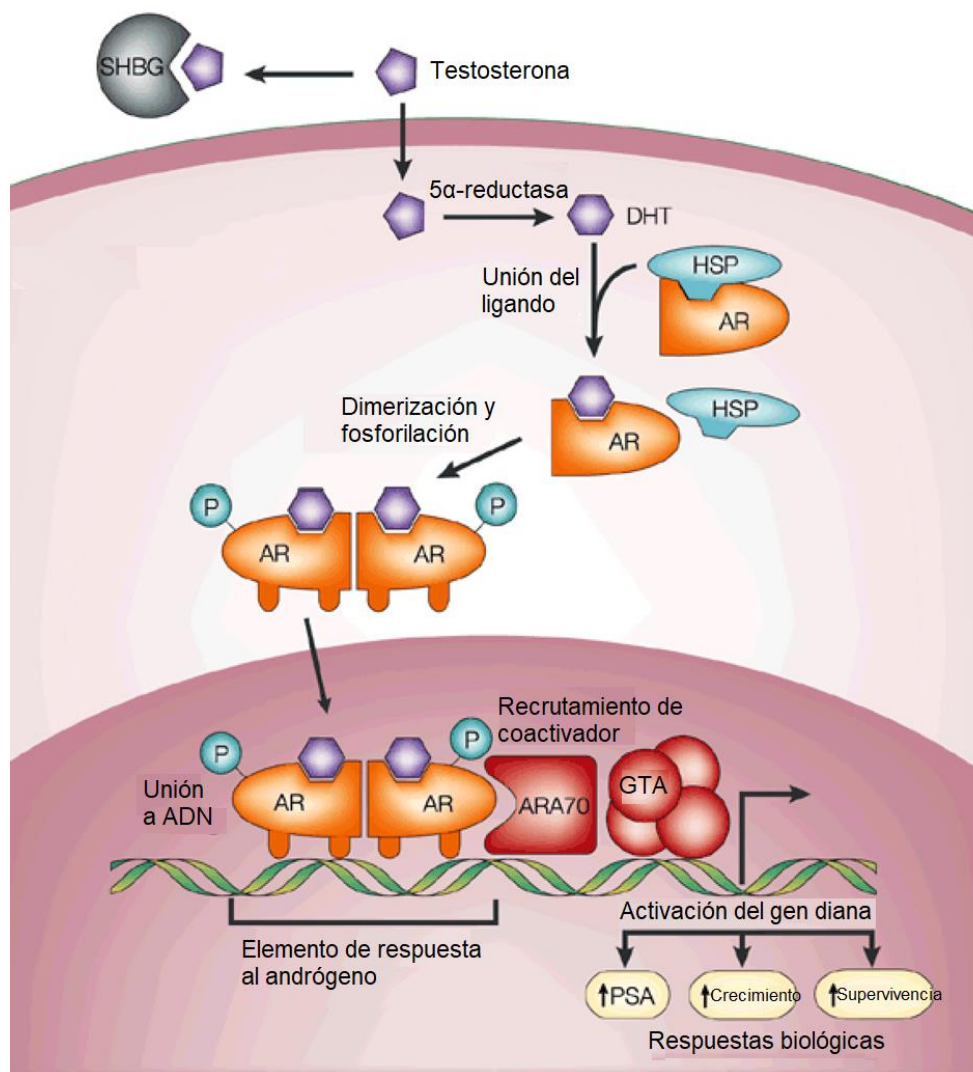


Figura 3. Mecanismo de acción del receptor de andrógeno en célula prostática (Harris et al., 2009). SHBG = Globulina unida a hormona sexual; AR = Receptor de andrógenos; HSP = Proteína de choque térmico; ARA70 = Receptor de andrógenos asociado a proteína 70; GTA = Factores transcripcionales basales; PSA = antígeno prostático específico.

1.2 Cáncer de próstata

1.2.1 Etiología y fisiopatología

El cáncer de próstata (CP) es definido como el crecimiento descontrolado de células mutadas de la próstata (Wang et al., 2018). Es originado en las células luminales de la próstata. En esta enfermedad, el receptor de andrógenos es estudiado, debido a que se ha encontrado hiperactividad del mismo tanto en CP primario como metastásico (Culig y Santer, 2014; Goldstein et al., 2010; Grozescu y Popa, 2017; Wang et al., 2014). Dentro de sus factores de riesgo se encuentran la edad, la raza, geografía, los antecedentes familiares y los cambios genéticos (American Cancer Society, 2017; Poveda-Matiz et al., 2014).

En lo relacionado con la raza, se ha evidenciado que es de mayor prevalencia en hombres de raza negra y en aquellos con ascendencia africana, presentando mayor índice de mortalidad respecto a otros grupos étnicos. En relación a la geografía, la epidemiología del CP muestra que tiene mayor prevalencia en Norteamérica, noroeste de Europa, Australia e Islas del Caribe, muy probablemente asociado a que son regiones donde hay mayor acceso a los servicios de salud para realizar su detección temprana, mientras que la prevalencia es menor en regiones de África, Asia, Centroamérica y Sudamérica, en donde existen deficiencias en su detección (American Cancer Society, 2017; Rebbeck, 2017).

Con relación a su fisiopatología, el CP es un cáncer dependiente de andrógenos (Davidson y Morgentaler, 2016). Por un lado, los estudios han demostrado que altos niveles plasmáticos de T y DHT generan el desarrollo de CP por activación del RA, induciendo la proliferación celular descontrolada en el tejido prostático (Klap et al., 2015). A su vez, se sugiere que los niveles de andrógenos dentro del tejido prostático son independientes de la concentración en el plasma (Culig y Santer, 2014; Davidson y Morgentaler, 2016; Klap et al., 2015), por lo tanto, no se cuenta con información concluyente de que los niveles plasmáticos de andrógenos sean responsables del desarrollo de CP. Sin embargo, es importante mantener bajos los niveles dentro del tejido prostático, puesto que son estos los responsables del crecimiento exacerbado del órgano.

El CP inicia su progresión a través de la formación de neoplasia intraepitelial prostática, secundaria a la acción de testosterona y DHT sobre el RA, la cual, puede avanzar hasta alto grado (Crawford et al., 2015). Posteriormente se genera adenocarcinoma, que se caracteriza por una incursión del epitelio al estroma que puede producir metástasis. Por ello, regular la acción los andrógenos a nivel prostático es de gran importancia, ya que están relacionados con su crecimiento siendo el objetivo en el tratamiento del CP (Crawford et al., 2015; Gamat y McNeel, 2017; Wang et al., 2018).

El RA en el CP presenta hipersensibilidad, lo que se traduce en que es activado aun en bajas concentraciones de T y DHT. De este modo, la expresión génica del RA en las células del CP genera un incremento de la expresión de este receptor (Culig y Santer, 2014; Gao et al., 2005). Actualmente se están realizando estudios acerca de la estimulación de la expresión génica del RA por coactivadores sin que se presente proliferación, mecanismo posiblemente alterado en el CP, generando desregulación de procesos de apoptosis y favoreciendo la aparición de células tumorales (Culig y Santer, 2014). Asimismo, se han encontrado algunas mutaciones del RA en CP, como por ejemplo la mutación Thr877Ala (la treonina en la posición 877 cambia por una alanina) que incrementan la afinidad del RA a esteroides estrogénicos y progestágenos estimulando la proliferación celular. Han sido encontradas mutaciones en el RA en aproximadamente un tercio de los pacientes tratados con flutamida, al igual que en algunos pacientes con bicalutamida (Culig y Santer, 2014), evidenciando una problemática a nivel del RA con las terapias actuales, las cuales son ineficaces.

Los cambios morfológicos en los adenocarcinomas de cáncer de próstata son evidenciables a través de histopatología (**Figura 4**), permitiendo así clasificar los tumores como benignos y malignos, siendo los primeros definidos como hiperplasias con comportamiento similar a adenomas, es decir, con diferenciación celular, mientras que los malignos surgen a partir del epitelio y pierden su diferenciación celular, lo cual es conocido como anaplasia (Organización Mundial de la Salud, 1980). De este modo se realiza una clasificación del estado del tumor considerando sus acinos (estructuras que realizan la secreción de fosfatasa ácida prostática), estroma y diferenciación glandular. Estas características son evaluadas a través de la escala de Gleason que clasifica la agresividad del tumor y establece un pronóstico para el paciente (Gleason, 1992; Organización Mundial de la Salud, 1980; Wang et al., 2018).

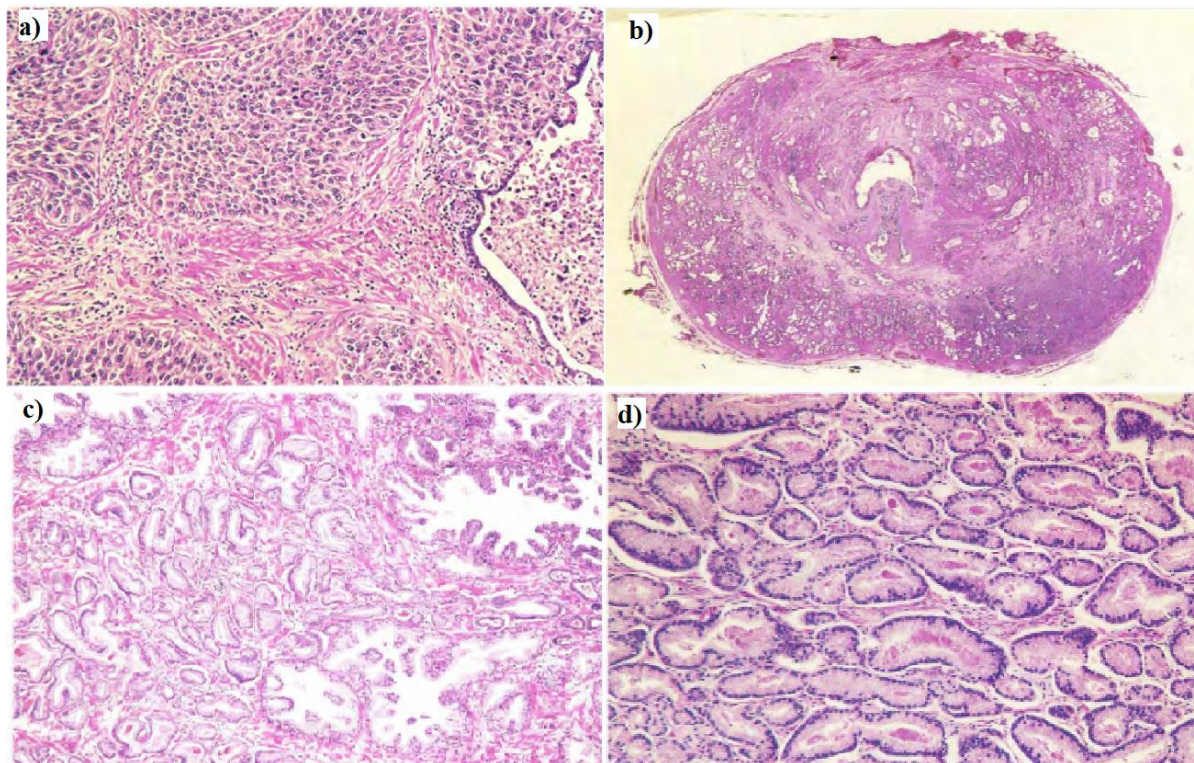


Figura 4. Histología de adenocarcinoma de próstata (Organización Mundial de la Salud, 1980). a) Tumor prostático primario; b) adenocarcinoma con ligera hiperplasia; c) adenocarcinoma de patrón de acinos pequeños con ligera anaplasia; d) adenocarcinoma de patrón de acinos grandes con ligera anaplasia.

A través de histología se puede diferenciar hiperplasia prostática benigna (HPB), neoplasia prostática intraepitelial (PIN) y cáncer de próstata (CP) (**Figura 5**). En la **Figura 5** se pueden observar 6 posibles escenarios: en a) se observa BPH, PIN, CP; en b) PIN, BPH; en c) CP; en d) PIN y CP; en e) se indica con la flecha donde hay PIN; en f) CP y PIN.

De este modo, se evidencia que un mismo tejido prostático puede tener alterados los procesos de proliferación y diferenciación, dando lugar a la coexistencia de desórdenes dependientes de andrógenos, generando mayor dificultad para establecer un tratamiento (Grozescu y Popa, 2017).

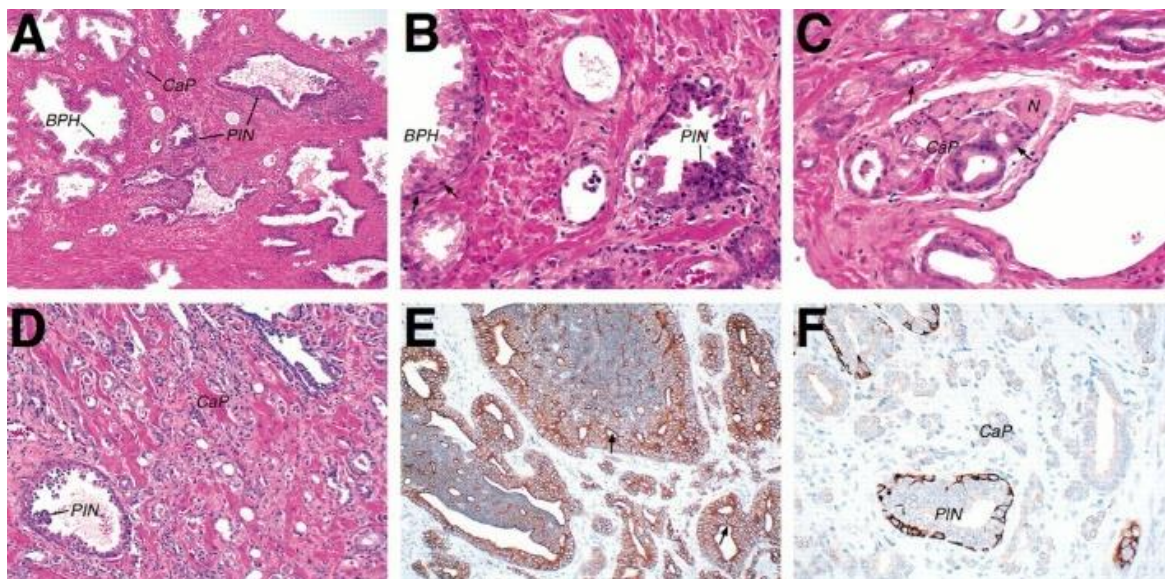


Figura 5. Histología de adenocarcinoma, hiperplasia y neoplasia prostática intraepitelial (Grozescu y Popa, 2017). N = tejido normal; PBH = Hiperplasia prostática benigna; PIN = neoplasia prostática intraepitelial; CaP = Cáncer de próstata. Imágenes a), b), c) y d) tienen tinción de hematoxilina-eosina, mientras e) y f) muestran análisis inmunohistoquímicos.

1.2.2 Epidemiología

El CP es el más común a nivel mundial y es la segunda causa de muerte debida a cáncer entre los hombres, en donde el 6 % de los nuevos casos detectados son metastásicos y aproximadamente el 40 % de los pacientes diagnosticados con la enfermedad localizada eventualmente desarrollarán metástasis (Globocan, 2021b; Kelly et al., 2018). Se estima que para el año 2030 se presentarán 1.7 millones de nuevos casos de CP a nivel mundial, con una mortalidad cercana a los 499 mil individuos (Poveda-Matiz et al., 2014).

En Colombia el CP también fue el de mayor incidencia en el 2020 en hombres de todas las edades seguido por el de estómago, colorrectal, pulmón y linfoma no Hodgkin (**Figura 6**), mientras que en mujeres de todas las edades el de mayor incidencia para el mismo año fue el de seno, seguido por el colorrectal, cuello uterino y tiroides (**Figura 6**) (Globocan, 2021a). En relación con la prevalencia, el CP también ocupa el primer lugar en los hombres seguido por estómago (Bravo et al., 2018). Según los datos de Globocan del 2020, en los últimos cinco años Colombia presenta para CP una prevalencia de 49000 casos, en el año 2020 una incidencia de 14460 casos nuevos, y una mortalidad de 3846 casos para el mismo año (Globocan, 2021a).

Incidencia de cáncer en hombres y mujeres en Colombia en el año 2020

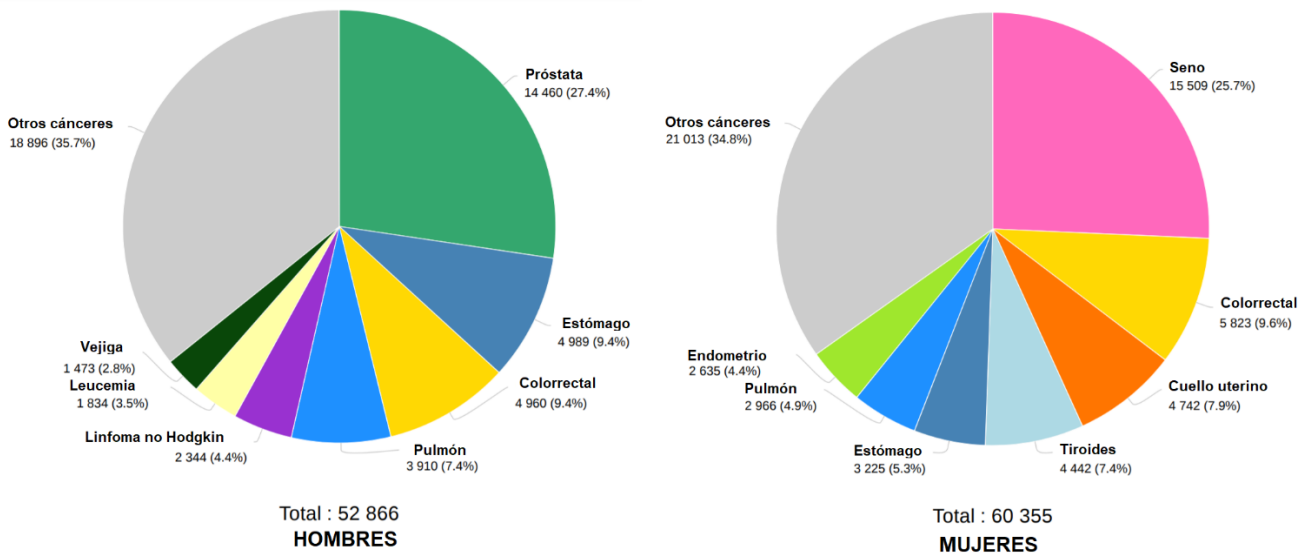


Figura 6. Incidencia de cáncer en hombres y mujeres en Colombia en el año 2020 (Globocan, 2021a).

Se proyecta que la población colombiana pasó de 40.3 millones en el 2000 a 50.9 millones en el 2020. La distribución etaria en Colombia es en gran proporción joven, entre los años 2002 y 2014 al menos el 80 % era menor de 55 años. Así mismo, para el año 2050 se estima que la población mayor de 65 años pasará del 8 al 17.5 %, lo que se traduce en una mayor cantidad de habitantes con dicho factor de riesgo en el país (Bravo et al., 2018; Instituto Nacional de Cancerología, 2017; Poveda-Matiz et al., 2014), implicando que la incidencia de la patología puede aumentar en Colombia en los próximos años.

1.2.3 Diagnóstico

Dado que no todos los pacientes presentan sintomatología asociada a CP, por ejemplo, micción frecuente, hematuria o flujo miccional interrumpido, entre otros, adicional a que un inicio de tratamiento temprano mejora el pronóstico, es importante realizar su detección temprana (Cuzick et al., 2014). Para ello, se realiza la medición del antígeno prostático específico (PSA por sus siglas en inglés), la palpación digital rectal de la próstata y el ultrasonido transrectal (Cuzick et al., 2014). En aquellos pacientes que presentan síntomas

clínicos como disuria, nicturia, reducción del calibre del chorro, hematuria, entre otros, es importante descartar otros problemas de salud relacionados, como hiperplasia prostática benigna (HPB). Finalmente, a través de biopsia prostática se confirma el diagnóstico (Cuzick et al., 2014).

El PSA es un marcador biológico usado en el ámbito médico, donde se esperan valores inferiores a 4.0 ng/mL en hombres mayores de 50 años, mientras que en hombres entre 20 y 50 años los valores normales oscilan entre 2.0 y 3.5 ng/mL (Dunn, 2017). Sin embargo, se ha demostrado que algunos pacientes con CP muestran valores normales del antígeno mientras que otros pueden tener valores fuera del rango sin padecerlo. Por ello, el PSA es usado solamente como biomarcador de alerta, de modo que si se llegan a encontrar valores anormales se hace necesaria la realización de una biopsia para descartar CP (Cuzick et al., 2014; Dunn, 2017). Actualmente se están buscando otros biomarcadores sanguíneos que permitan mejorar su detección (Cuzick et al., 2014).

El ultrasonido transrectal y el tacto digital rectal son técnicas diagnósticas ampliamente usadas a nivel mundial para la detección de CP con baja aceptación por parte del paciente contribuyendo así a la baja detección de dicho cáncer (Grozescu y Popa, 2017). El tacto digital rectal es una técnica que requiere entrenamiento, por lo que, si bien puede ser empleada frecuentemente, no implica un diagnóstico adecuado, siendo no recomendado como única estrategia diagnóstica, sino combinada con el PSA (Naji et al., 2018).

Colombia carece de diagnóstico temprano del CP, debido a que, si bien el modelo de atención en salud considera a la medicina preventiva como un aspecto importante, la detección no es considerada como clave, al menos no en el CP. Por ello, las políticas nacionales actuales del Ministerio de Salud y Protección Social buscan impactar en la detección temprana de esta patología, permitiendo así, mejorar el pronóstico de los pacientes (Instituto Nacional de Cancerología, 2017; Instituto Nacional de Cancerología y Sociedad Colombiana de Urología, 2013; Ministerio de Salud y Protección Social, 2012).

1.2.4 Tratamiento

El tratamiento principal para el CP tanto en etapa inicial como metastásica consiste en la denominada terapia de privación de andrógenos (ADT, del inglés “*Androgen deprivation therapy*”) (Helsen et al., 2014; Recouvreux et al., 2017; Stein et al., 2014) que incluye a la radiación, la orquiectomía y el tratamiento farmacológico (**Tabla 1**) (Gamat y McNeel, 2017; Rove y Crawford, 2014; Stein et al., 2014). Lo anterior ocasiona la disminución del tamaño del adenocarcinoma prostático que es dependiente de andrógenos (Gamat y McNeel, 2017; Rove y Crawford, 2014).

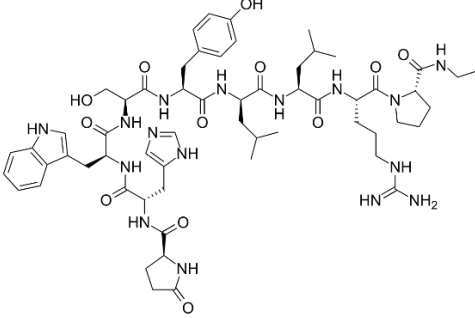
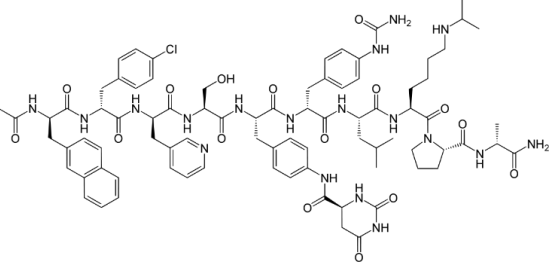
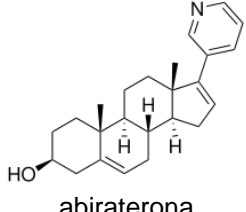
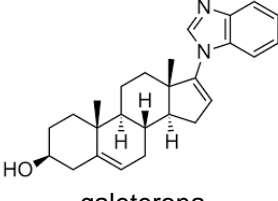
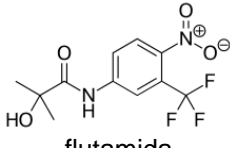
La castración genera una respuesta adecuada al inicio del tratamiento del CP, sin embargo, puede generar resistencia a lo largo del tiempo, constituyéndose en el denominado cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC), insensible a los andrógenos o independiente de andrógenos que se produce debido a que la ADT puede inducir a que los tumores muten el RA, autorregulando de este modo su activación independientemente de la presencia de T y DHT (Gamat y McNeel, 2017; Stein et al., 2014).

En el año 2013 el Instituto Nacional de Cancerología y la Sociedad Colombiana de Urología desarrollaron la guía de práctica clínica para el manejo de CP (Instituto Nacional de Cancerología y Sociedad Colombiana de Urología, 2013), la cual proporciona recomendaciones a los profesionales de salud para el manejo de dicha patología. Dicha guía involucra la clasificación del estado del cáncer, de modo que, si el paciente presenta menos de 10 años de expectativa de vida y es asintomático, se realiza vigilancia pasiva y se toman decisiones conforme progresa la enfermedad, mientras que, si el paciente tiene 10 o más años de expectativa de vida, según clasificación de Gleason y los niveles de antígeno prostático que presente, se consideran opciones de tratamiento como la radioterapia, la prostatectomía total o parcial, la terapia hormonal o la quimioterapia (Instituto Nacional de Cancerología y Sociedad Colombiana de Urología, 2013).

Los fármacos agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas fueron diseñados como análogos de dicha hormona, con modificaciones en los residuos de aminoácidos en posiciones 6 y 10 de su estructura, dando como resultado una afinidad mayor y estabilidad metabólica como en el caso de la goserelina y leuprorelida. Sin embargo, estos presentan como inconveniente, tiempos de vida media cortos (5 horas para goserelina) dada su naturaleza peptídica lábil. Actualmente se cuenta con poca evidencia clínica que compare

entre los miembros del mismo grupo terapéutico la eficacia, seguridad, tolerabilidad, y efecto en calidad de vida de los pacientes, por lo que no se han establecido claramente ventajas y desventajas entre ellos, dificultando así su prescripción (Bolton y Lynch, 2018).

Tabla 1. Fármacos usados en terapia de privación de andrógenos (Gamat y McNeel, 2017).

Grupo farmacológico	Mecanismo de acción / Efecto fisiológico	Ejemplo
<p>Agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH).</p>	<p>Se unen al receptor de LHRH en la glándula pituitaria y lo desensibiliza por constante estimulación, disminuyendo la liberación de hormona luteinizante y reduciendo la producción de testosterona.</p>	 <p>leuprolida</p>
<p>Antagonistas de LHRH.</p>	<p>Antagonizan (bloquea) al receptor LHRH en la glándula pituitaria, disminuyendo la liberación de la hormona luteinizante y reduciendo la producción de testosterona.</p>	 <p>degarelix</p>
<p>Inhibidores del citocromo P450 17 hidroxilasa-20-liasa (Cyp17A1).</p>	<p>Inhiben al CYP17A1 que es una enzima clave en la biosíntesis de testosterona, impidiendo la formación de 17α-hidroxipregnenolona, precursor de testosterona.</p>	 <p>abiraterona</p>
<p>Inductores de degradación del receptor de andrógenos (RA).</p>	<p>Induce la degradación del receptor de andrógenos al actuar como antagonista puro.</p>	 <p>galeterona</p>
<p>Antagonistas del RA.</p>	<p>Antagoniza al RA uniéndose al sitio de unión a T y DHT en el receptor.</p>	 <p>flutamida</p>

Los antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH) surgieron en el año 1999 como una alternativa para el manejo del CP avanzado y metastásico. Actúan uniéndose de manera reversible al receptor de LHRH en la glándula pituitaria evitando que los ligandos endógenos (gonadotropinas) se unan a él para activarlo y ejercer su efecto. Actualmente se han solucionado problemas con los antagonistas de primera generación, los cuales generaban respuestas alérgicas por inducción de liberación de histamina. Los antagonistas más novedosos presentan ventajas respecto a los agonistas de esta hormona debido a su rápido efecto (inferior a 72 h) en la supresión de la producción de andrógenos en la próstata (Saliccia et al., 2016).

Los inhibidores del citocromo P450 17 hidroxilasa-20-liasa (Cyp17A1) inhiben a dicha enzima, responsable de la biosíntesis de testosterona a partir de 17 α -hidroxipregnenolona (**Figura 2**) (Detti et al., 2017). Desde el año 1980, el único fármaco que se consideraba con dicha actividad era el antifúngico ketoconazol, sin embargo, debido a su alta toxicidad fue poco usado para tal fin (Gupta et al., 2014). En el año 2011 se aprobó a la abiraterona, un inhibidor irreversible de la enzima, siendo efectiva en pacientes con cáncer de próstata resistente a castración y con mejor perfil de seguridad respecto a ketoconazol (Detti et al., 2017; McKay et al., 2017).

Dentro de los fármacos degradadores del RA se encuentra la galeterona, molécula que presenta varios mecanismos de acción, pues por un lado, inhibe a la Cyp17A1, por otro, antagoniza al RA y además produce su degradación (McKay et al., 2017). A pesar de no estar bien establecido su mecanismo de acción, prevalece la teoría de que genera cambios estructurales que conducen a la degradación del receptor (McKay et al., 2017; Yu et al., 2014).

Los fármacos antagonistas del dominio N-terminal, actúan sobre la función de activación AF1, la cual se encuentra en este dominio y es clave en la actividad transcripcional. Esta función de activación es de particular interés puesto que es independiente de la presencia de ligando (Yang et al., 2016). Se ha desarrollado una serie moléculas con dicha actividad, que se encuentran en fase de investigación bajo los códigos de fabricante EPI-001 y EPI-002, siendo este último, un estereoisómero del primero. Sin embargo, esta serie de moléculas ha presentado bajos perfiles de seguridad ya que inducen mutaciones en el RA, impidiendo que continúen a otras fases de investigación. Actualmente se encuentra EPI-506 en estudios fase 1 y 2 en Estados Unidos y Canadá (Yang et al., 2016).

Debido al interés en el presente trabajo en los antagonistas del RA (antiandrógenos), se profundiza en estos compuestos. Los antiandrógenos fueron desarrollados inicialmente como análogos estructurales esteroideos. A partir de esta estrategia surgieron fármacos como la ciproterona y la medroxiprogesterona, que han sido poco usados a nivel clínico debido a su perfil de seguridad, pues interfieren con la libido y ocasionan problemas cardiovasculares, sumado a que tienen baja eficacia (Helsen et al., 2014). Dado que no son antiandrógenos puros, sino que además son agonistas parciales de glucocorticoides, generan efectos adicionales de inmunosupresión e incremento de ácidos grasos en plasma (Helsen et al., 2014; Lempiäinen et al., 2017; McEwan y Brinkmann, 2000).

Los primeros antiandrógenos no esteroideos surgieron en el año 1989 como opción terapéutica para el manejo de CP avanzado y metastásico. Este grupo de fármacos se usan en combinación con agonistas y antagonistas de LHRH para mejorar la efectividad de la terapia. Los antiandrógenos no esteroideos han sido desarrollados en varias generaciones: los de primera, derivados de la flutamida, dando lugar a bicalutamida y nilutamida; y los de segunda generación como la enzalutamida (**Figura 7**). La diferencia en los mecanismos de acción de los fármacos pertenecientes a estas generaciones, radica en que los fármacos de primera generación como bicalutamida tras unirse al RA forman un complejo no funcional, evitando así la activación génica; mientras que los fármacos de segunda generación, además de unirse también impiden la translocación nuclear (Schalken y Fitzpatrick, 2016; Helsen et al., 2014; Tan et al., 2015).

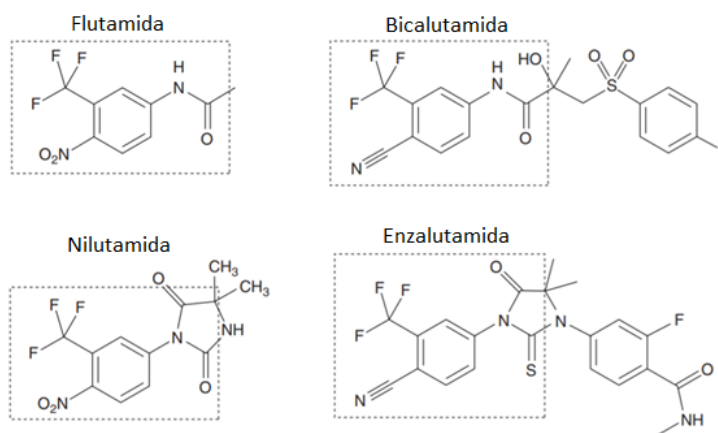


Figura 7. Antiandrógenos no esteroideos (Helsen et al., 2014).

Actualmente se están desarrollando terapias selectivas que favorezcan tanto la efectividad como la seguridad, por lo que han surgido nuevas moléculas denominadas moduladores selectivos del receptor de andrógeno, conocido por sus siglas en inglés SARMs (Selective Androgen Receptor Modulators) (Bhasin y Jasuja, 2009; Narayanan et al., 2018). Dichos compuestos pueden ejercer tanto agonismo como antagonismo del RA dependiendo del tejido donde se encuentre; por ejemplo, la molécula LGD2226, es un agonista del RA en hueso y músculo, mientras que es un antagonista a nivel prostático, debido a que antagoniza el efecto de la DHT, molécula amplificadora del efecto androgénico principalmente en próstata, mientras que a nivel óseo y muscular la acción no está dada principalmente por DHT sino por T (Narayanan et al., 2018).

El CP puede ser manejado mediante monoterapia, sin embargo, la evidencia científica ha mostrado que terapias combinadas pueden mejorar la eficacia del tratamiento (Gillesen et al., 2015). Por ello, fármacos con diferentes mecanismos de acción (**Figura 8**) pueden ser usados concomitantemente, así como también ser combinados con radioterapia, orquiectomía, entre otros. Por ejemplo, en pacientes con CP se recomienda la orquiectomía y el uso de antagonistas del RA, o también se sugiere la combinación de agonistas de LHRH y antagonistas del RA, mientras que en el CP metastásico se prefiere orquiectomía con uso de agonistas o antagonistas de LHRH (Gillesen et al., 2015).

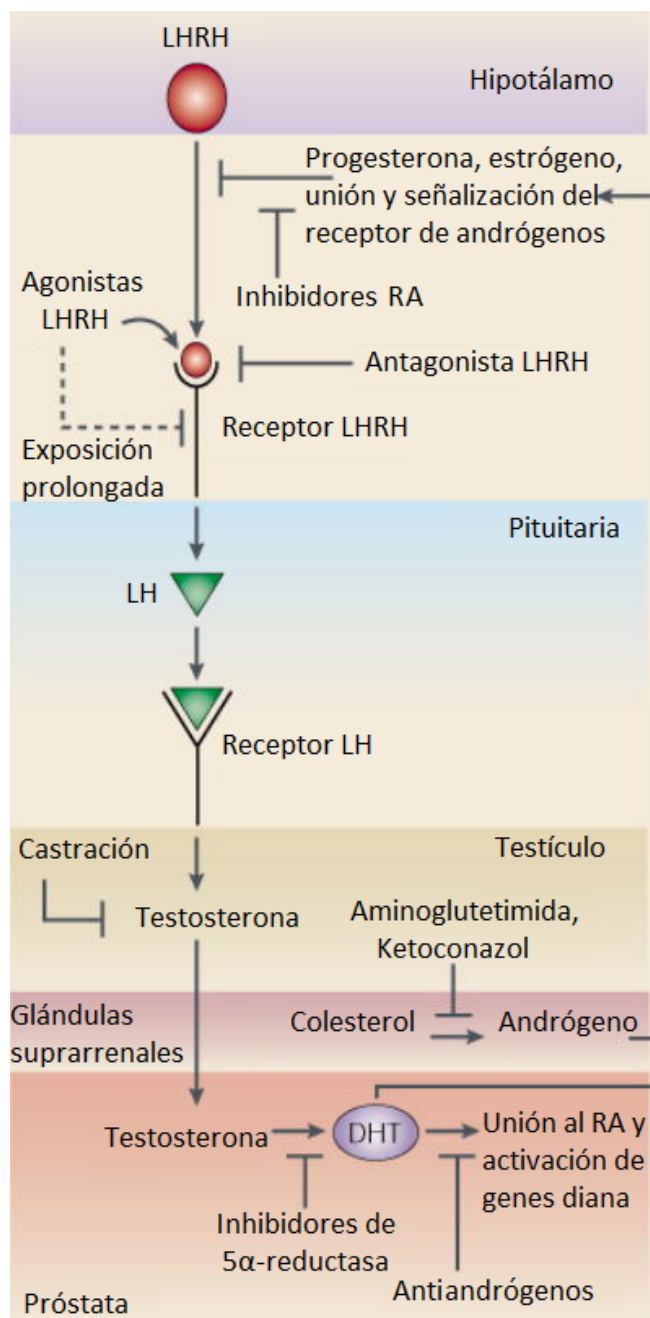


Figura 8. Mecanismos de acción de fármacos usados para tratamiento de CP (Denmeade e Isaacs, 2002). LHRH = Hormona liberadora de hormona gonadotropina; LH = Hormona leutinizante; DHT = Dihidrotestosterona; RA = Receptor de andrógenos.

1.3 Hiperplasia prostática benigna

1.3.1 Etiología y fisiopatología

El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos define la hiperplasia prostática benigna (HPB) como “una afección benigna (no cancerosa) en la que el crecimiento excesivo del tejido de la próstata presiona la uretra y la vejiga, y bloquea así el flujo de la orina” (**Figura 9**) (Instituto Nacional del Cáncer, 2011a). Tiene como características crecimiento excesivo, adenomatoso y no maligno de la glándula prostática periuretral (Santana y Wong, 2004).

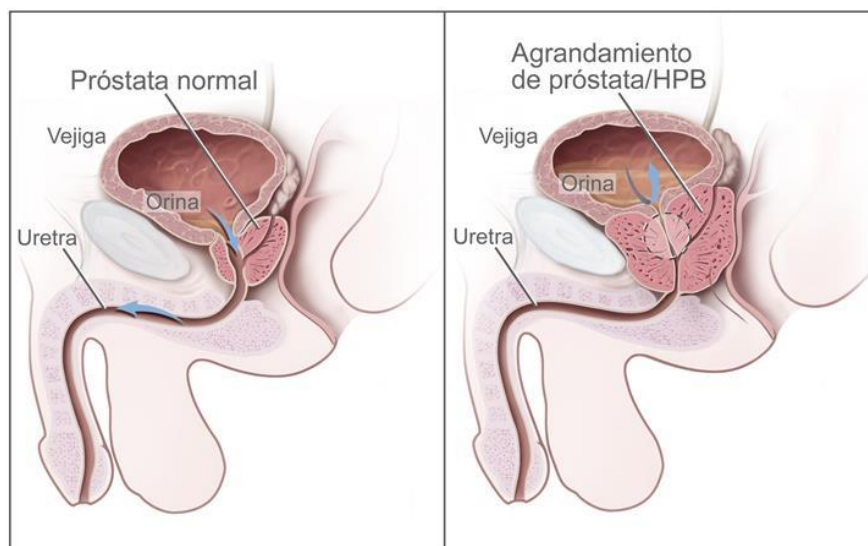


Figura 9. Próstata normal e hiperplasia prostática benigna (Instituto Nacional del Cáncer, 2011a).

Si bien el crecimiento de la próstata es un proceso fisiológico normal en la edad adulta, algunos autores sugieren que la HPB es causada por la reactivación del crecimiento embriogénico en el estroma adulto (Ricke et al., 2011), influenciado principalmente por el RA y su activación por el metabolito DHT, que promueve la expansión tisular (Bechis et al., 2014).

Existen otros factores que estimulan dicha proliferación, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento de keratinocitos, entre otros, los cuales se ven aumentados por la DHT (McLaren et al., 2011). Además, se ha propuesto que el envejecimiento conlleva a cambios en los niveles de andrógenos y

estrógenos, al igual que un incremento de estrés oxidativo y la pérdida de la capacidad de regulación del ciclo celular (Bechis et al., 2014).

Se ha planteado que la HPB y el CP comparten la inflamación crónica como mecanismo patológico en común, debido a que la inflamación desencadena la hiperplasia produciendo un estado crónico de regeneración tisular, el cual ha sido evidenciado en modelos animales (McLaren et al., 2011). Aunque se desconoce su mecanismo exacto, se ha evidenciado que la interleukina-1 estimula el crecimiento de la próstata durante su desarrollo, y este proceso se repite en la próstata del adulto, promoviendo la proliferación celular como respuesta a la inflamación (McLaren et al., 2011).

La proliferación celular prostática es principalmente llevada a cabo por la DHT, generada a su vez como producto de la reducción de T por la enzima 5 α R (EC 1.3.99.5) (Bechis et al., 2014). Esta enzima presenta 3 isoformas conocidas hasta el momento (**Tabla 2**), siendo de interés las isoformas 1 y 2 para la HPB las cuales presentan diferencias en la distribución en tejidos, afinidad por sus inhibidores y diferentes pH óptimos para ejercer su actividad catalítica (Wang et al., 2014).

Tabla 2. Propiedades de las isoenzimas 5 α -reductasa.(Azzouni et al., 2012; Wang et al., 2014).

Propiedad	5α-Reductasa 1	5α-Reductasa 2	5α-Reductasa 3
Tamaño (aminoácidos)	259	254	318
Distribución en tejidos	Hígado, piel no genital, cuero cabelludo, glándulas sebáceas, cerebro, ovario, próstata, testículos	Próstata, epidídimo, vesículas seminales, útero, piel genital, senos, folículo capilar, placenta, testículos	Cerebro, hígado, próstata, epidídimo
Nombre del gen	SRD5A1	SRD5A2	SRD5A3
Localización del cromosoma	5p15	2p23	4q12
pH óptimo	6.0 – 8.5	5.0 – 5.5	6.0 – 7.0
Inhibidor	Dutasterida	Dutasterida, finasterida	Sin información

1.3.2 Diagnóstico

El diagnóstico de la HPB se realiza basado en la sintomatología del paciente, que puede ser clasificada en dos grandes grupos: síntomas obstructivos, entre los que se encuentra disminución del calibre y de la fuerza del chorro miccional, intermitencia del chorro, disuria, micción incompleta, goteo terminal y retención de orina; así como también, síntomas irritativos, como la poliaquiuria, nicturia, sensación de vaciado incompleto e incontinencia (Edwards, 2008; Lozano, 2003). A pesar de estos síntomas, el estado clínico del paciente no siempre está relacionado con el tamaño real de la próstata, pudiéndose encontrar tanto individuos con síntomas graves de obstrucción y con próstatas pequeñas, como otros sin sintomatología y con próstatas grandes (Lozano, 2003).

Durante la consulta médica se deben descartar otras patologías con sintomatología clínica similar a la HPB, como por ejemplo hiperreflexia del músculo detrusor, infección urinaria, litiasis vesical y cáncer de próstata (Lozano, 2003). Por ello, se realiza palpación abdominal para detectar volúmenes residuales de orina, palpación digital rectal para evaluar la morfología de la próstata y ecografía abdominal para estimar su volumen y morfología (Edwards, 2008; Sociedad Colombiana de Urología, 2014).

1.3.3 Tratamiento

El tratamiento enfocado a mejorar la calidad de vida del paciente, puede ser tanto quirúrgico como farmacológico (Sociedad Colombiana de Urología, 2014). El manejo quirúrgico de la HPB está indicado en pacientes con un número elevado de molestias, y comprende la resección transuretral de la próstata (RTUP), en la cual se remueve tejido de la zona transicional con el fin de disminuir la obstrucción de la uretra y mejorar los síntomas urinarios. Se recomienda para próstatas con tamaño entre 30 y 80 mL. La remoción tisular se realiza usando resectoscopios especiales y asas cortantes (**Figura 10**) (Sociedad Colombiana de Urología, 2014).

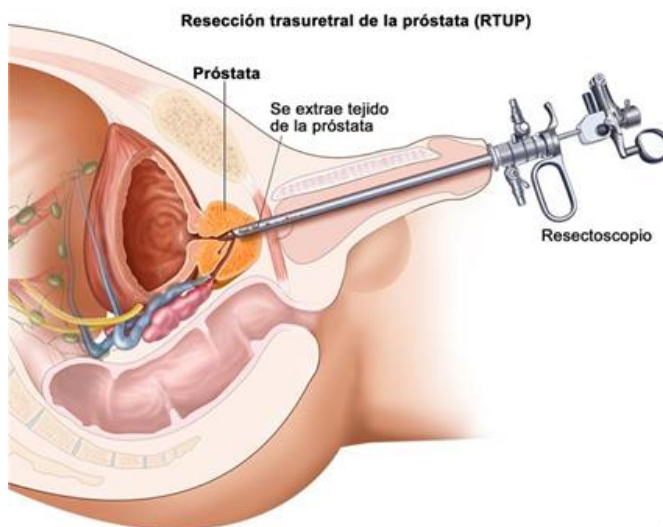


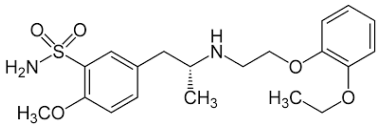
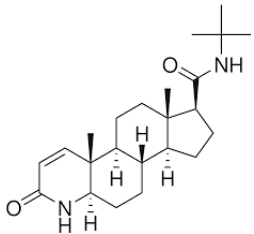
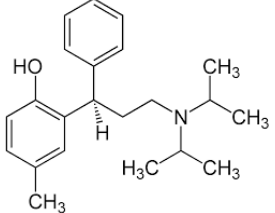
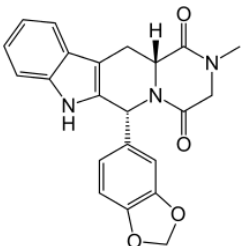
Figura 10. Resección transuretral de la próstata (Instituto Nacional del Cáncer, 2011b).

La RTUP presenta mejoría clínica entre 8 y 22 años. La mortalidad por este procedimiento es menor al 0.25 %, evidenciando que es un procedimiento seguro a nivel perioperatorio. Sin embargo, pueden presentarse complicaciones tales como incontinencia urinaria, retención urinaria e infecciones, estenosis del cuello vesical y estrechez a nivel de la uretra, así como también alteración de la función sexual (Inzunza et al., 2018; Sociedad Colombiana de Urología, 2014). Existen alternativas quirúrgicas como la prostatectomía abierta, la termoterapia transuretral con microondas, la ablación transuretral de próstata con aguja, tratamientos con láser, endoprótesis prostática (Stent), entre otros, que no son usados comúnmente debido a la baja seguridad en su procedimiento, presentando complicaciones como infecciones urinarias, alteraciones en la calidad del esperma, y hasta daño uretral (Jin et al., 2017; Sociedad Colombiana de Urología, 2014).

El manejo farmacológico de HPB recomendado por la Sociedad Colombiana de Urología se basa en los agentes antagonistas de los receptores α_1 adrenérgicos, los agentes inhibidores de la enzima 5 α R y en los agentes inhibidores de 5-fosfodiesterasa (**Tabla 3**). Sin embargo, a pesar de que dichos tratamientos presenten efectos fisiológicos deseados, aliviando la sintomatología y disminución del progreso de la enfermedad, también presentan desventajas y efectos adversos (**Tabla 3**), dificultando el establecimiento de una terapia crónica definitiva (Sociedad Colombiana de Urología, 2014).

Aunque se han identificado numerosas dianas terapéuticas que permiten tratar a esta enfermedad, el hecho de que este padecimiento dependa del andrógeno DHT ha permitido considerar a los inhibidores de la enzima 5 α R como los agentes de predilección en pacientes con HPB y síndrome obstructivo urinario bajo, además de su propiedad de disminuir hemorragia tras RTUP. Por ello, tanto la finasterida como la dutasterida (**Tabla 3**) son fármacos de elección para el alivio de esta patología (Bechis et al., 2014; Instituto Nacional de Cancerología y Sociedad Colombiana de Urología, 2013; Qian et al., 2015).

Tabla 3. Grupos farmacológicos para manejo de HPB (Sociedad Colombiana de Urología, 2014).

Mecanismo de acción	Ejemplo	Efecto fisiológico benéfico	Ventaja	Desventajas	Efectos adversos más frecuentes
Antagonistas α 1-adrenérgicos	 <p>alfuzosina</p>	Disminución del tono prostático regulado por adreno receptores 1α , aliviando síntomas obstructivos de la uretra.	Reducen riesgo de retención urinaria a corto plazo	Tienen poco efecto sobre la salida de la vejiga	Astenia, mareo, hipotensión
Inhibidores de la enzima 5α -reductasa	 <p>finasterida</p>	Inducción de apoptosis de células prostáticas, disminuyendo su tamaño. Disminuye antígeno prostático	Reducen riesgo de retención urinaria aguda a largo plazo. Disminuyen hemorragia secundaria a cirugía transuretral de la próstata	Efectos clínicos evidentes entre 6 y 12 meses. Efectos secundarios relacionados con la función sexual	Disfunción sexual, disminución de la libido, falta de eyaculación y disminución del volumen seminal
Antagonistas del receptor muscarínico	 <p>tolterodina</p>	Mejora sintomatología de vejiga hiperreactiva	Mejora sintomatología de vejiga hiperreactiva	No hay evidencia de efectividad a largo plazo. No deben ser usados en pacientes con obstrucción del tracto urinario	Sequedad de la boca, estreñimiento, infección de vías respiratorias altas, mareo
Inhibidores de 5-fosfodiesterasa	 <p>tadalafilo</p>	Disminución del tono muscular en uretra, vasodilatador pélvico, aliviando síntomas obstructivos	Reduce síntomas de moderados a severos, independientemente de disfunción sexual	No existe evidencia concluyente a largo plazo de efecto sobre la progresión de la HPB	Cefalea, dolor de espalda

1.4 Hongos liquenizados

Los hongos liquenizados también llamados líquenes, son organismos que resultan de la asociación simbiótica entre un fotobionte, el cual puede ser un alga verde o cianobacteria; un micobionte, el cual es un hongo generalmente ascomiceto y en poca proporción basidiomiceto; y una levadura (Pennisi, 2016; Spribille et al., 2016). Como resultado de esta interacción se genera un organismo llamado talo, que presenta características propias, es decir, es diferente de los constituyentes vistos individualmente (Nash, 2008). Dentro de esta asociación, cada uno de los componentes cumple una función, en la que el hongo funciona como soporte del alga o la cianobacteria, mientras que el fotobionte se encarga de proveer alimento al hongo. El micobionte, además es el encargado de controlar la división del fotobionte, debido a que es el encargado de liberar sustancias que regulan este proceso (Nash, 2008). Debido a estas interacciones, los líquenes generan mecanismos de defensa, entre ellos, la biosíntesis de metabolitos secundarios (Calcott et al., 2018), los cuales les permiten vivir en una amplia variedad de ecosistemas, incluyendo alta humedad, desecación, alta intensidad de radiación UV y altos niveles de contaminación ambiental donde otros organismos incluyendo los propios constituyentes del hongo liquenizado no lo lograrían (Raggio et al., 2011; Valencia-Islas et al., 2007).

Anatómicamente, el hongo liquenizado cuyo talo es heterómero, está compuesto por cuatro capas (**Figura 11**): la denominada córtex o corteza superior, conformada por el hongo; una capa donde se ubica el fotobionte; una médula compuesta por el hongo y el córtex inferior que contiene tejido de soporte encargado de adherirse a superficies (Nash, 2008; Rikkinen, 2007).

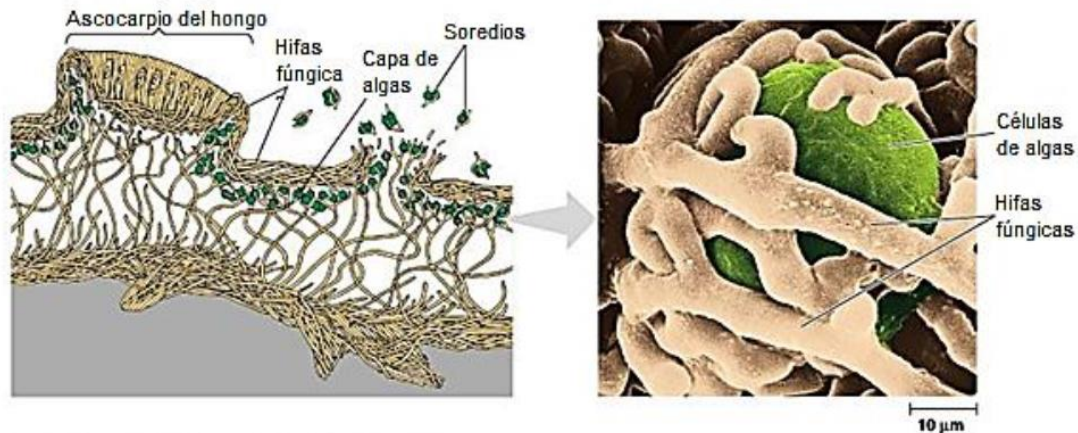


Figura 11. Esquema de la sección transversal de un hongo liquenizado (Cummings, 2002).

Si bien los líquenes no han sido bien estudiados en regiones tropicales, se conoce que poseen capacidad de colonizar hábitats en los que no se encuentra vegetación, generando consigo que se acumulen partículas minerales que se desprenden del suelo, las cuales se juntan con partes de líquenes muertos, permitiendo el crecimiento tanto de plantas vasculares pequeñas como plantas superiores (Asplund y Wardle, 2017). Asimismo, conservan la humedad ambiental debido a que tienen alta capacidad de retención de agua, permitiendo el crecimiento de plantas y hongos (Nash, 2008).

En Colombia, se estiman cerca de 3600 especies, de las cuales solo se han catalogado cerca de 1674 (Bernal et al., 2016; Lücking et al., 2019). Una gran cantidad de líquenes se encuentran ubicados en ecosistemas de páramo en Colombia, en los que más de 264 especies se han identificado. Estos ecosistemas son de gran interés de estudio dado que son ambientes únicos, puesto que presentan alta variación de temperaturas durante el día y alta radiación ultravioleta (Lücking et al., 2019).

1.4.1 Sustancias de origen liquénico

La interacción simbiótica en los líquenes permite la producción de metabolitos secundarios conocidos como metabolitos liquénicos o sustancias liquénicas, las cuales se depositan en el talo (Vaillant, 2014). Se ha encontrado que cada especie liquénica tiene determinada cantidad de metabolitos secundarios, pudiendo corresponder entre el 0.1 y el 10 % del peso seco, y su producción varía dependiendo de factores ambientales, tales como

radiación UV, altitud, variaciones de temperatura durante el día, entre otros (Calcott et al., 2018; Ranković et al., 2015). Se han identificado más de 800 metabolitos secundarios, de los cuales la mayoría son exclusivos de este tipo de organismos, mientras que la minoría son producidos por hongos o plantas superiores (Ranković et al., 2015).

Dentro de las vías que permiten la biosíntesis de las sustancias liquénicas, se destaca la del acetato-polimalonato (**Figura 12**), que permite la obtención de ácidos orgánicos como el ácido protoliquesterínico, derivados de ácidos benzoicos como el ácido atrárico, dépsidos como el ácido confluéntico, depsidonas como el ácido lobárico y dibenzofuranos como el ácido úsnico (Calcott et al., 2018).

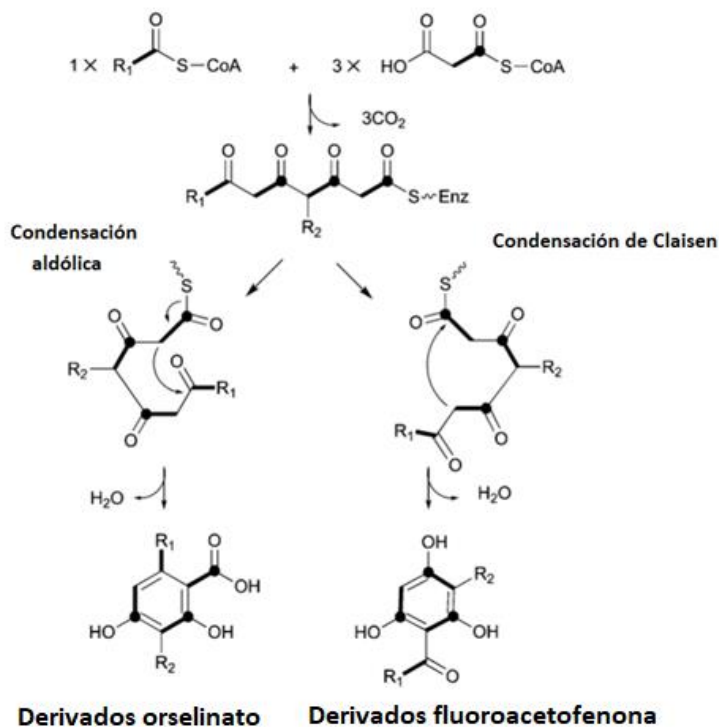


Figura 12. Biosíntesis de sustancias liquénicas mediante la ruta del acetato-polimalonato (Calcott et al., 2018).

Cabe mencionar, que a partir de los derivados orselinato se pueden producir los dépsidos, en donde están presentes 2 unidades de los diferentes ácidos orgánicos unidas por medio de un enlace tipo éster. Adicionalmente, las depsidonas son formadas a partir de los dépsidos tras reordenamiento molecular, dando como resultado una eterificación que une

a los 2 anillos aromáticos dando un ciclo de 7 miembros (Calcott et al., 2018). También se pueden producir compuestos dibenzofuranos, por ejemplo, el ácido porfirílico y el ácido úsnico partiendo de la fluoroacetofenona. Sin embargo, este tipo de compuestos son raramente encontrados (Calcott et al., 2018).

Otro tipo de compuestos que se pueden encontrar son los difeniléteres, como la buelolida; bifenilos como la contortina; xantonas como la tiomelina; antraquinonas como el ácido norosolínico; naftaquinonas como la haemaventosina y cromonas como la galapagina. De este modo, se mencionan algunos compuestos que son muestra de la gran diversidad estructural que se puede producir en este tipo de organismos simbióticos (Calcott et al., 2018).

Debido a la capacidad de la ruta acetato-polimalonato de generar tal diversidad estructural (**Figura 13**), se considera la vía más importante en la biosíntesis de metabolitos secundarios en los líquenes.

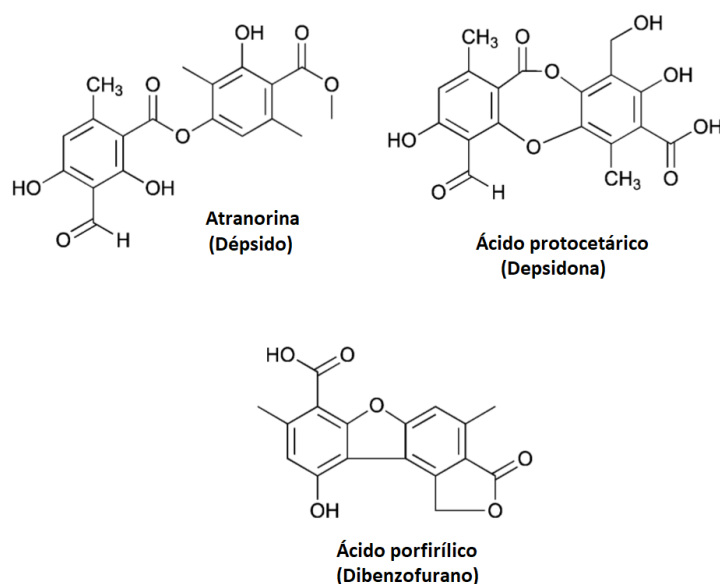


Figura 13. Clases estructurales de metabolitos secundarios biosintetizados por la ruta del acetato-polimalonato (Calcott et al., 2018).

1.4.2 Sustancias de origen líquénico como fuente potencial de fármacos para tratar problemas de la próstata

Los metabolitos secundarios de líquenes en estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado poseer propiedades antibacterianas, antioxidantes, citotóxicas, antiinflamatorias, antivirales, citoprotectoras, antienvjecimiento, fotoprotectoras, entre otras, convirtiéndolos en fuentes potenciales de moléculas activas para productos farmacéuticos (Goyal et al., 2016; Mohammadi et al., 2020; Ranković et al., 2015). Asimismo, en la medicina ayurvédica se ha empleado la preparación denominada Speman® (Marya et al., 1995) para el tratamiento de HPB y síntomas del tracto urinario bajo. Así como en la fitomedicina, el extracto de la corteza del ciruelo africano (*Pygeum africanum*) (Papaioannou et al., 2009) se ha empleado con el mismo fin. Cabe mencionar, que ambos preparados poseen como uno de sus tantos constituyentes al ácido atrárico, sustancia de origen líquénico, que posee efecto antagonista del receptor de andrógenos *in vitro* (Papaioannou et al., 2009). Por lo tanto, se podría atribuir la actividad biológica de dichos preparados, a nivel de la próstata, a esta sustancia.

Entre las sustancias de origen líquénico que presentan potencial como fármacos para tratar problemas de la próstata, algunos han presentado actividad citotóxica, antiproliferativa y proapoptótica *in vitro* sobre líneas celulares de cáncer de próstata (**Tabla 4**).

Tabla 4. Propiedades antiproliferativas y proapoptóticas de sustancias líquénicas sobre la próstata.

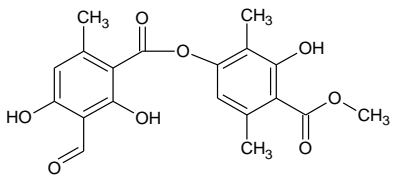
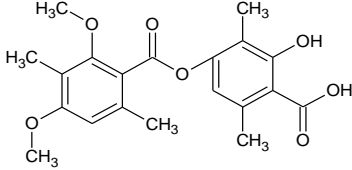
Compuesto	Actividad	Referencia
 <p>atranorina</p>	Antiproliferativo de células de adenocarcinoma de próstata metastásico humano no dependiente de andrógenos (PC-3) y línea celular de cáncer de próstata insensible a andrógenos (DU-145)	Galanty et al., 2017
 <p>ácido difractáico</p>	Antiproliferativo de células PC-3	Russo et al., 2012

Tabla 4 (continuación). Propiedades antiproliferativas y proapoptóticas de sustancias liquénicas sobre la próstata.

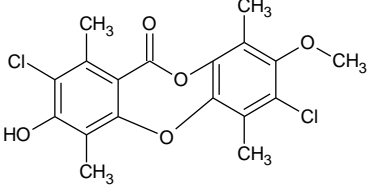
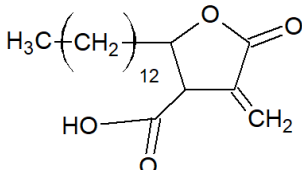
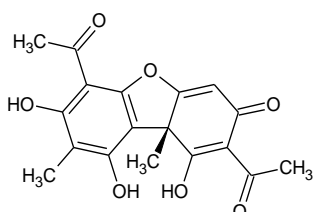
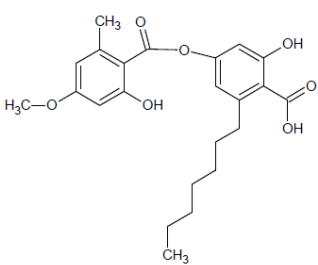
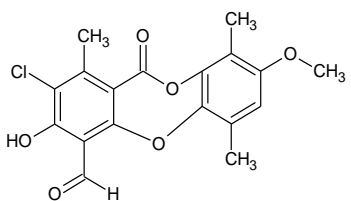
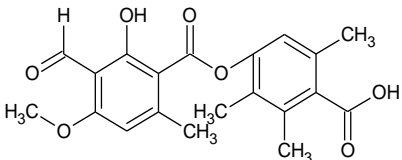
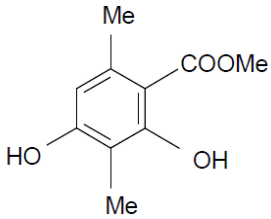
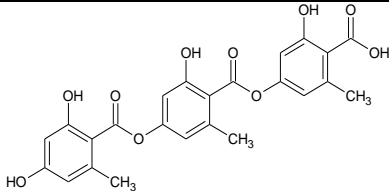
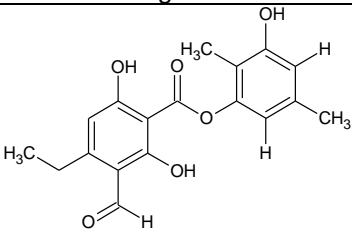
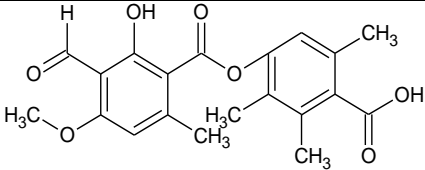
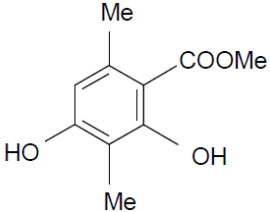
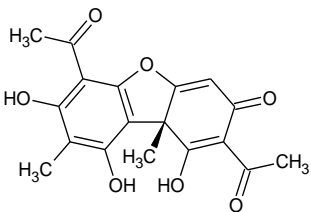
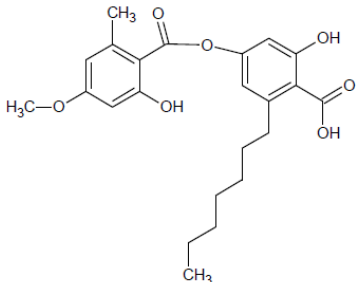
Compuesto	Actividad	Referencia
 <p>vicanicina</p>	Antiproliferativo contra línea celular DU-145	Russo et al., 2012
 <p>ácido protoliqueterínico</p>	Antiproliferativo contra línea celular DU-145	Russo et al., 2012
 <p>ácido úsnico</p>	Antiproliferativo de células PC-3 y DU-145	Bazin et al., 2008; Kim et al., 2015
 <p>esferoforina</p>	Proapoptótico de línea celular DU-145	Russo et al., 2006
 <p>panarina</p>	Proapoptótico de línea celular DU-145	Russo et al., 2006
 <p>ácido escumático</p>	Antiproliferativo de línea celular DU-145	Ranković et al., 2015

Tabla 4 (continuación). Propiedades antiproliferativas y proapoptóticas de sustancias liquénicas sobre la próstata.

Compuesto	Actividad	Referencia
 <p>ácido atrático</p>	Proapoptótico de células de adenocarcinoma de próstata humano sensibles a andrógenos y DU-145 por inhibición de la expresión de Hsp70 (proteínas chaperonas de choque térmico)	Papaioannou et al., 2009
 <p>ácido girifórico</p>	Antiproliferativo de células PC-3 y DU-145	Russo et al., 2012
 <p>thamnoliadépsido A</p>	Antiproliferativo de células PC-3	Ranković et al., 2015
 <p>ácido baemicésico</p>	Antiproliferativo de línea celular DU-145	Ranković et al., 2015

De manera adicional, se ha demostrado el potencial de las sustancias liquénicas para afectar la biosíntesis y/o acción de andrógenos endógenos, mediante antagonismo hacia el receptor de andrógenos y/o la inhibición de enzimas involucradas en su biosíntesis y metabolismo, lo cual sería benéfico para tratar enfermedades de la próstata que dependen de dichas hormonas. En la **tabla 5**, se muestran las sustancias liquénicas que han presentado dicha propiedad en estudios *in vitro* y/o *in silico*.

Tabla 5. Sustancias líquénicas con potencial para afectar la biosíntesis y/o acción de andrógenos.

Compuesto	Actividad	Referencia
 <p>ácido atrático</p>	<p>Antagonista del receptor de andrógenos (RA), impidiendo la expresión génica producida por la expresión del RA. También es un inhibidor de la enzima 5α-reductasa</p>	<p>Papaioannou et al., 2009; Polanía-Patiño, 2020</p>
 <p>ácido úsnico</p>	<p>Inhibidor de la enzima 5α-reductasa</p>	<p>Fonseca y Valencia, 2018</p>
 <p>esferoforina</p>	<p>Inhibidor de la enzima 5α-reductasa</p>	<p>Polanía-Patiño, 2020</p>

2. Materiales y métodos

2.1 Lugares de realización

Las actividades de obtención de compuestos fueron llevadas a cabo en el laboratorio 319 del Departamento de Farmacia (450 – 319), mientras que la evaluación biológica *in vivo* se llevó a cabo en el Bioterio de este (450 – 401).

2.2 Obtención de los compuestos

2.2.1 Procedimientos experimentales generales

La cromatografía en columna abierta (CC) se realizó sobre sobre gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm, Merck) o en Sephadex LH-20 (Sigma). El monitoreo se llevó a cabo mediante cromatografía en capa delgada (CCD) en cromatofolios de aluminio (gel de sílice 60 F₂₅₄, 0.25 mm, Merck) empleando luz ultravioleta (λ 254 nm), yodo bisublimado o solución de ácido sulfúrico acuoso (10 %) con posterior calentamiento (100 °C) como agentes reveladores. La pureza de los compuestos se comprobó por homogeneidad cromatográfica mediante CCD en al menos cinco sistemas de elución diferentes. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi SMP-20 y no están corregidos. Los espectros de infrarrojo (IR) se tomaron en pastilla de bromuro de potasio (KBr), en espectrofotómetro infrarrojo compacto y procesados mediante IRsolution. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se obtuvieron en un espectrómetro Brüker Avance 400-M, empleando como referencia tetrametilsilano (TMS) y como disolventes deuterados: CDCl₃ (99.8 atom % D), procesando con el programa Mestre-C® v.3.7.4.

Los reactivos empleados fueron grado analítico (R.A.): ácido acético (AcOH, 99.0 %), cloroformo (CHCl₃, 99.0 %), acetato de etilo (AcOEt, 99.5 %), *n*-hexano (*n*-hex, 95.0 %), diclorometano (CH₂Cl₂, 99.0 %), metanol (MeOH, 99.5 %).

2.2.2 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. 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. El ácido atrárico se obtuvo del líquen *Stereocaulon strictum* (COL 539476) mientras que la esferoforina de *Bunodophoron melanocarpum*. (COL 591810).

2.2.3 Obtención de esferoforina

El líquen pulverizado *Bunodophoron melanocarpum* (135.0 g) fue extraído por maceración estática y dinámica hasta agotamiento empleando acetona. Durante este proceso precipitó un sólido que fue filtrado al vacío dando lugar a una fracción enriquecida en esferoforina (750 mg). El extracto resultante fue concentrado a presión reducida en rota evaporador.

La fracción enriquecida en esferoforina (750 mg), fue sometida a CC sobre gel de sílice (75 g), eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de *n*-hex:AcOEt:AcOH (100:0:0 → 0:98:2) obteniéndose 117 fracciones (10 mL), que fueron agrupadas en 6 fracciones combinadas (**Tabla 6**).

Tabla 6. Cromatografía en columna sobre gel de sílice de fracción enriquecida en esferoforina.

Fase móvil	Proporción (%)	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -hex	100	1 – 14	FE1	0.0
Hex:AcOEt:AcOH	88:10:2	15 – 47	FE2	211.7
		48 – 69	FE3	6.4
Hex:AcOEt:AcOH	78:20:2	70 – 96	FE4	307.4
AcOEt:AcOH	98:2	97 – 114	FE5	169.1
		115 – 117	FE6	36.2

La fracción combinada FE2 (211.7 mg) se recristalizó de CH₂Cl₂ obteniéndose un sólido (FE2s, 174.3 mg) que se unió con mayor cantidad de fracción enriquecida en esferoforina (312.2 mg) que siguió precipitando a partir del extracto. El sólido resultante de esta unión (486.5 mg) se purificó por CC en Sephadex LH-20 (5.211 g) eluyendo con mezcla de Me₂CO:CH₂Cl₂:MeOH (45:45:10) obteniéndose 20 fracciones (10 mL) (**Tabla 7**) que se reunieron en tres fracciones combinadas de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCD (*n*-Hex:AcOEt:AcOH (34:6:1)).

Tabla 7. Cromatografía en columna sobre Sephadex LH-20 de la fracción FE2s.

Fase móvil	Proporción (%)	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
Me ₂ CO:CH ₂ Cl ₂ :MeOH	45:45:10	1 – 4	FE2s1	60.5
		5 – 10	FE2s2	335.6
		11 - 20	FE2s3	83.4

La fracción combinada FE2s2 (335.6 mg) (**Tabla 7**) se recristalizó de CH₂Cl₂ dando lugar a un sólido amorfo color blanco (268.5 mg) soluble en Me₂CO y CHCl₃ correspondiente a esferoforina.

2.2.4 Obtención del ácido atrárico

Una fracción del líquen *Stereocaulon strictum* (75 mg) enriquecida en ácido atrárico, fue sometida a CC abierta en Sephadex LH-20 (5.211 g) eluyendo con CHCl₃ (100 %) dando lugar a 17 fracciones (12 mL) (**Tabla 8**) que se reunieron en tres fracciones combinadas (F4-1 a F4-3) de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCD (CHCl₃). En la fracción combinada F4-2 se obtuvo un sólido cristalino (52.5 mg) soluble en Me₂CO y CHCl₃ correspondiente al ácido atrárico.

Tabla 8. Cromatografía en columna sobre Sephadex LH-20 de la fracción F4.

Fase móvil	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
CHCl ₃	1 – 3	F4-1	10.3
	4 – 10	F4-2	52.5
	11 – 13		
	14 – 17	F4-3	9.8

2.2.5 Extracción y purificación de finasterida

La finasterida fue extraída de tabletas comerciales (American Generics, contenido por cada tableta: 1 mg, registro sanitario 2018M-0007836-R1), a través de la metodología descrita por Trapani et al. (2002). Para ello, las tabletas fueron pulverizadas en mortero y el polvo obtenido (1.803 g) se ubicó como punto de aplicación en una CC de gel de sílice (50 g) que se eluyó con AcOEt (100 %). Este proceso condujo a la obtención de 25 fracciones (5 mL) (**Tabla 9**) que se reunieron en tres fracciones combinadas. La fracción combinada EF2 contuvo a la finasterida pura (42.0 mg).

Tabla 9. Cromatografía en columna sobre gel de sílice de las tabletas de finasterida

Fase móvil	Proporción	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
AcOEt	100%	1 – 6	EF1	35.0
		7 – 13	EF2	42.0
		14 – 25	EF3	1723.3

2.3 Determinación del efecto *in vivo* sobre la biosíntesis y/o acción de andrógenos endógenos de las sustancias liquénicas mediante el ensayo Hershberger

2.3.1 Animales de experimentación

Ratas Wistar macho (7 a 10 semanas de edad), obtenidas del bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales fueron dejados en periodos de 12 horas luz / 12 horas oscuridad y se mantuvieron con agua y comida (LabDiet®) *ad libitum*. Previo a las orquiectomías (12 h), los animales fueron privados de alimento.

2.3.2 Consideraciones éticas

Para este estudio, se siguieron los protocolos aprobados por el Comité de cuidado y uso institucional que se ciñen a Directrices Internacionales en Investigación en Salud para Bioensayos con Animales (Normas Técnicas, Administrativas y Científicas para Investigación en Salud, establecidas en resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud), al igual que a las guías de bioensayos de actividad antiandrogénica *in vivo* (OECD, 2009). Este trabajo contó con aval del comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, a través del acta 02-2018 (**Anexo A**).

2.3.3 Materiales

Para las orquiectomías se empleó ketamina (Over®) y xilacina (Setón®, Calier) como anestésico e inductor de anestesia, respectivamente; hojas de bisturí número 20 (Nubenco), suturas internas absorbibles de ácido poliglicólico (Natural Master®, registro sanitario 2014DM-0011453) y suturas externas no absorbibles de polipropileno monofilamento (Natural Master®, registro sanitario 2014DM-0011453). Como antiinflamatorio se administró ketoprofeno (Kenogan®, Vecol). La curación diaria de la herida se realizó con gasa estéril (AlfaSafe®, registro sanitario 2015DM-0003258-R1) y solución de yodopovidona (MK®, registro sanitario 2016M-00080-R3). Para el sacrificio de los animales se usó pentobarbital sódico (Euthanex®, composición: pentobarbital sódico 390 mg/mL y difenilhidantoína sódica 50 mg/mL).

2.3.4 Orquiectomías

Los animales fueron anestesiados con ketamina (75 mg/kg peso corporal, vía intraperitoneal) y xilacina (10 mg/kg peso corporal, vía intraperitoneal). La castración se realizó mediante incisión de la bolsa escrotal con bisturí. Tras finalizar el procedimiento, a los animales se les administró ketoprofeno (5 mg/kg, vía intramuscular) y se suministró calor por medios físicos durante 8 horas para evitar muerte por hipotermia. Durante los siguientes 10 días se realizó limpieza de la herida con gasa estéril y yodopovidona solución a fin de permitir la recuperación de estos.

2.3.5 Administración de los tratamientos

Los animales de experimentación fueron distribuidos en 5 grupos de siete individuos cada uno manteniendo homogeneidad de peso corporal entre los grupos (**Tabla 10**) (OECD, 2009). Por limitación en la disponibilidad de animales no se pudo incluir una séptima réplica para el grupo del vehículo (aceite vegetal). A los animales se les administraron los tratamientos vía subcutánea durante 10 días, a partir del día 11, es decir, un día posterior a la orquiectomía.

Las dosis diarias de la esferoforina (2 mg/kg) y del ácido atrárico (2 mg/kg) a ser evaluadas se establecieron tomando como base las dosis en las cuales otras sustancias han evidenciado efecto antiandrogénico *in vivo* (Bratoeff et al., 2010, 2007; Cabeza et al., 2008; Rodríguez Socha, 2014).

Tabla 10. Grupos de experimentación para la evaluación de la actividad antiandrogénica *in vivo* de la esferoforina y el ácido atrárico.

Grupo	Tratamiento
1	Testosterona propionato 0.4 mg/kg + esferoforina 2 mg/kg
2	Testosterona propionato 0.4 mg/kg + ácido atrárico 2 mg/kg
3	Testosterona propionato 0.4 mg/kg
4	Aceite vegetal 1 mL/kg
5	Testosterona propionato 0.4 mg/kg + finasterida 1 mg/kg

2.3.6 Necropsias

Después de 24 horas de haber sido administrada la última dosis, los animales fueron sacrificados por administración de pentobarbital sódico (150 mg/kg, vía intraperitoneal), con posterior confirmación por dislocación cervical. Acto seguido, se procedió a realizar la necropsia y extirpación de órganos dependientes de andrógenos de la siguiente manera:

El glande se extrajo mediante la retracción del prepucio del animal cortando con tijeras quirúrgicas. Las vesículas seminales, mediante incisión horizontal con tijeras quirúrgicas en la parte inferior de la caja torácica, y dos incisiones verticales hasta el nivel de los muslos. Tras remover la piel se realizaron incisiones profundas para extirpar el tejido abdominal que una vez retirado, permitió la remoción de estos órganos. La próstata quedó

expuesta tras extraer las vesículas seminales y fue retirada junto con la vejiga. Para separar estos dos órganos se emplearon pinzas de disección. El músculo bulbo cavernoso se obtuvo mediante un corte con tijeras quirúrgicas en la zona proximal al colon, cortando a su vez intestino grueso, permitiendo la remoción del músculo junto con las glándulas de Cowper que se separaron del tejido conectivo mediante uso de pinzas.

Adicionalmente, se extirparon otros órganos no dependientes de andrógenos como las glándulas suprarrenales, riñones e hígado.

Los órganos extirpados se lavaron con suero fisiológico y se les retiró el tejido conectivo y grasa que podría alterar su pesaje. Luego se secaron e inmediatamente se pesaron dentro de la tapa de una caja Petri. Las glándulas seminales fueron vaciadas por extrusión para evitar que el contenido seminal influyera en la medida del peso. Una vez pesados, los órganos se almacenaron en nevera (entre 2 y 9 °C) en frascos colectores de orina usando formol bufferado (10%) para su conservación.

2.4 Análisis histopatológico de las próstatas

Una parte de los lóbulos ventrales de las próstatas tratadas en cada grupo de experimentación se fijó en formalina bufferada (10%). Luego, se deshidrató por concentraciones ascendentes de alcohol isopropílico y se sometió a un proceso de imbibición e inclusión en parafina. Corte de estos tejidos (4 micras de espesor) se colorearon con hematoxilina/eosina para ser analizados por un patólogo, quién realizó lectura ciega (mínimo 10 campos por muestra a 20x) y valoración semicuantitativa de los hallazgos, así como también, una valoración cuantitativa objetiva por histoscore (Elberry et al. 2011) puntuando los cambios descritos en la **Tabla 11**. La observación fue realizada empleando un microscopio Nikon Eclipse E 100, usando objetivos de alto (40x) y bajo poder (10x), con un objetivo ocular 10x, en el laboratorio PAW Patología Veterinaria. Cabe mencionar que el sistema de puntuación empleado en este estudio se presenta en unidades arbitrarias a fin de hacer una evaluación objetiva.

Tabla 11. Aspectos histopatológicos evaluados a los tejidos prostáticos ventrales tratados con sustancias liquénicas o controles y puntuación asignada (unidades arbitrarias).

Aspecto	Puntuación
<i>Magnificación de bajo poder (10x)</i>	
Forma luminal	regular (1); vellosa (3); papillar (4); cribriforme (5)
Forma acinar	tubular (1); ramificada (3); irregular (5)
Forma interacinar	amplia o moderada (1); glándulas unidas, cercanas (5)
Estroma	escaso (1); abundante (3); fibrosis/severa hiperplasia del musculo liso (5)
<i>Magnificación de alto poder (40x)</i>	
Forma del epitelio	aplanado (1); cuboidal (1); cilíndrico (3); hexagonal (5)
Numero de capas	mono-simple (1); oligoestratificado, 2-4 (3); pluriestratificado > 5 (5) Si > 1, entonces se adiciona: focal (3); difuso (5)
Alineamiento	Si hay acumulación de células epiteliales, agregue (3) Si hay brotes de células epiteliales en el estroma agregue (5) Si se encuentran grupos periacinarios de células epiteliales agregue (3) Si se encuentran grupos aislados de células epiteliales fuera de los acinos, agregue (5)
Distribución de la lesión	unilobar: aislada (2); múltiple (6) bilobar: aislada (4); múltiple (8)
Forma nuclear	redondeada, regular (1); irregular (5) pequeño (2), grande (2), pequeño y grande en el mismo acino (4)
Mitosis por campo	ausentes (0); aisladas, 1-2 (2); abundantes, 3-5 (5); excesivas, > 5 (10)
Membrana basal	intacta (1); interrumpida (5) delgada (1); gruesa (5)
Puntaje inflamatorio adicional	
Inflamación	sin inflamación: 0; infiltrado de células inflamatorias dispersas sin nódulos: 1; linfocitos no confluentes: 2; grandes áreas inflamatorias con confluencia: 3

2.5 Análisis estadístico

Los datos experimentales del peso de cada órgano se homogeneizaron calculando el índice órgano somático mediante la ecuación:

$$\text{Índice del órgano (I)} = \frac{\text{Peso del órgano (g)}}{\text{Peso corporal final (g)}} \times 100$$

Posteriormente, estos índices se analizaron estadísticamente a fin de determinar el efecto de las sustancias evaluadas sobre los órganos. Primeramente se calcularon los coeficientes de variación (CV) de los índices para cada órgano a fin de establecer si se encontraban dentro de los rangos de variación permitidos por el protocolo (40 para próstata y vesículas seminales, 20 para el músculo bulbocavernoso, 35 para las glándulas de Cowper y 17 para el glande) (OECD, 2009). Luego, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para establecer si los datos seguían una distribución normal, y posteriormente se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos por análisis de varianza (ANOVA) de una vía y se hizo comparación del efecto entre los diferentes grupos de experimentación por prueba de Tukey.

3. Resultados y discusión

Los desórdenes dependientes de andrógenos endógenos, entre ellos el cáncer de próstata (CP) y la hiperplasia prostática benigna (HPB) son problemas de salud pública en el entorno nacional y mundial dada su elevada morbilidad y mortalidad (Organización Panamericana de la Salud, 2013). Por lo tanto, se han incluido dentro las líneas prioritarias de investigación a fin de mejorar su detección, tratamiento y pronóstico en la población masculina (Instituto Nacional de Cancerología, 2017). El CP es el más prevalente a nivel mundial constituyéndose en la segunda causa de muerte debida a cáncer entre los hombres maduros (Kelly et al., 2018) mientras que la HPB es una de las primeras causas de atención en consulta externa de los adultos mayores, llegando a ocasionar discapacidad en esta población debido a las manifestaciones clínicas atribuidas al crecimiento prostático (Cuzick et al., 2014).

Tomando como base que dichas enfermedades son dependientes de andrógenos y los inconvenientes que su manejo quirúrgico y farmacológico presenta, dados sus efectos secundarios no deseados, la búsqueda de nuevos principios bioactivos que puedan modular la biosíntesis y/o acción de dichas hormonas y que incluyan mecanismos potencialmente novedosos, se encuentra justificada porque permitiría contribuir a su manejo alternativo seguro y eficaz (Centenera et al., 2018; Chowdhury et al., 2019).

Gran cantidad de fuentes naturales principalmente de origen vegetal han sido exploradas en este sentido, mostrando mecanismos de acción relacionados con estas 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, entre otros (Applegate et al., 2018;

Papaioannou et al., 2009), haciendo viable su empleo como tratamientos alternativos de estas enfermedades.

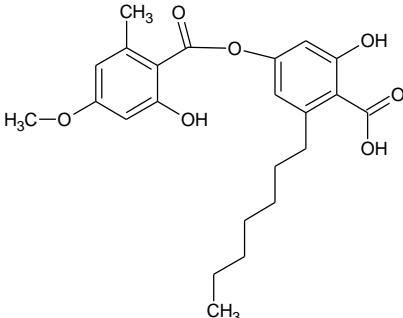
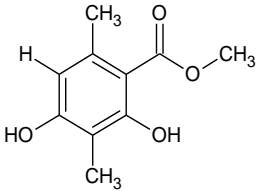
De manera adicional, algunos registros de la medicina tradicional en conjunto con estudios científicos (Papaioannou et al., 2009; Molano-Merchán y Valencia-Islas, 2013; Polanía-Patiño, 2020), han permitido confirmar a los líquenes u hongos liquenizados como una fuente original idónea de compuestos para tratar estas enfermedades, cuyos mecanismos de acción serían potencialmente novedosos (Molano-Merchán y Valencia-Islas, 2013; Papaioannou et al., 2009). En este sentido, se ha encontrado que la sustancia de origen liquénico ácido atrárico posee efecto antiandrogénico *in vitro* sobre células de adenocarcinoma prostático que expresan al RA, siendo selectivo para antagonizar a dicho receptor (Papaioannou et al., 2009). Adicionalmente, en estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación se confirmó que dicho compuesto en conjunto con el dépsido esferoforina, son inhibidores *in vitro* de la 5 α R humana, enzima involucrada en la biosíntesis de andrógenos potentes como la DHT (Polanía-Patiño, 2020). Además se encontró, que el ácido atrárico inhibe a la aromatasa de origen murino, enzima encargada de biotransformar andrógenos en estrógenos, hormonas que también están involucradas en el desarrollo de las enfermedades prostáticas (Polanía-Patiño, 2020).

Considerando que a la fecha se carecen de estudios que hayan evaluado la actividad de dichas sustancias *in vivo*, en el presente trabajo se determinó el efecto que estos compuestos de origen liquénico puedan ejercer para modular la acción y/o biosíntesis de andrógenos endógenos en el modelo preclínico de Hershberger. Lo anterior, con la finalidad de valorarlos como posibles fármacos para el tratamiento de patologías dependientes de hormonas masculinas entre ellas el CP y la HPB, que como se mencionó, son problemas de salud pública en el entorno nacional y mundial.

3.1 Obtención de las sustancias liquénicas objeto de estudio

Los compuestos objeto de estudio, esferoforina y ácido atrárico, fueron aislados y purificados por métodos fitoquímicos convencionales a partir de su fuente natural o de una fracción enriquecida (**Tabla 12**) tal y como se describe en la sección experimental.

Tabla 12. Compuestos de origen liquénico objeto de estudio

Compuesto	Fuente
 <p>esferoforina (1)</p>	<i>Bunodophoron melanocarpum</i>
 <p>ácido atrárico (2)</p>	Fracción enriquecida de <i>Stereocaulon strictum</i>

3.1.1 Confirmación de la identidad de las sustancias liquénicas

Los compuestos aislados y purificados fueron sometidos a la determinación de sus datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C en modalidad uni- y bi-dimensional, a fin de llevar a cabo la corroboración de su identidad comparando con los reportados en la literatura (Huneck y Yoshimura, 1996; Quilhot et al., 1989; Perico-Franco et.al., 2015a; Argüello, 2019).

3.1.2 Esferoforina (1)

En el espectro de absorción al IR de **1** (**Figura 21, Anexo B**) se pueden apreciar bandas que indican la presencia de grupos hidroxilo (3421 cm^{-1}), aromaticidad (3186 , 1577 y 1446 cm^{-1}) y grupos éster (1654 , 1238^* , 1141^* cm^{-1}) y ácido carboxílico (1608 , 1207^* , 1141^* cm^{-1}) (*pueden ser intercambiables entre sí).

Mediante el espectro de RMN de ^1H de **1** (**Tabla 13; Figura 22, Anexo B**) se pueden ver señales para tres metilos de los cuales uno es un metoxilo (δ 3.86, 3H, s), uno se encuentra

sobre anillo aromático (δ 2,75, 3H, s) y el otro es terminal de una cadena alifática (δ 0.98, 3H, t). También se evidencian señales para cuatro hidrógenos aromáticos (δ 6.77, 1H, s; 6.67, 1H, s; 6.40, s y 6.39, 1H, s), un metileno unido a un anillo aromático (δ 3.01, t) y cinco metilenos de cadena alifática (δ 1.65, 2H, q y 1.40-1.30, 8H, m).

En el espectro de RMN de ^{13}C de **1** (**Tabla 13; Figura 23, Anexo B**) se encontraron señales para veintitrés carbonos que mediante ayuda del espectro HMQC **Figura 24, Anexo B** permitieron establecer que se trataban de: un metoxilo (δ 55.4 ppm), dos metilos (δ 24.6 (C-8) y 14.1 (C-7'')), un carbonilo de éster (δ 169.6 (C-7)), seis carbonos de metileno (δ 36.6 (C-1''), 31.8 (C-5''), 31.7 (C-2''), 29.1 (C-3''), 29.7 (C-4'') y 22.6 (C-6'')), un carbonilo de ácido carboxílico (δ 174.9) y doce carbonos aromáticos de los cuales, cuatro están oxigenados (δ 166.5 (C-2), 155.0 (C-4'), 164.9 (C-4) y 165.2 (C-2'')), cuatro sin sustituir (δ 116.3 (C-5'), 112.0 (C-5), 109.0 (C-3') y 98.9 (C-3)) y cuatro son cuaternarios (δ 150.0 (C-6'), 143.5 (C-6), 108.6 (C-1') y 104.2 (C-1)).

Basado en las correlaciones H \rightarrow C del espectro bidimensional HMBC de **1** (**Tabla 13; Figura 14; Figura 25, Anexo B**): a) H-3 (δ 6.40) con C-2 (δ 166.5), C-5 (δ 112.0) y C-4 (δ 164.9); b) H-8 (δ 2.75) con los carbonos C-6 (δ 143.4), C-5 (δ 111.7) y C-1 (δ 104.2) y c) O-Me (δ 3.84) con C-4 (δ 164.9), se concluyó que el anillo A del dépsido presenta una estructura tipo orcinol, con uno de los hidroxilos metilado. Por otra parte, mediante las correlaciones d) H-3' (δ 6.77) con C-1' (δ 108.6), C-2' (δ 165.2), C-4' (δ 155.0) y C-5' (δ 116.0); e) H-1'' (δ 3.01) con C-6' (δ 149.9), C-5' (δ 116.0) y C-1' (δ 108.7); y f) H-7'' (δ 0.98) con C-6'' (δ 22.4) y C-5'' (δ 31.4), se determinó que el anillo B del dépsido también presentaba un patrón de orcinol sustituido por una cadena alifática de siete átomos de carbono. De este modo, se estableció que **1** es la esferoforina, un dépsido biosintetizado por la ruta metabólica del acetato polimalonato, reportado para el género *Bunodophoron* (Culberson, 1972) y cuyos datos espectroscópicos son consistentes con los de la literatura (Huneck y Yoshimura, 1996).

Tabla 13. Datos de Resonancia Magnética Nuclear para la esferoforina (1).

Posición	δ_c^a	δ_H (ppm), integración, m.		HMBC H \rightarrow C
		Experimental ^a	Reportado ^b	
1	104.2	-	-	-
2	166.5	-	-	-
3	98.9	6.40, 1H, s	6.40, 1H, s	2, 5, 4
4	164.9	-	-	-
5	112.0	6.39, 1H, s	6.40, 1H, s	1, 3, 4
6	143.5	-	-	-
7	169.6	-	-	-
8	24.6	2.75, 3H, s	2.61, 3H, s	1, 5, 6
1'	108.6	-	-	-
2'	165.2	-	-	-
3'	109.0	6.77, 1H, s	6.74, 1H, s	1', 2', 4', 5'
4'	155.0	-	-	-
5'	116.3	6.67, 1H, s	6.60, 1H, s	1', 4', 1''
6'	150.0	-	-	-
7'	174.9	-	-	-
1''	36.6	3.01, 2H, t (J = 7.68 Hz)	3.05, 2H, t	1', 5', 6'
2''	31.7	1.65, 2H, q (J = 7.26 Hz)	1.20 – 1.50, 10H, m	-
3''	29.1	1.39, 2H, m		-
4''	29.7	1.31, 2H, m		-
5''	31.8	1.30, 2H, m		-
6''	22.6	1.40, 2H, m		-
7''	14.1	0.98, 3H, t (J = 6.3Hz)		-
CH ₃ -O	55.4	3.86, 3H, s		-

^a Tomado en CDCl₃ (¹H; 400 MHz y ¹³C 100 MHz). ^b Tomado en CDCl₃ (50.3 MHz) (Huneck & Yoshimura, 1996). *Asignación confirmada por HMBC.

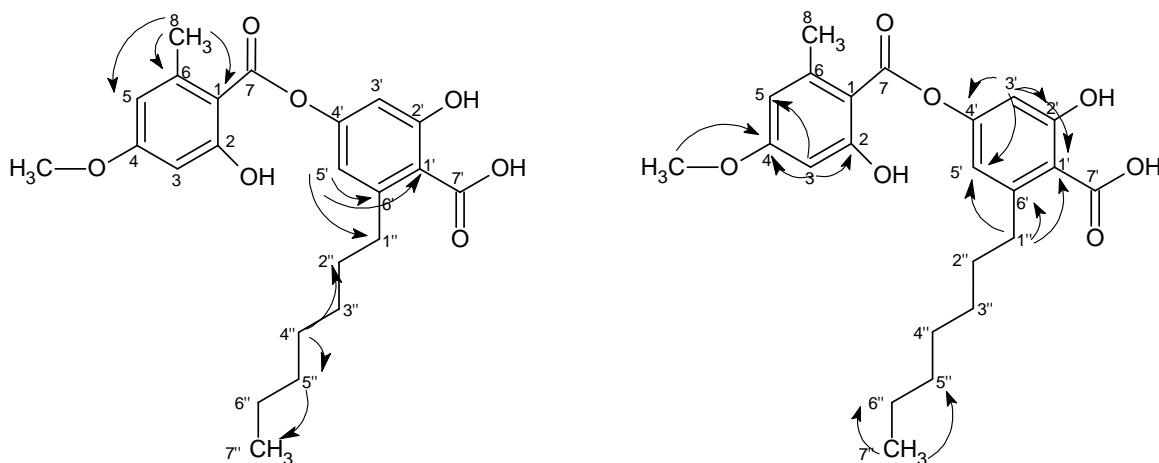


Figura 14. Correlaciones HMBC (H \rightarrow C) clave en la determinación estructural de la esferoforina (1).

3.1.3 Ácido atrárico (2)

En el espectro de absorción al IR de **2** (**Figura 26, Anexo B**) se pueden apreciar bandas que indican la presencia de grupos hidroxilo (3406 cm^{-1}), aromaticidad (3082 , 1639 , 1600 y 1423 cm^{-1}) y grupos éster (1739 , 1273 , 1195 cm^{-1}).

El espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto **2** (**Tabla 14; Figura 27, Anexo B**), presentó señales para hidrógenos de dos grupos metilos ubicados sobre el anillo aromático (δ 2.10, 3H, s, C-8 y 2.45, 3H, s, C-9) y uno de éster (δ 3.92, 3H, s). También presentó una señal para un hidrógeno aromático (δ 6.21, 1H, s, H-5) y una para un hidrógeno de grupo hidroxilo (δ 12.03, s, C-4) formando un puente de hidrógeno deducido a partir del valor de su desplazamiento químico a campo bajo (C-2).

Su espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 14; Figura 28, Anexo B**) presentó señales para diez átomos de carbono, que mediante ayuda del espectro HMQC (**Figura 29, Anexo B**) permitieron establecer que: uno correspondió a un carbonilo de éster (δ 172.6 (C-7), dos, a metilos sobre anillo aromático (δ 7.6 (C-8) y 24.1 (C-9)); uno a un metil éster (δ 51.8) y seis, a carbonos de naturaleza aromática (δ 105.2 (C-1), 163.2 (C-2), 108.6 (C-3), 158.1 (C-4), 110.6 (C-5) y 140.1 (C-6)) de los cuales, dos están oxigenados (δ 158.1 (C-4) y 163.1 (C-2)). Cabe mencionar que los datos experimentales coinciden con los encontrados en la literatura para el ácido atrárico (Huneck y Yoshimura, 1996), un compuesto fenólico simple con patrón de β -orcinol muy común en líquenes. Sin embargo, se observó discrepancia en la asignación de señales para los carbonos oxigenados C-2 y C-4 cuyos valores son inversos a los reportados (**Tabla 14**). Mediante el espectro bidimensional HMBC de **2** (**Figura 30, Anexo B**), que permite establecer las correlaciones H \rightarrow C a dos y tres enlaces de distancia, se determinó inequívocamente que las señales en δ 163.2 y 158.1, corresponden a los carbonos aromáticos base de hidroxilo C-2 y C-4, respectivamente, dadas las correlaciones presentadas entre el H del hidroxilo sobre C-2 (δ 12.04) con los carbonos C-1 (δ 105.2), C-3 (δ 108.5) y C-2 (δ 163.2) y entre el hidrógeno del metino aromático H-5 con el carbono base de hidroxilo C-4.

Tabla 14. Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido atrárico (2).

Posición	δ_C (ppm)		δ_H (ppm) integración, m.		HMBC H \rightarrow C
	Experimental ^a	Reportado ^b	Experimental ^a	Reportado ^b	Experimental
1	105.2	105.2	-	-	-
2	163.2*	158.0	12.03 (s, 1H)	12.04 (s, 1H)	1, 2, 3
3	108.6	108.5	-	-	-
4	158.1*	163.1	5.41 (s, 1H)	5.23 (s, 1H)	-
5	110.6	110.5	6.21 (s, 1H)	6.20 (s, 1H)	1, 3, 4, 9
6	140.1	140.2	-	-	-
7	172.6	172.6	-	-	-
8	7.6	7.6	2.10 (s, 3H)	2.10 (s, 3H)	2, 3, 4
9	24.1	24.1	2.45 (s, 3H)	2.45 (s, 3H)	1, 5, 6
OCH ₃	51.8	51.8	3.92 (s, 3H)	3.92 (s, 3H)	7

^a Tomado en CDCl₃ (¹H; 400 MHz y ¹³C 100 MHz). ^b Tomado en CDCl₃ (50.3 MHz) (Huneck & Yoshimura, 1996). *Asignación confirmada por HMBC.

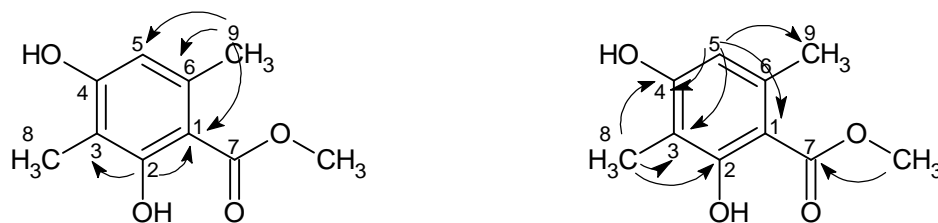


Figura 15. Correlaciones HMBC (H \rightarrow C) clave en la determinación estructural del ácido atrárico (2).

3.2 Determinación del efecto *in vivo* sobre la biosíntesis y/o acción de andrógenos endógenos de las sustancias liquénicas purificadas

La actividad biológica *in vivo* de los compuestos liquénicos purificados se realizó mediante el ensayo Hershberger en ratas Wistar macho adultas (OECD, 2009). Cabe mencionar que este ensayo permite evaluar la capacidad de una sustancia para alterar los mecanismos de biosíntesis y acción de andrógenos endógenos. Se fundamenta en que posterior a la extirpación de la principal fuente endógena de andrógenos, en este caso los testículos, los órganos dependientes de dichas hormonas se verán afectados en su crecimiento, peso y tamaño. Es así como los animales al ser castrados dejan de producir andrógenos en un 95 % (ya que el 5 % se debe a biosíntesis suprarrenal), por lo que se hace necesaria la administración de una dosis estándar de testosterona propionato a fin de ocasionar un crecimiento homogéneo de los órganos dependientes de andrógenos en los individuos del ensayo (OECD, 2009). Este ensayo se originó en 1930, y ha sido ampliamente usado para la evaluación de moléculas con propiedades androgénicas y antiandrogénicas. Surgió como una metodología *in vivo* para evaluar disruptores endocrinos. El ensayo Hershberger fue validado y sus resultados fueron publicados en el año 2008, en la que se analizaron estudios dosis-respuesta testosterona propionato y flutamida, variabilidad interlaboratorios, entre otros aspectos (OECD, 2009; Timm, 2008).

Debido a que el crecimiento de los órganos que dependen de andrógenos en el macho: glándula, próstata, músculo bulbocavernoso, glándulas de Cowper y vesículas seminales, es rápido tras la administración de testosterona propionato, el punto final del ensayo permite obtener resultados significativos (OECD, 2009). Asimismo, se determina el peso de órganos independientes de andrógenos, como por ejemplo, las glándulas suprarrenales, riñones e hígado, con el fin de evidenciar posibles cambios morfológicos macroscópicos como respuesta a la acción de las sustancias a evaluar, que pudieran sugerir algún grado de toxicidad (Gray et al., 2005; OECD, 2009).

En este sentido, tras realizar la castración quirúrgica de los animales y permitir su recuperación, se llevó a cabo la administración diaria (por 10 días) de las sustancias a evaluar en presencia de una dosis fija de testosterona propionato, tal como fue descrito en la metodología (**2.3.5 Administración de los tratamientos**). Veinticuatro horas después del último tratamiento, se realizó la necropsia de los animales a fin de extraerles los

órganos mencionados (**Figura 16**), mismos que fueron pesados y para el caso de la próstata, conservados para su posterior análisis histopatológico. A fin de establecer el efecto de los diferentes tratamientos sobre los órganos dependientes de andrógenos, los datos de los pesos de los órganos fueron estandarizados con el peso corporal del animal, a fin de obtener el índice órgano somático, que fue procesado estadísticamente. Primeramente, se determinó el coeficiente de variación (CV) para los índices de cada órgano (**Anexo C**) evidenciando que el glande del grupo tratado con el ácido atrárico (grupo 2) y del aceite vegetal (grupo 4), así como también el músculo bulbocavernoso del grupo tratado con ácido atrárico (grupo 2) se encontraba fuera de rango de variación permitido, por lo cual, la información estadística inferida a partir de este grupo en relación con el glande no puede ser aseverada (OECD, 2009). Acto seguido, se determinó que todos los grupos (**Anexo D**) presentaron normalidad en los datos (estadístico de Shapiro-Wilk) (Owens William et al., 2006).

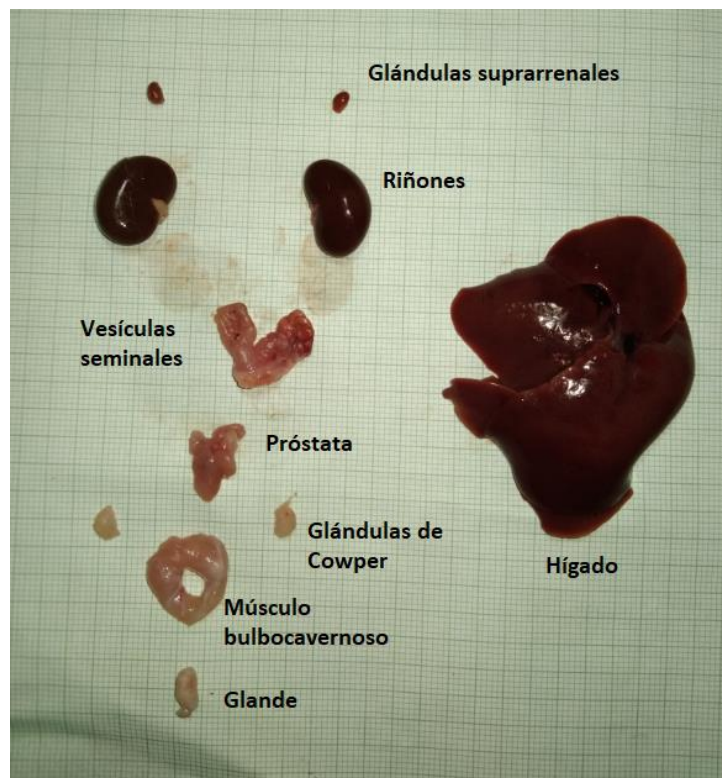


Figura 16. Órganos extraídos tras necropsia en ensayo Hershberger. Órganos dependientes de andrógenos endógenos: glande, próstata, músculo bulbocavernoso, glándulas de Cowper y vesículas seminales. Órganos no dependientes de andrógenos: hígado, glándulas suprarrenales y riñones.

El análisis estadístico de las medias de los índices órgano somáticos (representado mediante diagrama de cajas y bigotes) (**Figura 17**), permitió evidenciar qué para los órganos dependientes de andrógenos: próstata, vesículas seminales, músculo bulbocavernoso, glándulas de Cowper y glande, la media del grupo tratado con testosterona propionato (TP) (0.135 ± 0.013 , 0.1277 ± 0.0068 , 0.269 ± 0.013 , 0.0218 ± 0.0016 , 0.0312 ± 0.0016) es estadísticamente diferente y de mayor valor, a la del grupo tratado como blanco o control negativo (0.0536 ± 0.0072 , 0.0271 ± 0.0034 , 0.1030 ± 0.0083 , 0.00556 ± 0.00064 , 0.0198 ± 0.0014) (vehículo de aceite vegetal cuyos animales carecen de fuente endógena y exógena de andrógenos) permitiendo corroborar el efecto androgénico (entendido como un aumento del tamaño y peso del mismo) *in vivo* de esta hormona.

Por su parte, la media del grupo tratado con finasterida (control positivo) (0.0671 ± 0.0084 , 0.057 ± 0.011) es estadísticamente diferente y de menor valor, a la del grupo tratado con TP (0.135 ± 0.013 , 0.1277 ± 0.0068) para la próstata y las vesículas seminales, asemejándose a su vez, a la media del grupo tratado como blanco o control negativo (0.053 ± 0.016 , 0.0271 ± 0.0076) permitiendo corroborar el efecto antiandrogénico (entendido como la disminución del tamaño y peso) *in vivo* de dicho fármaco.

Debido a que, para el caso de las sustancias liquénicas, las medias (esferoforina (0.143 ± 0.0345 , 0.119 ± 0.012) y ácido atrárico (0.125 ± 0.024 , 0.119 ± 0.026) se superponen con la del grupo tratado con TP (0.135 ± 0.035 , 0.128 ± 0.018) para la próstata y las vesículas seminales, se infiere que no presentan efecto androgénico ni antiandrogénico *in vivo* sobre estos órganos a la dosis evaluada (0.2 mg/kg peso) en este estudio.

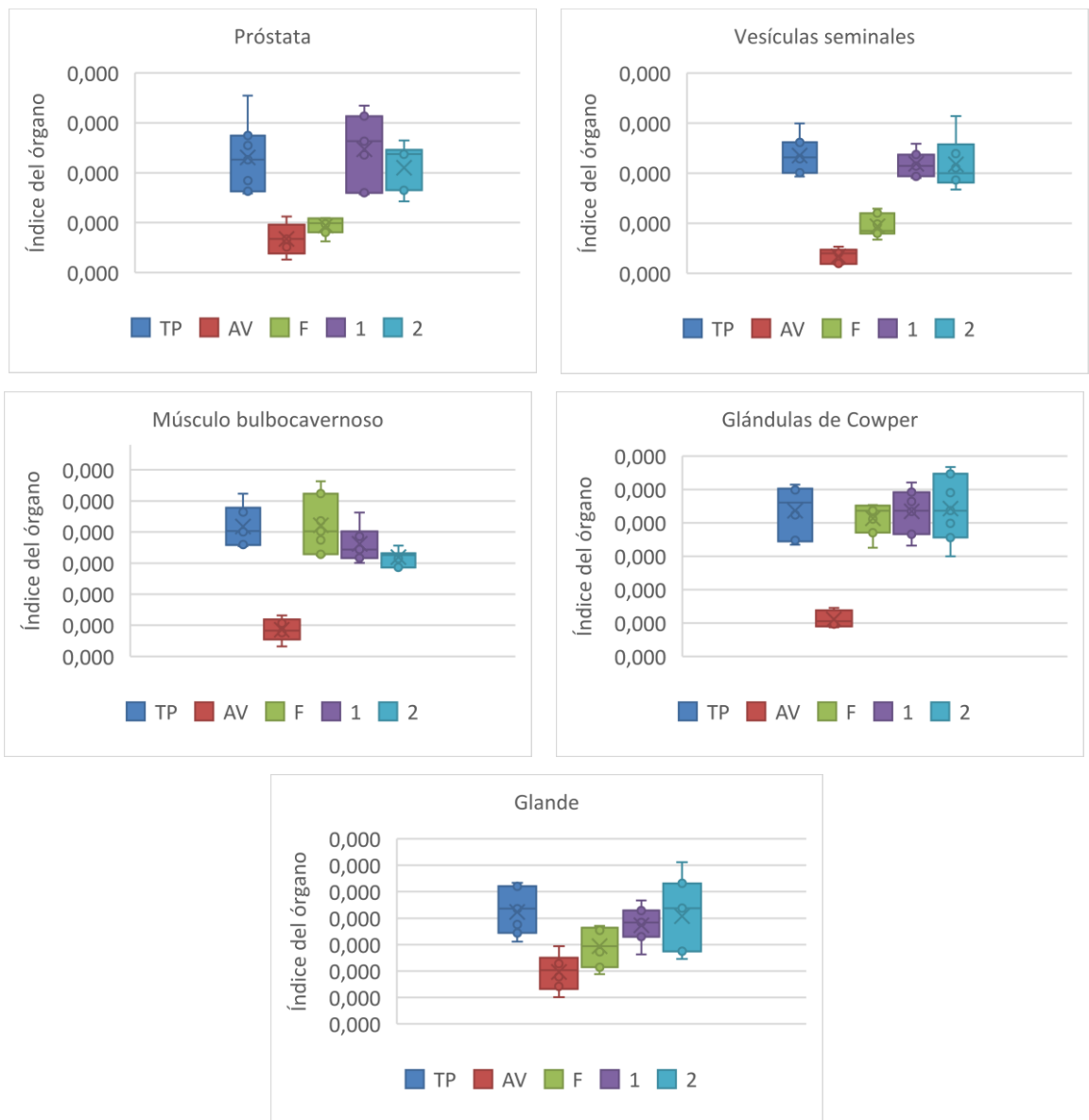


Figura 17. Efecto (anti)-androgénico *in vivo* de las sustancias de origen liquénico esferoforina (1) y ácido atrárico (2) en rata. TP: testosterona propionato, AV: aceite vegetal (vehículo), F: finasterida. Diagrama de cajas y bigotes.

Adicionalmente, como se aprecia en la **Figura 17**, la esferoforina (1), el ácido atrárico (2) y la finasterida no presentaron efecto antiandrogénico *in vivo* sobre el músculo bulbocavernoso, las glándulas de Cowper y el glante a la dosis evaluada, ya que las medias de los índices para estos órganos sometidos a dichos tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí: 1 (0.241 ± 0.029 , 0.0218 ± 0.0033 ,

0.0287 ± 0.0034); **2** (0.220 ± 0.013, 0.0221 ± 0.0049, 0.0304 ± 0.0070) y finasterida (0.27 ± 0.19, 0.0207 ± 0.0024, 0.0247 ± 0.0037).

Considerando que los datos experimentales presentaron normalidad, adicionalmente al análisis de medias de índices de órganos mediante el diagrama de cajas y bigotes, se llevó a cabo un ANOVA de una vía (**Anexo E**) encontrando que existen diferencias estadísticamente significativas al menos para un grupo de tratamiento: próstata (p valor = $9,61 \times 10^{-07}$), vesículas seminales (p valor = $1,97 \times 10^{-11}$), músculo bulbocavernoso (p valor = $3,95 \times 10^{-09}$), glándulas de Cowper (p valor = $4,27 \times 10^{-07}$), glande (p valor = $5,99 \times 10^{-04}$). A fin de establecer que grupos de tratamiento presentaban dichas diferencias, se empleó la prueba de Tukey (**Anexo F**) permitiendo establecer que las medias de los índices órgano somáticos para las próstatas y las vesículas seminales de los animales tratados con **1** o con **2** no presentaban diferencias estadísticamente significativas comparando con el tratado con TP ($p > 0.05$), sin embargo, sí presentaron diferencias estadísticamente significativas comparando con el grupo tratado con finasterida ($p < 0.05$). Con base en estos hallazgos, se determinó que ni **1** ni **2** presentan efecto antiandrogénico *in vivo* a la dosis evaluada sobre dichos órganos pues se esperaba que presentaran un comportamiento similar (sin diferencias estadísticamente significativas) al presentado por el fármaco finasterida empleado como control positivo de este estudio.

Tomando como base los resultados derivados de estos análisis, se determinó que ni la esferoforina ni el ácido atrárico presentaron efecto antiandrogénico *in vivo* sobre los órganos dependientes de andrógenos: próstata, glándulas de Cowper, vesículas seminales, músculo bulbocavernoso y glande. Por su parte, el fármaco finasterida, presentó efecto antiandrogénico solo sobre la próstata y las vesículas seminales. Cabe mencionar que el ensayo Hershberger establece que una molécula posee actividad antiandrogénica si se presenta alteración de al menos dos de los cinco tejidos dependientes de andrógenos (OECD, 2009). Por lo tanto, se puede considerar que el modelo fue válido desde el punto de vista de los controles empleados en este estudio.

En el caso de los órganos no dependientes de andrógenos: glándulas suprarrenales, riñones e hígado (**Figura 18**) no se observaron diferencias en las medias de los índices órgano somáticos sometidos a los diferentes tratamientos indicando que éstos no poseen efecto *in vivo* sobre dichos órganos. Considerando que los datos experimentales para los órganos no dependientes de andrógenos presentaron normalidad también, se realizó un

ANOVA de una vía (**Anexo E**) encontrando que no existen diferencias estadísticamente significativas para ningún grupo de tratamiento: riñones (p valor = 0.158), glándulas suprarrenales (p valor = 0.326), hígado (p valor = 0.329). Cabe mencionar que no se presentó alteración morfológica macroscópica en estos órganos por efecto de los tratamientos.

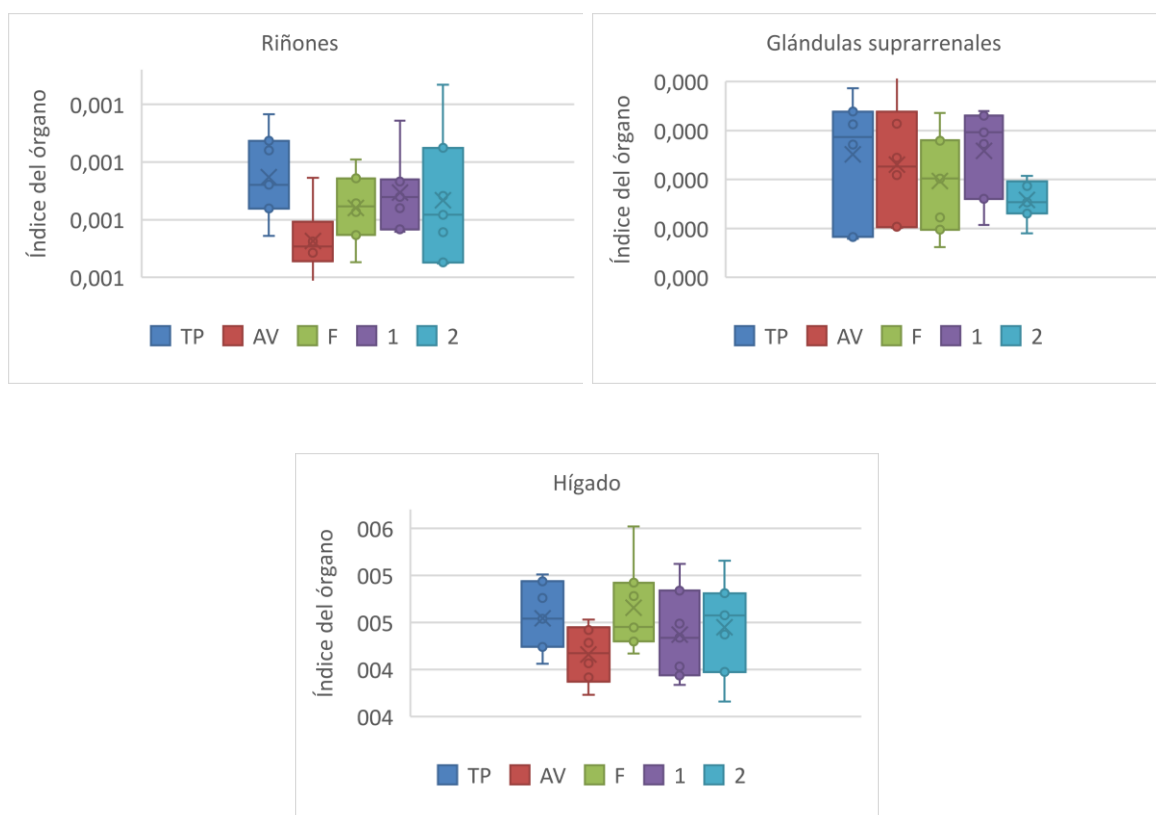


Figura 18. Efecto *in vivo* de las sustancias de origen liquénico esferofoarina (1) y ácido atrárico (2) sobre órganos de rata no dependientes de andrógenos. TP: testosterona propionato, AV: aceite vegetal (vehículo), F: finasterida. Diagrama de cajas y bigotes

Considerando que los índices órgano somáticos para los órganos dependientes de andrógenos cumplieron con el criterio de normalidad y que sus coeficientes de variación se encontraron dentro del rango permitido por las guías aprobadas del ensayo (OECD, 2009), se puede descartar que la carencia de efecto *in vivo* por parte de las sustancias

líquénicas se deba a fallas experimentales. En este sentido, sería conveniente realizar ensayos adicionales empleando dosis más elevadas y otras vías de administración a fin de descartar por completo la carencia de actividad *in vivo* de estos compuestos líquénicos. Lo anterior, considerando que estos compuestos poseen efecto inhibitorio de la enzima 5 α -reductasa en ensayos *in vitro*. Cabe mencionar que la guía del ensayo recomienda realizar ensayos de las sustancias objeto de estudio a dosis superiores en caso de que se haya partido de una dosis fija, cuando existan dudas respecto a su efecto antiandrogénico *in vivo* (OECD, 2009). De igual modo, se hacen necesarios estudios de toxicidad aguda como criterio para establecer una dosis máxima en una curva dosis-respuesta, en donde se parta de la dosis ya evaluada como límite inferior. En el caso del presente estudio, se optó por la dosis de 2 mg/kg de peso para su ensayo, tomando como criterio que a esta dosis diversas sustancias, particularmente de origen sintético con naturaleza esteroidea ha mostrado actividad *in vivo* en el ensayo Hershberger. Sin embargo, en otros estudios se puede evidenciar el empleo de dosis mucho mayores cuando se trata de productos de origen natural al igual que otras vías de administración (Botelho-Lourenço et al., 2012; Kennel et al., 2004; Murata et al., 2013). No se construyó una curva dosis vs respuesta dada la carencia de animales al momento del estudio. La OECD no establece una dosis mínima para realizar la evaluación de las sustancias de estudio, únicamente considera dosis máxima basada en los estudios de toxicidad aguda y crónica, cuando se tenga conocimiento de la dosis mínima tóxica.

Dado el efecto antiandrogénico *in vitro* mostrado por la esferoforina y el ácido atrárico en estudios previos (Polanía-Patiño, 2020), se esperaba que presentaran actividad *in vivo* en este estudio. Sin embargo, debido a que el modelo Hershberger establece como punto final del ensayo, el peso del órgano dependiente de andrógenos sin realizarse medición del compuesto ensayado en tejidos o en plasma, no se puede aseverar que dichos compuestos carezcan de acción *in vivo*, pues existen variables farmacocinéticas que pueden afectar la cantidad de fármaco que llega al tejido diana para ejercer su efecto. Por ejemplo, los compuestos pueden haber sufrido degradación enzimática o baja absorción vía subcutánea; volúmenes de distribución bajos, entre otras causas, que influirían negativamente en su biodisponibilidad. De cualquier modo, se recomienda evaluar dosis más altas de estos compuestos y otras vías de administración a fin de descartar su efecto antiandrogénico *in vivo*.

3.3 Análisis histopatológicos de próstatas para determinar posible efecto protector *in vivo* de las sustancias liquénicas al efecto de la administración de andrógenos

Considerando que la esferoforina y el ácido atrárico no presentaron un efecto antiandrogénico *in vivo* en el ensayo Hershberger a la dosis evaluada (2 mg / Kg peso), porque no disminuyeron el peso de los órganos dependientes de andrógenos, y con la finalidad de poder determinar si a nivel histológico se podrían haber generado algunos cambios que podrían suponer un posible efecto antiandrogénico o protector del tejido sobre la próstata, se llevó a cabo el análisis histopatológico de dichos tejidos de los animales sometidos a los diferentes tratamientos.

Los hallazgos histopatológicos permitieron determinar de manera semicuantitativa (**Tabla 15 y Figura 19 A-C**) que el tejido en el grupo al que se le administró únicamente aceite vegetal (vehículo) no presentó características histológicas de tejido hiperplásico con hipertrofia celular ni aumento de eosinofilia, ni tampoco presencia de células descamadas. Este tejido es cilíndrico, de altura media-baja y regular con células sobre lámina basal delgada homogénea; presenta tinción basófila pálida. Sus células no han perdido su polaridad y sus núcleos son redondeados y regulares. Los alveolos presentan de 2 a 6 capas de tejido fibromuscular con patrón histológico normal y acinos regulares, además de que no presenta células descamadas.

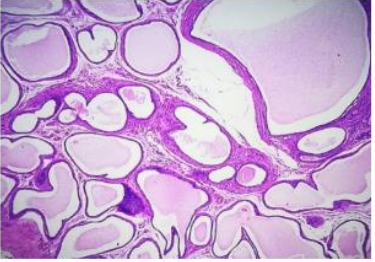
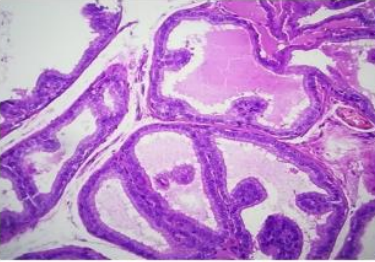
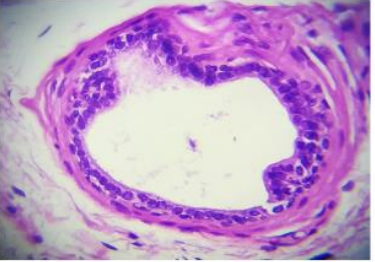
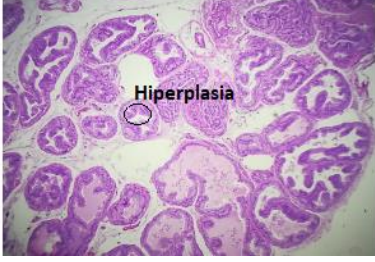
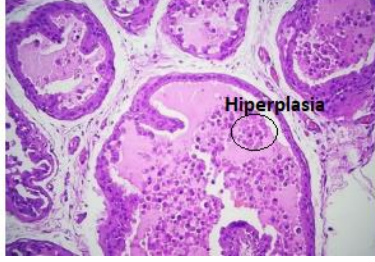
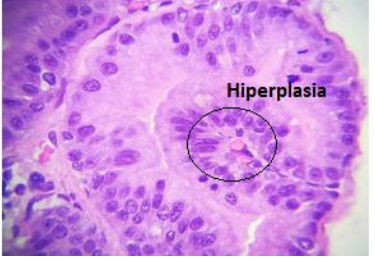
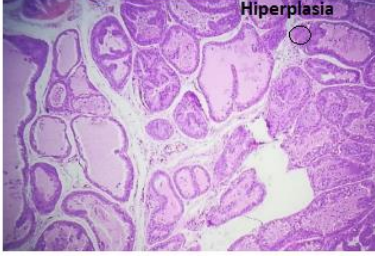


El grupo tratado sólo con testosterona propionato presentó el tejido con mayor hiperplasia (de un 90 a 100 % del tejido): es hexagonal, de altura media e irregular, ausencia de revestimiento epitelial en algunos focos e irregularidad de lámina basal, además de presentar numerosas células descamadas. Presenta tinción basófila viva. Sus células presentan polaridad moderada con núcleos irregulares con cromatina laxa y nucléolos prominentes, además de figuras mitóticas aisladas. Los alveolos presentan escaso tejido fibromuscular con patrón histológico normal y acinos regulares y numerosas células descamadas (**Tabla 15 y Figura 19 D-F**). Cabe mencionar, que los hallazgos histopatológicos en los tejidos prostáticos hiperplásicos se caracterizan por mayor número de células con morfología variable, algunas de ellas con núcleos ovoides elongados, y también hay presencia de células altas, columnares y muco-secretoras en los acinos

prostáticos (Antúnez et al., 2011; Roehrborn, 2008). El tejido restante de este grupo (10 a 0 %) fue tejido normal (no hiperplásico).

Tabla 15. Hallazgos histopatológicos en tejido prostático de rata sometido a diferentes tratamientos *in vivo*. Análisis semicuantitativo.

	Tratamiento	AV	T	F	1	2
	% tejido normal	100	0 a 10	50	60	40
Característica						
Epitelio glandular	Tipo	Cilíndrico, de altura media-baja y regular con células sobre lámina basal delgada homogénea	Hexagonal, de altura media e irregular. Ausencia de revestimiento epitelial en algunos focos e irregularidad de lámina basal	Cilíndrico	Cilíndrico	Cilíndrico
	Vacuolización	Leve	ND*	Moderada	Moderada	Moderada
	Tinción basófila	Pálida	Viva	Pálida	Pálida	Pálida
	% tejido hiperplásico con hipertrofia celular moderada y aumento de eosinofilia	0	90 a 100	50	40	60
	Pérdida de polaridad celular	Ausente. Células con núcleos redondeados y regulares	Moderada. Núcleos irregulares con cromatina laxa y nucléolos prominentes. Figuras mitóticas aisladas	Leve	Leve	Leve
Alveolos	Contenido proteináceo	+	+	+	+	+
	Células descamadas	Ausentes	Numerosas	Ausentes en tejido normal. Numerosas en hiperplásico	Ausentes en tejido normal. Numerosas en hiperplásico	Ausentes en tejido normal. Numerosas en hiperplásico
	Capas de tejido fibromuscular	2 a 6 con patrón histológico normal y acinos regulares	Escaso	1 a 3 en tejido normal Escaso en hiperplásico	1 a 3 en tejido normal 1 a 2 en hiperplásico	1 a 3 en tejido normal Escaso en hiperplásico

*ND = No determinado

Tratamiento	Imágenes		
aceite vegetal	 <p data-bbox="716 496 905 521">A) Objetivo 10x</p>	 <p data-bbox="1066 496 1255 521">B) Objetivo 40x</p>	 <p data-bbox="1423 496 1633 521">C) Objetivo 100x</p>
testosterona propionato	 <p data-bbox="716 818 905 842">D) Objetivo 10x</p>	 <p data-bbox="1066 818 1255 842">E) Objetivo 40x</p>	 <p data-bbox="1423 818 1633 842">F) Objetivo 100x</p>
finasterida	 <p data-bbox="716 1188 905 1213">G) Objetivo 10x</p>	 <p data-bbox="1066 1188 1255 1213">H) Objetivo 40x</p>	 <p data-bbox="1423 1188 1633 1213">I) Objetivo 100x</p>

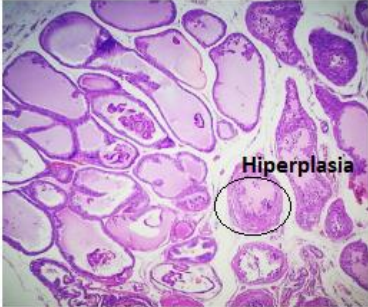

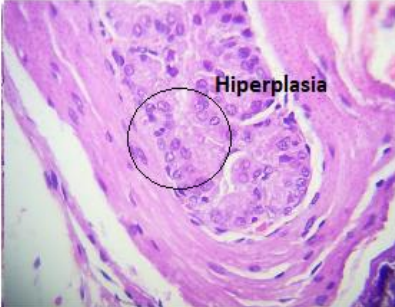
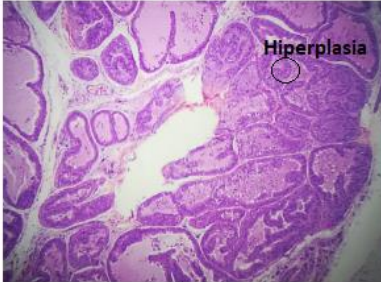
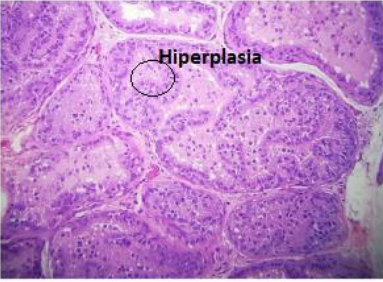

Tratamiento	Imágenes		
esferoforina (1)	 <p data-bbox="726 688 909 716">J) Objetivo 10x</p>	 <p data-bbox="1066 688 1249 716">K) Objetivo 40x</p>	 <p data-bbox="1423 688 1606 716">L) Objetivo 100x</p>
ácido atrárico (2)	 <p data-bbox="726 1057 909 1084">M) Objetivo 10x</p>	 <p data-bbox="1066 1057 1249 1084">N) Objetivo 40x</p>	 <p data-bbox="1423 1057 1606 1084">O) Objetivo 100x</p>

Figura 19. Hallazgos histopatológicos en tejidos prostáticos de rata sometidos a diferentes tratamientos *in vivo*. **A-C:** aceite vegetal. **D-F:** testosterona propionato. **G-I:** Finasterida. **J-L:** esferoforina. **M-O:** ácido atrárico.

En relación con los otros tratamientos, el tejido prostático de los animales tratados concomitantemente con finasterida y TP, presentó un patrón histopatológico con características mixtas entre el tratado solamente con el vehículo (aceite vegetal) y el tratado con TP (tejido con máxima inducción de hiperplasia), debido a que solo cerca de la mitad del éste (50 %) presentó hiperplasia y el restante (50 %) fue tejido normal (no hiperplásico). Cabe mencionar, que el tejido hiperplásico de estos animales presentó las características histopatológicas del tejido tratado con TP y el tejido no hiperplásico mantuvo los rasgos histopatológicos del tratado con aceite vegetal (no hiperplásico) (**Tabla 15 y Figura 19 G-I**), lo cual permite inferir las propiedades protectoras de la finasterida frente a la generación de hiperplasia prostática inducida por testosterona, lo cual respaldaría su efecto antiandrogénico *in vivo*.

Por su parte, el tejido prostático de los animales tratados concomitantemente con TP y cada una de las sustancias liquénicas esferoformina (**1**) y ácido atrárico (**2**), presentaron un patrón histopatológico similar al presentado por la finasterida, en el sentido de que no todo el tejido prostático de estos animales presentó la inducción de hiperplasia por testosterona. El tejido prostático de los animales tratados con TP más esferoformina (**Tabla 15 y Figura 19 J-L**) presentó un 40 % de hiperplasia y el restante (60 %) de tejido normal (no hiperplásico) mientras que el tratado con TP más el ácido atrárico (**Tabla 15 y Figura 19 M-O**), presentó un 60 % de hiperplasia y el restante (40 %) fue tejido normal. Lo anterior permitiría inferir que estos compuestos, presentan un carácter protector frente a la inducción de hiperplasia por parte de la testosterona administrada concomitantemente con dichos compuestos.

De manera adicional, se puntuó la forma de los acinos, el estroma, el epitelio, el número de capas de tejido fibromuscular, etc. en los tejidos prostáticos, a fin de encontrar semejanzas o diferencias entre los tratamientos (Elberry et al., 2011; Engelstein et al., 1996) (**Tabla 11**). Como se puede apreciar en la **Tabla 16**, el tejido prostático de los animales tratados ya sea con esferoformina (**1**) o ácido atrárico (**2**) en presencia de propionato de testosterona, poseen una puntuación de características similares tanto al grupo tratado con el vehículo (control negativo) como a tratado con finasterida (control positivo), lo que permitiría inferir que dichas sustancias poseen un efecto protector frente a la inducción de hiperplasia por parte de la testosterona.

Cabe mencionar que ninguno de los tejidos analizados presentó inflamación incluyendo el grupo tratado con TP. Por lo que no se puede aseverar que la capacidad antiinflamatoria que ha presentado el ácido atrárico en estudios previos (Mun et al., 2020) pueda influir en los hallazgos de este estudio.

Tabla 16. Puntuación (histoscore) de características presentes en tejidos prostáticos de rata sometidos a diferentes tratamientos *in vivo*.

Tratamiento	Puntuación promedio
Vehículo (aceite vegetal)	10.8 ± 3.4
Testosterona propionato	44.2 ± 2.8
Finasterida	21.2 ± 4.0
Esferoforina	16.6 ± 2.6
Ácido atrárico	24.8 ± 2.1

Cabe mencionar que, por primera vez en este estudio, se reportan datos *in vivo* del efecto de este tipo de compuestos liquénicos sobre la próstata.

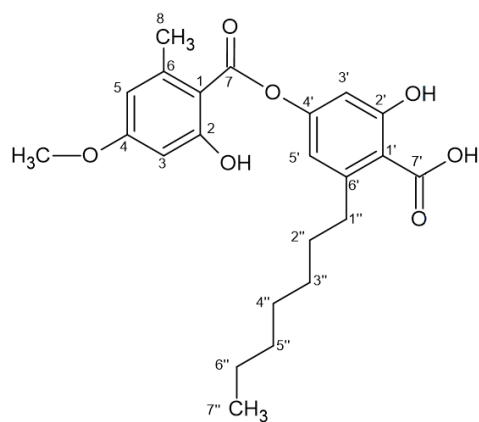
3.4 Relación entre la estructura química de las sustancias liquénicas estudiadas y su efecto protector *in vivo* ante la inducción de hiperplasia en tejido prostático por administración de testosterona

Considerando que la esferoforina (**1**) (en un 60 %) y el ácido atrárico (**2**) (en un 40 %) presentaron un efecto protector *in vivo* ante la inducción de hiperplasia en el tejido prostático por administración del andrógeno testosterona, y relacionando dicho efecto con su estructura química, se puede apreciar que ambos compuestos son aromáticos y que **1** es un dépsido con patrón de orcinol mientras que **2** es un compuesto monoaromático con patrón de β -orcinol (**Figura 20**). Por lo tanto, se podría suponer que el hecho de que sean compuestos aromáticos sería benéfico para la actividad protectora *in vivo*. Sin embargo, considerando qué en este estudio, la finasterida que a su vez es un compuesto de naturaleza no aromática sino esteroidal, también presentó efecto protector frente a la

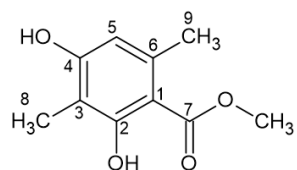
inducción de hiperplasia prostática por parte de TP, no permite confirmar lo anterior. Respecto a los patrones estructurales presentados en **1** y **2** y relacionándolos con el efecto protector encontrado, el patrón de orcinol (presente en **1**), sería más benéfico para dicha actividad protectora. Sin embargo, teniendo en cuenta que el ácido atrárico ($CI_{50} = 17.27 \pm 0.12$ nM) resultó ser un inhibidor de la 5α -reductasa *in vitro* más potente que la esferoforina ($CI_{50} = 50.28 \pm 0.58$ nM) (Polanía, 2020) no se puede relacionar su efecto protector con el patrón estructural presentado. Considerando que la esferoforina es una sustancia más lipofílica (**Figura 20**) vs el ácido atrárico, esta propiedad sería benéfica para para atravesar membranas lipídicas y llegar a la próstata para ejercer su acción protectora explicando porque *in vivo*, la esferoforina presentó mayor efecto protector.

Estudios previos han mostrado que tanto la esferoforina como el ácido atrárico poseen actividad antioxidante *in vitro* (Argüello-Galindo, 2019; Perico-Franco, 2011), lo cual permitiría suponer que dichas sustancias podrían estar ejerciendo diversos mecanismos de acción para proteger al tejido prostático.

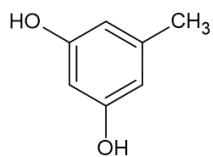
Dado que no se cuenta con datos de más sustancias evaluadas en este estudio, se recomienda profundizar en esta área a fin de poder establecer una relación entre la estructura química de las sustancias y la actividad protectora presentada.



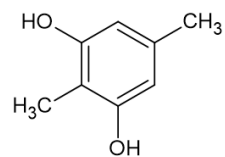
Esferoforina (1)
log P = 6.61



Ácido atrárico (2)
log P = 2.22



Orcinol



β-Orcinol

Figura 20. Estructura de patrones de orcinol y β-orsinol y compuestos de origen liquénico objeto de estudio

4. Conclusiones

- Se obtuvieron para su evaluación *in vivo* a las sustancias de origen liquénico esferoforina (1) y ácido atrárico (2), cuya identidad química se comprobó mediante análisis y comparación de sus datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C con los reportados en la literatura.
- La esferoforina (1) y el ácido atrárico (2) no presentaron efecto antiandrogénico *in vivo* en el ensayo Hershberger, a la dosis evaluada (2 mg/kg peso), ya que no disminuyeron de manera significativa el peso de los órganos dependientes de andrógenos endógenos. Adicionalmente, tampoco presentaron efecto sobre órganos no dependientes de andrógenos (hígado, riñones y glándulas suprarrenales), ya que no se apreciaron cambios morfológicos en los mismos, lo cual podría indicar de manera preliminar que no poseen efecto tóxico evidente a corto plazo.
- La esferoforina (1) y el ácido atrárico (2) presentaron efecto protector del 60 y 40%, respectivamente, ante la inducción de hiperplasia prostática por parte del andrógeno testosterona propionato, lo cual fue evidenciado a nivel histológico. Considerando las diversas actividades biológicas que estas sustancias han presentado *in vitro*, se podría suponer que ejercen su efecto protector por diversos mecanismos de acción incluyendo los relacionados con la alteración de la biosíntesis y/o acción de andrógenos endógenos.
- A pesar de que la esferoforina y el ácido atrárico son compuestos aromáticos con diferentes patrones estructurales, no se pudo establecer una relación concreta entre la estructura química y la actividad presentada por los mismos dada la discrepancia entre sus datos *in vitro* e *in vivo*.
- Los compuestos de origen liquénico ácido atrárico y esferoforina son candidatos para estudios más profundos que permitan desarrollarlos como fármacos para el posible tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos endógenos entre ellos, el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna.

5. Recomendaciones

- Se recomienda realizar la evaluación *in vivo* de los compuestos esferoforina (1) y ácido atrárico (2) a mayor dosis, con el fin de corroborar su efecto antiandrogénico *in vivo*.
- Se recomienda evaluar *in vivo* compuestos con características estructurales similares y que hayan presentado efectos *in vitro* para establecer una relación entre la estructura y la actividad de un modo más preciso.

Bibliografía

- Aggarwal, S., Thareja, S., Verma, A., Bhardwaj, T.R., Kumar, M., 2010. An overview on 5 α -reductase inhibitors. *Steroids* 75, 109–153. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.10.005>
- American Cancer Society, 2017. Factores de riesgo del cáncer de próstata [WWW Document]. URL <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-prostata/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html> (accessed 11.2.17).
- Antúnez, P., Herrero, M., Santos-Briz Terrón, Á., Lorenzo Gómez, F., Bullón Sopelana, A., 2011. Hiperplasia benigna de próstata con metaplasia estromal fibroadiposa. *Actas Urológicas Españolas* 35, 63–64.
- Applegate, C.C., Rowles, J.L., Ranard, K.M., Jeon, S., Erdman, J.W., 2018. Soy Consumption and the Risk of Prostate Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 10. <https://doi.org/10.3390/nu10010040>
- Argüello-Galindo, J.J., 2019. Determinación del potencial del hongo liquenizado *Bunodophoron melanocarpum* como fuente de compuestos duales con actividad foto-protectora y antioxidante (Tesis Maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Arlandis Guzmán, S., García Matres, M.J., González Segura, D., Rebollo, P., 2009. Prevalencia de síntomas del tracto urinario inferior en pacientes con síndrome de vejiga hiperactiva: Manejo del paciente en la práctica clínica habitual. *Actas Urológicas Españolas* 33, 902–908.
- Asplund, J., Wardle, D.A., 2017. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biol Rev Camb Philos Soc* 92, 1720–1738. <https://doi.org/10.1111/brv.12305>
- Azzouni, F., Godoy, A., Li, Y., Mohler, J., 2012. The 5 Alpha-Reductase Isozyme Family: A Review of Basic Biology and Their Role in Human Diseases. *Adv Urol* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/530121>
- Bazin, M.-A., Le Lamer, A.-C., Delcros, J.-G., Rouaud, I., Uriac, P., Boustie, J., Corbel, J.-C., Tomasi, S., 2008. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 6860–6866. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.05.069>
- Bechis, S.K., Otsetov, A.G., Ge, R., Olumi, A.F., 2014. Personalized medicine for the management of benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* 192, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.01.114>
- Beer, T.M., Armstrong, A.J., Rathkopf, D.E., Lortot, Y., Sternberg, C.N., Higano, C.S., Iversen, P., Bhattacharya, S., Carles, J., Chowdhury, S., Davis, I.D., de Bono, J.S., Evans, C.P., Fizazi, K., Joshua, A.M., Kim, C.-S., Kimura, G., Mainwaring, P., Mansbach, H., Miller, K., Noonberg, S.B., Perabo, F., Phung, D., Saad, F., Scher, H.I., Taplin, M.-E., Venner, P.M., Tombal, B., 2014. Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy. *N Engl J Med* 371, 424–433. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1405095>
- Bernal, R., Gradstein, R., Celis, M., 2016. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia.
- Bhasin, S., Jasuja, R., 2009. Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) as Function Promoting Therapies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12, 232–240. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32832a3d79>

-
- Bolton, E.M., Lynch, T., 2018. Are all gonadotrophin-releasing hormone agonists equivalent for the treatment of prostate cancer? A systematic review. *BJU Int.* 122, 371–383. <https://doi.org/10.1111/bju.14168>
- Botelho-Lourenço, E.L., Centeno Muller, J., Boareto, A.C., Gomes, C., Lourenço, A.C., Minatovicz, B., Crestani, S., Gasparotto, A., Martino-Andrade, A.J., Dalsenter, P.R., 2012. Screening for in vivo (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of *Tropaeolum majus* L. and its effect on uterine contractility. *J Ethnopharmacol* 141, 418–423. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.004>
- Bottino, M., Lanari, C., 2010. Localización extranuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *MEDICINA (Buenos Aires)* 70, 173–184.
- Bratoeff, E., García, P., Heuze, Y., Soriano, J., Mejía, A., Labastida, A.M., Valencia, N., Cabeza, M., 2010. Molecular interactions of progesterone derivatives with 5 alpha-reductase types 1 and 2 and androgen receptors. *Steroids* 75, 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.03.006>
- Bratoeff, E., Ramirez, E., Valencia, N., 1997. The Pharmacology of the Antiandrogens [WWW Document]. ResearchGate. URL https://www.researchgate.net/publication/289218409_The_Pharmacology_of_the_Antiandrogens (accessed 6.24.19).
- Bratoeff, E., Sainz, T., Cabeza, M., Heuze, I., Recillas, S., Pérez, V., Rodríguez, C., Segura, T., Gonzáles, J., Ramírez, E., 2007. Steroids with a carbamate function at C-17, a novel class of inhibitors for human and hamster steroid 5alpha-reductase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 107, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.03.038>
- Bravo, L.E., Muñoz, N., Bravo, L.E., Muñoz, N., 2018. Epidemiology of cancer in Colombia. *Colombia Médica* 49, 9–12. <https://doi.org/10.25100/cm.v49i1.3877>
- Brooke, G.N., Gamble, S.C., Hough, M.A., Begum, S., Dart, D.A., Odontiadis, M., Powell, S.M., Fioretti, F.M., Bryan, R.A., Waxman, J., Wait, R., Bevan, C.L., 2015. Antiandrogens act as selective androgen receptor modulators at the proteome level in prostate cancer cells. *Mol. Cell Proteomics* 14, 1201–1216. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.036764>
- Burger, H.G., 2002. Androgen production in women. *Fertil. Steril.* 77 Suppl 4, S3-5.
- Cabeza, M., Bratoeff, E., Ramírez, E., Heuze, I., Recillas, S., Berrios, H., Cruz, A., Cabrera, O., Perez, V., 2008. Biological activity of novel progesterone derivatives having a bulky ester side chains at C-3. *Steroids* 73, 838–843. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.03.006>
- Calcott, M.J., Ackerley, D.F., Knight, A., Keyzers, R.A., Owen, J.G., 2018. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem Soc Rev* 47, 1730–1760. <https://doi.org/10.1039/c7cs00431a>
- Cappeta, M., Stengel, F., 2013. Inhibidores de 5 α reductasa. Perfil de seguridad. *Arch. Argent. Dermatol.* 63, 45–49.
- Cardile, V., Graziano, A., Avola, R., Piovano, M., Russo, A., 2016. Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid. *Chemico-Biological Interactions* 263. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.12.007>
- Caro-Zapata, F.L., Vásquez-Franco, A., Correa-Galeano, É.D., García-Valencia, J., 2018. Complicaciones infecciosas después de prostatectomía abierta y resección

- transuretral de próstata en pacientes con hiperplasia prostática benigna. *Iatreia* 31, 274–283. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v31n3a05>
- Cataño, J.G.C., Morales, C.E., 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, 2–16.
- Centenera, M.M., Selth, L.A., Ebrahimie, E., Butler, L.M., Tilley, W.D., 2018. New Opportunities for Targeting the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030478>
- Chowdhury, S., Beitel, L.K., Lumbroso, R., Purisima, E.O., Paliouras, M., Trifiro, M., 2019. A Targeted Bivalent Androgen Receptor Binding Compound for Prostate Cancer Therapy. *Horm Cancer* 10, 24–35. <https://doi.org/10.1007/s12672-018-0353-6>
- Crawford, E.D., Higano, C.S., Shore, N.D., Hussain, M., Petrylak, D.P., 2015. Treating Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer: A Comprehensive Review of Available Therapies. *J. Urol.* 194, 1537–1547. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.06.106>
- Crona, D.J., Milowsky, M.I., Whang, Y.E., 2015. Androgen receptor targeting drugs in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance. *Clin Pharmacol Ther* 98, 582–589. <https://doi.org/10.1002/cpt.256>
- Culberson, C.F., 1972. Improved conditions and new data for identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography A* 72, 113–125. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(72\)80013-X](https://doi.org/10.1016/0021-9673(72)80013-X)
- Culig, Z., Santer, F.R., 2014. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 33, 413–427. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9474-0>
- Cummings, B., 2002. Diversity of Fungi. Pearson Education, Inc.
- Cuzick, J., Thorat, M.A., Andriole, G., Brawley, O.W., Brown, P.H., Culig, Z., Eeles, R.A., Ford, L.G., Hamdy, F.C., Holmberg, L., Ilic, D., Key, T.J., Vecchia, C.L., Lilja, H., Marberger, M., Meyskens, F.L., Minasian, L.M., Parker, C., Parnes, H.L., Perner, S., Rittenhouse, H., Schalken, J., Schmid, H.-P., Schmitz-Dräger, B.J., Schröder, F.H., Stenzl, A., Tombal, B., Wilt, T.J., Wolk, A., 2014. Prevention and early detection of prostate cancer. *The Lancet Oncology* 15, e484–e492. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70211-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70211-6)
- Daniyal, M., Siddiqui, Z.A., Akram, M., Asif, H.M., Sultana, S., Khan, A., 2014. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 9575–9578.
- Davey, R.A., Grossmann, M., 2016. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev* 37, 3–15.
- Davidson, E., Morgentaler, A., 2016. Testosterone Therapy and Prostate Cancer. *Urol. Clin. North Am.* 43, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.01.007>
- Denmeade, S.R., Isaacs, J.T., 2002. A history of prostate cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2, 389–396. <https://doi.org/10.1038/nrc801>
- Detti, B., D'Angelillo, R.M., Ingrosso, G., Olmetto, E., Francolini, G., Triggiani, L., Bruni, A., Borghesi, S., Fondelli, S., Carfagno, T., Santini, R., Santoni, R., Trodella, L.E., Livi, L., 2017. Combining Abiraterone and Radiotherapy in Prostate Cancer Patients Who Progressed During Abiraterone Therapy. *Anticancer Res.* 37, 3717–3722. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11744>
- Dunn, M.W., 2017. Prostate Cancer Screening. *Semin Oncol Nurs* 33, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2017.02.003>

-
- Edwards, J.L., 2008. Diagnosis and management of benign prostatic hyperplasia. *Am Fam Physician* 77, 1403–1410.
- Elberry, A.A., Mufti, S.T., Al-Maghrabi, J.A., Abdel-Sattar, E.A., Ashour, O.M., Ghareib, S.A., Mosli, H.A., 2011. Anti-inflammatory and antiproliferative activities of date palm pollen (*Phoenix dactylifera*) on experimentally-induced atypical prostatic hyperplasia in rats. *J Inflamm (Lond)* 8, 40. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-8-40>
- Engelstein, D., Shmueli, J., Bruhis, S., Servadio, C., Abramovici, A., 1996. Citral and testosterone interactions in inducing benign and atypical prostatic hyperplasia in rats. *Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 115, 169–177.
- FDA, 2011. 5-alpha reductase inhibitors (5-ARIs) may increase the risk of a more serious form of prostate cancer [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm258314.htm> (accessed 1.29.19).
- Fitzpatrick, J.M., Artibani, W., 2006. Therapeutic Strategies for Managing BPH Progression. *European Urology Supplements* 5, 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2006.08.009>
- Fonseca, I., Valencia, N., 2018. Estudio de acomplamiento molecular entre enzima 5 alfa reductasa (isoforma II) y algunas sustancias de origen liquénico con posible actividad frente a la hiperplasia prostática benigna. Universidad Nacional de Colombia.
- Friedrich, N., Völzke, H., Rosskopf, D., Steveling, A., Krebs, A., Nauck, M., Wallaschofski, H., 2008. Reference ranges for serum dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone in adult men. *J. Androl.* 29, 610–617. <https://doi.org/10.2164/jandrol.108.005561>
- Galanty, A., Koczurkiewicz, P., Wnuk, D., Paw, M., Karnas, E., Podolak, I., Węgrzyn, M., Borusiewicz, M., Madeja, Z., Czyż, J., Michalik, M., 2017. Usnic acid and atranorin exert selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate and melanoma cancer cells. *Toxicol In Vitro* 40, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.008>
- Gamat, M., McNeel, D.G., 2017. Androgen deprivation and immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer.* <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0145>
- Gao, W., Bohl, C.E., Dalton, J.T., 2005. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem. Rev.* 105, 3352–3370. <https://doi.org/10.1021/cr020456u>
- Gillessen, S., Omlin, A., Attard, G., de Bono, J.S., Efstathiou, E., Fizazi, K., Halabi, S., Nelson, P.S., Sartor, O., Smith, M.R., Soule, H.R., Akaza, H., Beer, T.M., Beltran, H., Chinnaiyan, A.M., Daugaard, G., Davis, I.D., De Santis, M., Drake, C.G., Eeles, R.A., Fanti, S., Gleave, M.E., Heidenreich, A., Hussain, M., James, N.D., Lecouvet, F.E., Logothetis, C.J., Mastris, K., Nilsson, S., Oh, W.K., Olmos, D., Padhani, A.R., Parker, C., Rubin, M.A., Schalken, J.A., Scher, H.I., Sella, A., Shore, N.D., Small, E.J., Sternberg, C.N., Suzuki, H., Sweeney, C.J., Tannock, I.F., Tombal, B., 2015. Management of patients with advanced prostate cancer: recommendations of the St Gallen Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC) 2015. *Ann Oncol* 26, 1589–1604. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv257>

- Gleason, D.F., 1992. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Human Pathology, The Pathobiology of Prostate Cancer-Part 1* 23, 273–279.
[https://doi.org/10.1016/0046-8177\(92\)90108-F](https://doi.org/10.1016/0046-8177(92)90108-F)
- Gleicher, N., Kushnir, V.A., Weghofer, A., Barad, D.H., 2016. The importance of adrenal hypoandrogenism in infertile women with low functional ovarian reserve: a case study of associated adrenal insufficiency. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 14, 23.
<https://doi.org/10.1186/s12958-016-0158-9>
- Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M.F., Allen, C., Hansen, G., Woodbrook, R., Wolfe, C., Hamadeh, R.R., Moore, A., Werdecker, A., Gessner, B.D., Te Ao, B., McMahon, B., Karimkhani, C., Yu, C., Cooke, G.S., Schwebel, D.C., Carpenter, D.O., Pereira, D.M., Nash, D., Kazi, D.S., De Leo, D., Plass, D., Ukwaja, K.N., Thurston, G.D., Yun Jin, K., Simard, E.P., Mills, E., Park, E.-K., Catalá-López, F., deVeber, G., Gotay, C., Khan, G., Hosgood, H.D., Santos, I.S., Leasher, J.L., Singh, J., Leigh, J., Jonas, J.B., Jonas, J., Sanabria, J., Beardsley, J., Jacobsen, K.H., Takahashi, K., Franklin, R.C., Ronfani, L., Montico, M., Naldi, L., Tonelli, M., Geleijnse, J., Petzold, M., Shrimme, M.G., Younis, M., Yonemoto, N., Breitborde, N., Yip, P., Pourmalek, F., Lotufo, P.A., Esteghamati, A., Hankey, G.J., Ali, R., Lunevicius, R., Malekzadeh, R., Dellavalle, R., Weintraub, R., Lucas, R., Hay, R., Rojas-Rueda, D., Westerman, R., Sepanlou, S.G., Nolte, S., Patten, S., Weichenthal, S., Abera, S.F., Fereshtehnejad, S.-M., Shiue, I., Driscoll, T., Vasankari, T., Alsharif, U., Rahimi-Movaghar, V., Vlassov, V.V., Marcenes, W.S., Mekonnen, W., Melaku, Y.A., Yano, Y., Artaman, A., Campos, I., MacLachlan, J., Mueller, U., Kim, D., Trillini, M., Eshrati, B., Williams, H.C., Shibuya, K., Dandona, R., Murthy, K., Cowie, B., Amare, A.T., Antonio, C.A., Castañeda-Orjuela, C., van Gool, C.H., Violante, F., Oh, I.-H., Deribe, K., Soreide, K., Knibbs, L., Kereselidze, M., Green, M., Cardenas, R., Roy, N., Tillmann, T., Tillman, T., Li, Y., Krueger, H., Monasta, L., Dey, S., Sheikhabaei, S., Hafezi-Nejad, N., Kumar, G.A., Sreeramareddy, C.T., Dandona, L., Wang, H., Vollset, S.E., Mokdad, A., Salomon, J.A., Lozano, R., Vos, T., Forouzanfar, M., Lopez, A., Murray, C., Naghavi, M., 2015. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol* 1, 505–527.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.0735>
- Globocan, 2021a. Estadísticas de cáncer en Colombia.
- Globocan, 2021b. Estadísticas de cáncer a nivel mundial.
- Goldstein, A.S., Huang, J., Guo, C., Garraway, I.P., Witte, O.N., 2010. Identification of a cell-of-origin for human prostate cancer. *Science* 329, 568–571.
<https://doi.org/10.1126/science.1189992>
- Goyal, P.K., Verma, S., Sharma, A.K., 2016. PHARMACOLOGICAL AND PHYTOCHEMICAL ASPECTS OF LICHEN PARMELIA PERLATA: A REVIEW. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy* 7, 102–107.
<https://doi.org/10.7897/2277-4343.07138>
- Gray, L.E., Furr, J., Ostby, J.S., 2005. Hershberger assay to investigate the effects of endocrine-disrupting compounds with androgenic or antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. *Curr Protoc Toxicol Chapter 16, Unit16.9*.
<https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1609s26>
- Grozescu, T., Popa, F., 2017. Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *J Med Life* 10, 5–12.

-
- Gupta, E., Guthrie, T., Tan, W., 2014. Changing paradigms in management of metastatic Castration Resistant Prostate Cancer (mCRPC). *BMC Urol* 14, 55. <https://doi.org/10.1186/1471-2490-14-55>
- Handelsman, D.J., Hirschberg, A.L., Bermon, S., 2018. Circulating Testosterone as the Hormonal Basis of Sex Differences in Athletic Performance. *Endocrine Reviews* 39, 803–829. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00020>
- Harris, W.P., Mostaghel, E.A., Nelson, P.S., Montgomery, B., 2009. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol* 6, 76–85. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1296>
- Helsen, C., Van den Broeck, T., Voet, A., Prekovic, S., Van Poppel, H., Joniau, S., Claessens, F., 2014. Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy. *Endocr. Relat. Cancer* 21, T105-118. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0545>
- Huneck, S., Yoshimura, I., 1996. Identification of Lichen Substances, 1st Edition. ed. Springer.
- Instituto Nacional de Cancerología, 2017. Análisis de situación del cáncer en Colombia 2015.
- Instituto Nacional de Cancerología ESE, Sociedad Colombiana de Urología, 2013. Guía de práctica clínica (GPC) para la detección temprana, diagnóstico, tratamiento, seguimiento y rehabilitación del cáncer de próstata.
- Instituto Nacional del Cáncer, 2011a. Hiperplasia prostática benigna [WWW Document]. National Cancer Institute. URL <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario> (accessed 1.26.19).
- Instituto Nacional del Cáncer, 2011b. Resección transuretral de la próstata [WWW Document]. National Cancer Institute. URL <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario> (accessed 1.26.19).
- Inzunza, G., Rada, G., Majerson, A., 2018. Bipolar or monopolar transurethral resection for benign prostatic hyperplasia? *Medwave* 18, e7134. <https://doi.org/10.5867/medwave.2018.01.7134>
- Jin, J.-X., Wang, H.-Z., Zhai, Z.-X., Ma, B.-L., Li, Q.-F., Xiao, N., Wang, Z.-P., Rodriguez, R., 2017. Transrectal microwave thermotherapy causing a short-time influence on sperm quality in Chinese chronic nonbacterial prostatitis patients. *Asian J Androl* 19, 548–553. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.185852>
- Kelly, S.P., Anderson, W.F., Rosenberg, P.S., Cook, M.B., 2018. Past, Current, and Future Incidence Rates and Burden of Metastatic Prostate Cancer in the United States. *Eur Urol Focus* 4, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2017.10.014>
- Kennel, P.F., Pallen, C.T., Bars, R.G., 2004. Evaluation of the rodent Hershberger assay using three reference endocrine disrupters (androgen and antiandrogens). *Reproductive Toxicology* 18, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2003.10.012>
- Kim, H., Kim, K.K., Hur, J.-S., 2015. Anticancer Activity of Lichen Metabolites and Their Mechanisms at the Molecular Level, in: Upreti, D.K., Divakar, P.K., Shukla, V., Bajpai, R. (Eds.), *Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques, Volume 2*. Springer India, New Delhi, pp. 201–208. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2235-4_11
- Klap, J., Schmid, M., Loughlin, K.R., 2015. The relationship between total testosterone levels and prostate cancer: a review of the continuing controversy. *J. Urol.* 193, 403–413. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.07.123>

- Kurup, A., Garg, R., Hansch, C., 2000. Comparative QSAR analysis of 5 α -reductase inhibitors. *Chem. Rev.* 100, 909–924.
- Lamb, A., Neal, D., 2013. Role of the androgen receptor in prostate cancer. *Trends in Urology & Men's Health*.
- Lee, S.W.H., Chan, E.M.C., Lai, Y.K., 2017. The global burden of lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* 7, 7984. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06628-8>
- Lempiäinen, J.K., Niskanen, E.A., Vuoti, K.-M., Lampinen, R.E., Göös, H., Varjosalo, M., Palvimo, J.J., 2017. Agonist-specific Protein Interactomes of Glucocorticoid and Androgen Receptor as Revealed by Proximity Mapping. *Mol. Cell Proteomics* 16, 1462–1474. <https://doi.org/10.1074/mcp.M117.067488>
- Lim, K.B., 2017. Epidemiology of clinical benign prostatic hyperplasia. *Asian J Urol* 4, 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2017.06.004>
- Lozano, J.A., 2003. Diagnóstico y tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata. *Offarm* 22, 90–98.
- Lücking, R., Moncada, B., Martínez-Habibe, M.C., Salgado-Negret, B.E., Celis, M., Rojas-Zamora, O., Rodríguez-M, G.M., Brokamp, G., Borsch, T., Lücking, R., Moncada, B., Martínez-Habibe, M.C., Salgado-Negret, B.E., Celis, M., Rojas-Zamora, O., Rodríguez-M, G.M., Brokamp, G., Borsch, T., 2019. Lichen diversity in Colombian Caribbean dry forest remnants. *Caldasia* 41, 194–214. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v41n1.71060>
- Manieri, E., Herrera-Melle, L., Mora, A., Tomás-Loba, A., Leiva-Vega, L., Fernández, D.I., Rodríguez, E., Morán, L., Hernández-Cosido, L., Torres, J.L., Seoane, L.M., Cubero, F.J., Marcos, M., Sabio, G., 2019. Adiponectin accounts for gender differences in hepatocellular carcinoma incidence. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.20181288>
- Marya, S.K.S., Garg, P., Gupta, A.K., Sharma, V.K., 1995. Role of Speman in Benign Prostatic Hyperplasia, *Surgical Journal of North India*.
- McEwan, I.J., Brinkmann, A.O., 2000. Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders, in: De Groot, L.J., Chrousos, G., Dungan, K., Feingold, K.R., Grossman, A., Hershman, J.M., Koch, C., Korbonits, M., McLachlan, R., New, M., Purnell, J., Rebar, R., Singer, F., Vinik, A. (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- McHenry, J., Carrier, N., Hull, E., Kabbaj, M., 2014. Sex differences in anxiety and depression: Role of testosterone. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35, 42–57. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.09.001>
- McKay, R.R., Werner, L., Fiorillo, M., Roberts, J., Heath, E.I., Bublely, G.J., Montgomery, R.B., Taplin, M.-E., 2017. Efficacy of Therapies After Galeterone in Patients With Castration-resistant Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer* 15, 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2016.10.006>
- McLaren, I.D., Jerde, T.J., Bushman, W., 2011. Role of interleukins, IGF and stem cells in BPH. *Differentiation* 82. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.06.001>
- Ministerio de Salud y Protección Social, 2012. Plan nacional para el control del cáncer en Colombia 2012 - 2020.
- Mohammadi, M., Zambare, V., Malek, L., Gottardo, C., Suntres, Z., Christopher, L., 2020. Lichenochemicals: extraction, purification, characterization, and application as

-
- potential anticancer agents. *Expert Opin Drug Discov* 15, 575–601.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1730325>
- Molano-Merchán, M.P., Valencia-Islas, N., 2013. Estudio computacional de la potencial actividad sobre el receptor de andrógenos de metabolitos secundarios de líquenes. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.
- Mun, S.-K., Kang, K.-Y., Jang, H.-Y., Hwang, Y.-H., Hong, S.-G., Kim, S.-J., Cho, H.-W., Chang, D.-J., Hur, J.-S., Yee, S.-T., 2020. Atraric Acid Exhibits Anti-Inflammatory Effect in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Cells and Mouse Models. *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21197070>
- Murata, K., Hayashi, H., Matsumura, S., Matsuda, H., 2013. Suppression of benign prostate hyperplasia by *Kaempferia parviflora* rhizome. *Pharmacognosy Res* 5, 309–314. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.118827>
- Naji, L., Randhawa, H., Sohani, Z., Dennis, B., Lautenbach, D., Kavanagh, O., Bawor, M., Banfield, L., Profetto, J., 2018. Digital Rectal Examination for Prostate Cancer Screening in Primary Care: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Fam Med* 16, 149–154. <https://doi.org/10.1370/afm.2205>
- Narayanan, R., Coss, C.C., Dalton, J.T., 2018. Development of Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs). *Mol Cell Endocrinol* 465, 134–142.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.013>
- Nash, T., 2008. Lichen Biology [WWW Document]. Cambridge Core.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511790478>
- OECD, 2009. Test No. 441: Hershberger Bioassay in Rats [WWW Document]. OECD iLibrary. URL https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-441-hershberger-bioassay-in-rats_9789264076334-en (accessed 4.22.19).
- Organización Mundial de la Salud, 1980. Histological Typing of Prostate Tumours.
- Organización Panamericana de la Salud, 2013. Cáncer en las Américas. Perfiles de País [WWW Document]. URL https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=list&layout=table&own=0&Itemid=270&lang=es (accessed 11.4.20).
- Owens William, Zeiger Errol, Walker Michael, Ashby John, Onyon Lesley, Gray L. Earl, 2006. The OECD Program to Validate the Rat Hershberger Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Androgen and Antiandrogen Responses. Phase 1: Use of a Potent Agonist and a Potent Antagonist to Test the Standardized Protocol. *Environmental Health Perspectives* 114, 1259–1265.
<https://doi.org/10.1289/ehp.8751>
- Papaioannou, M., Schleich, S., Prade, I., Degen, S., Roell, D., Schubert, U., Tanner, T., Claessens, F., Matusch, R., Baniahmad, A., 2009. The natural compound atraric acid is an antagonist of the human androgen receptor inhibiting cellular invasiveness and prostate cancer cell growth. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 2210–2223.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00426.x>
- Parasyri, A., Papazi, A., Stamatis, N., Zerveas, S., Avramidou, E.V., Doulis, A.G., Pirintsos, S., Kotzabasis, K., 2018. Lichen as Micro-Ecosystem: Extremophilic Behavior with Astrobiotechnological Applications. *Astrobiology* 18, 1528–1542.
<https://doi.org/10.1089/ast.2017.1789>
- Pejčić, T., Tosti, T., Tešić, Ž., Milković, B., Dragičević, D., Kozomara, M., Čekerevac, M., Džamić, Z., 2017. Testosterone and dihydrotestosterone levels in the transition

- zone correlate with prostate volume. *Prostate* 77, 1082–1092.
<https://doi.org/10.1002/pros.23365>
- Pennisi, E., 2016. A lichen ménage à trois [WWW Document]. *Science | AAAS*. URL <http://www.sciencemag.org/video/lichen-m-nage-trois> (accessed 11.15.17).
- Pérez Guerra, Y., Molina Cuevas, V., Oyarzábal Yera, A., Mas Ferreiro, R., 2011. Tratamiento farmacológico en la hiperplasia prostática benigna. *Revista Cubana de Farmacia* 45, 109–126.
- Perico-Franco, L.S., 2011. Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (Stereocaulaceae) y *Lobariella pallida* (Lobariaceae) y determinación de su potencial citotoxicidad (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Colombia.
- Perico-Franco, L.S., Soriano-Garcia, M., Cerbon, M.A., Gonzalez-Sanchez, I., Valencia-Islas, N.A., 2015. Secondary Metabolites and Cytotoxic Potential of *Lobariella pallida* and *Stereocaulon strictum* var. *Compressum*, Two Lichens from Colombian Paramo Region. *UK Journal of Pharmaceutical Biosciences* 3, 31.
<https://doi.org/10.20510/ukjpb/3/i4/89463>
- Polanía-Patiño, A., 2020. Determinación in vitro del efecto de algunas sustancias líquénicas seleccionadas sobre el receptor de andrógenos, la enzima 5 α -reductasa y la aromatasasa para valorarlos como posibles prototipos de fármacos para el tratamiento de desórdenes dependientes de andrógenos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.
- Poveda-Matiz, J.L., Reyes, N.J.A., Becerra, M.P.S., Almendrales, F.P.D., 2014. Evolución de la mortalidad por cáncer de próstata en Colombia: estudio ecológico. *Revista Urología Colombiana* XXIII, 3–10.
- Qian, X., Yu, G., Qian, Y., Xu, D., Liu, H., Kong, X., Zhu, Y., Wang, Z., Zheng, J., Qi, J., 2015. Efficacy of 5 α -reductase inhibitors for patients with large benign prostatic hyperplasia (>80 mL) after transurethral resection of the prostate. *Aging Male* 18, 238–243. <https://doi.org/10.3109/13685538.2015.1068750>
- Quilhot, W., Garbarino, Juan.A., Piovano, M., Chamy, M.C., Gambaro, V., Oyarzún, M.L., Vinet, C., Hormaechea, V., Friedler, 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., Horneck, G., Sancho, L.G., 2011. Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11, 281–292. <https://doi.org/10.1089/ast.2010.0588>
- Ranković, B., Kosanic, M., Crawford, S., Stanojkovic, T., Zeytinoglu, H., Odimegwu, D., Ejikeugwu, C., Esimone, C., Verma, N., Behera, B., 2015. Lichen Secondary Metabolites. *Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential.*, Ranković, B. ed. Springer.
- Rebbeck, T.R., 2017. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Semin Radiat Oncol* 27, 3–10.
<https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2016.08.002>
- Recouvreux, M.V., Wu, J.B., Gao, A.C., Zonis, S., Chesnokova, V., Bhowmick, N., Chung, L.W., Melmed, S., 2017. Androgen Receptor Regulation of Local Growth Hormone in Prostate Cancer Cells. *Endocrinology* 158, 2255–2268.
<https://doi.org/10.1210/en.2016-1939>

-
- Ricke, W.A., Macoska, J.A., Cunha, G.R., 2011. Developmental, Cellular and Molecular Biology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Differentiation* 82, 165–167. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.08.005>
- Rikkinen, J., 2007. Cyanolichens: An Evolutionary Overview. pp. 31–72. https://doi.org/10.1007/0-306-48005-0_4
- Rodriguez Socha, D.A., 2014. Síntesis y evaluación biológica *in vivo* de un nuevo análogo del androstano con actividad potencial sobre la biosíntesis y acción de andrógenos endógenos. (Tesis Maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Roehrborn, C.G., 2008. Pathology of benign prostatic hyperplasia. *International Journal of Impotence Research* 20, S11–S18. <https://doi.org/10.1038/ijir.2008.55>
- Rojas-Durán, F., Denes, J.M., Cid, A.H.S., Abreu, G.E.A., Aguilar, E.J., Ávila, G.A.C., Cárdenas, R.T., Espinoza, J.L., Hernández, M.E., 2011. El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática. *eNeurobiología* 2, 1–15.
- Rove, K.O., Crawford, E.D., 2014. Traditional androgen ablation approaches to advanced prostate cancer: new insights. *Can J Urol* 21, 14–21.
- Roved, J., Westerdahl, H., Hasselquist, D., 2017. Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. *Hormones and Behavior, Neuroendocrine-Immune Interactions: Implications for Integrative and Comparative Physiologists* 88, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.017>
- Russo, A., Caggia, S., Piovano, M., Garbarino, J., Cardile, V., 2012. Effect of vicanicin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: role of Hsp70 protein. *Chem. Biol. Interact.* 195, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.10.005>
- Russo, A., Piovano, M., Lombardo, L., Vanella, L., Cardile, V., Garbarino, J., 2006. Pannarin inhibits cell growth and induces cell death in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Anticancer Drugs* 17, 1163–1169. <https://doi.org/10.1097/01.cad.0000236310.66080.ed>
- Sakhri, S., Gooren, L.J., 2007. Safety aspects of androgen treatment with 5alpha-dihydrotestosterone. *Andrologia* 39, 216–222. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2007.00786.x>
- Salciccia, S., Gentilucci, A., Cattarino, S., Sciarra, A., 2016. GnRH-agonist or antagonist in the treatment of prostate cancer: a comparison based on oncological results. *Urologia* 83, 173–178. <https://doi.org/10.5301/uro.5000194>
- Santana, L., Wong, H., 2004. Criterios actuales para evaluar la conducta a seguir con los pacientes que padecen de hiperplasia prostática benigna. *Revista Cubana de Cirugía* 43, 0–0.
- Sarma, A.V., Wei, J.T., 2012. Clinical practice. Benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms. *N. Engl. J. Med.* 367, 248–257. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1106637>
- Schalken, J., Fitzpatrick, J.M., 2016. Enzalutamide: targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int.* 117, 215–225. <https://doi.org/10.1111/bju.13123>
- Schiffer, L., Arlt, W., Storbeck, K.-H., 2018. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology, Androgens – revisiting their role as pleiotropic regulators of tissue function beyond the male reproductive system* 465, 4–26. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.08.016>

- Shtivelman, E., Beer, T.M., Evans, C.P., 2014. Molecular pathways and targets in prostate cancer. *Oncotarget* 5, 7217–7259.
- Sociedad Colombiana de Urología, 2014. Guía de manejo hiperplasia prostática benigna.
- Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M.C., Schneider, K., Stabentheiner, E., Toome-Heller, M., Thor, G., Mayrhofer, H., Johannesson, H., McCutcheon, J.P., 2016. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science* 353, 488–492. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8287>
- Stein, M.N., Patel, N., Bershadskiy, A., Sokoloff, A., Singer, E.A., 2014. Androgen synthesis inhibitors in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Asian J. Androl.* 16, 387–400. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.129133>
- Sternberg, C.N., Petrylak, D.P., Madan, R.A., Parker, C., 2014. Progress in the treatment of advanced prostate cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 117–131. https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2014.34.117
- Swerdloff, R.S., Dudley, R.E., Page, S.T., Wang, C., Salameh, W.A., 2017. Dihydrotestosterone: Biochemistry, Physiology, and Clinical Implications of Elevated Blood Levels. *Endocr. Rev.* 38, 220–254. <https://doi.org/10.1210/er.2016-1067>
- Tan, M.E., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K., Yong, E., 2015. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 36, 3–23. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>
- Timm, G.E., 2008. Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.
- Trapani, G., Dazzi, L., Pisu, M.G., Reho, A., Seu, E., Biggio, G., 2002. A rapid method for obtaining finasteride, a 5 α -reductase inhibitor, from commercial tablets. *Brain Research Protocols* 9, 130–134. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(02\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(02)00146-0)
- Uemura, M., Tamura, K., Chung, S., Honma, S., Okuyama, A., Nakamura, Y., Nakagawa, H., 2007. Novel 5 alpha-steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci.* 99, 81–86. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00656.x>
- Vaillant, D., 2014. Los líquenes, una alternativa para el control de fitopatógenos. *Fitosanidad* 18, 51–57.
- Valencia-Islas, N., Zambrano, A., Rojas, J.L., 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, 1619–1634. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9330-1>
- Vickman, R.E., Franco, O.E., Moline, D.C., Vander Griend, D.J., Thumbikat, P., Hayward, S.W., 2020. The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. *Asian J Urol* 7, 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2019.10.003>
- Walters, K.A., Handelsman, D.J., 2018. Role of androgens in the ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology, Androgens – revisiting their role as pleiotropic regulators of tissue function beyond the male reproductive system* 465, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.026>
- Wang, G., Zhao, D., Spring, D.J., DePinho, R.A., 2018. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev* 32, 1105–1140. <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>

-
- Wang, K., Fan, D.-D., Jin, S., Xing, N.-Z., Niu, Y.-N., 2014. Differential expression of 5-alpha reductase isozymes in the prostate and its clinical implications. *Asian J. Androl.* 16, 274–279. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.123664>
- Wang, Z.A., Toivanen, R., Bergren, S.K., Chambon, P., Shen, M.M., 2014. Luminal cells are favored as the cell of origin for prostate cancer. *Cell Rep* 8, 1339–1346. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.002>
- Yang, Y.C., Banuelos, C.A., Mawji, N.R., Wang, J., Kato, M., Haile, S., McEwan, I.J., Plymate, S., Sadar, M.D., 2016. Targeting Androgen Receptor Activation Function-1 with EPI to Overcome Resistance Mechanisms in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* 22, 4466–4477. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2901>
- Yu, Z., Cai, C., Gao, S., Simon, N.I., Shen, H.C., Balk, S.P., 2014. Galeterone prevents androgen receptor binding to chromatin and enhances degradation of mutant androgen receptor. *Clin. Cancer Res.* 20, 4075–4085. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0292>

Anexo A: Aval del Comité de ética de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia



COMITÉ DE ÉTICA FACULTAD DE CIENCIAS

Bogotá, febrero 05 de 2018

Profesora
Norma Angélica Valencia Islas
Departamento de Farmacia

Respetada Profesora:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 05 de febrero de 2018 (Acta 02-2018), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

P8: Proyecto / Investigadores – Grupos – Dependencias / Observaciones.

Proyecto: Determinación de la actividad *in vivo* sobre la biosíntesis y actividad de andrógenos endógenos de sustancias líquénicas seleccionadas.

Responsables: **Norma Angélica Valencia Islas** (Investigadora Principal, Grupo de Investigación en Química Medicinal, COL0055503) y Johan Arturo López Ladino (Tesisista de Maestría en Ciencias – Farmacología).

Observaciones:

Tipo de estudio. Evaluación *in vivo* / *in vitro* de la actividad antiandrogénica de principios bioactivos vegetales.

Material vegetal. Fracciones enriquecidas ya han sido obtenidas previamente por los grupos de investigación (Grupo de Investigación en Química Medicinal y Grupo Estudios Biológicos y Físicoquímicos de Líquenes Colombianos).

Modelos animales. Ensayo de Hershberger en ratas, validado por la OECD para evaluar sustancias con potencial actividad antiandrogénica. Ratas Wistar, machos adultos jóvenes, procedentes del Bioterio de Experimentación del Departamento de Farmacia.

Los principales **aspectos éticos, legales y ambientales** a tener en cuenta por los investigadores están relacionados con:

1. **Guías y pautas normativas.** Colecta del material líquénico proveniente del Parque Natural de Sumapaz. Contrato Marco de acceso a recursos genéticos y productos derivados No. 121 del 21 de enero de 2016 suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Nacional de Colombia.
2. **Protocolos de cuidado y uso de animales de laboratorio.** Los procedimientos experimentales en el modelo animal se harán por personal debidamente entrenado. Los procedimientos quirúrgicos en ratas incluyendo la utilización de anestesia balanceada, cuidados postquirúrgicos y utilización de eutanasia bajo agentes sedantes reconocidos. Se tendrán en cuenta aspectos de la Resolución 008430 de 1993 del MSP (Título V: la investigación biomédica con animales).



COMITÉ DE ÉTICA FACULTAD DE CIENCIAS

3. **Protocolos de bioseguridad.** Manejo adecuado del riesgo mediante protocolos institucionales de gestión ambiental que incluyan disposición de residuos químicos y biológicos.
4. Protección de los desarrollos y cumplimiento de normativas sobre **propiedad intelectual.** Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia.

Concepto: Proyecto Avalado.

LUIS FERNANDO OSPINA GIRALDO
Coordinador Comité de Ética

Anexo B: Espectros

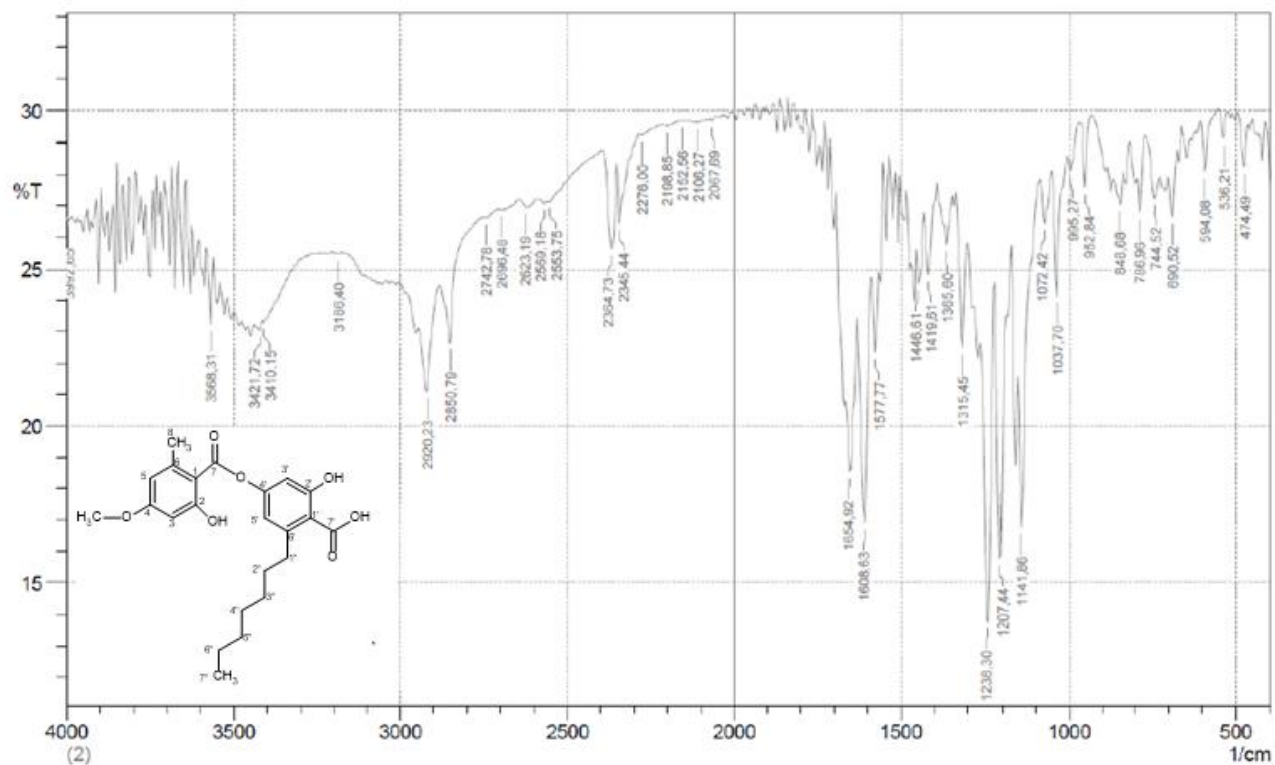


Figura 21. Espectro de Infrarrojo de la esferoforina (KBr).

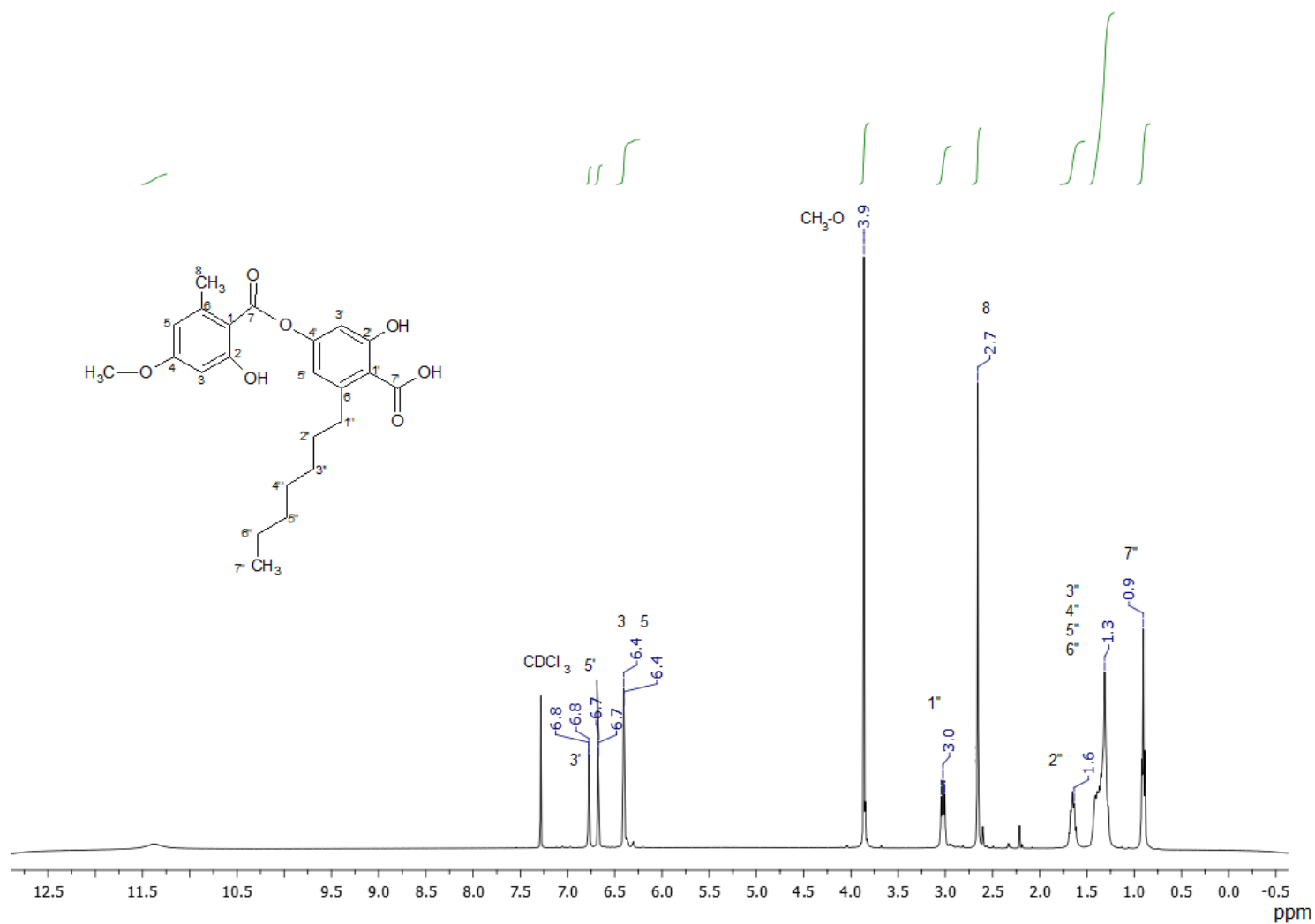


Figura 22. Resonancia Magnética Nuclear de ^1H de la esferoforina (400 MHz (CDCl_3)).

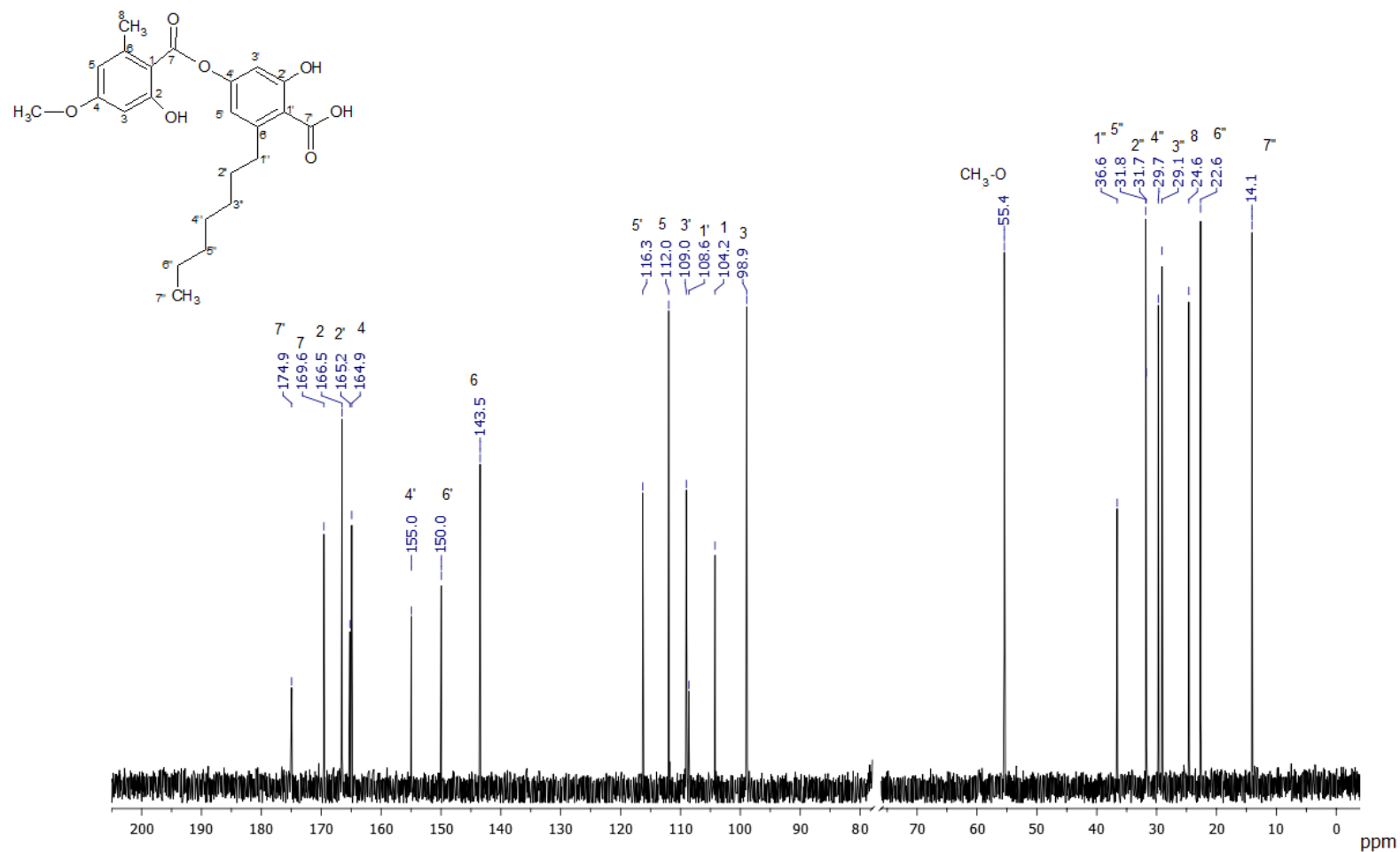


Figura 23. Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C de la esferoforina (101 MHz (CDCl₃)).

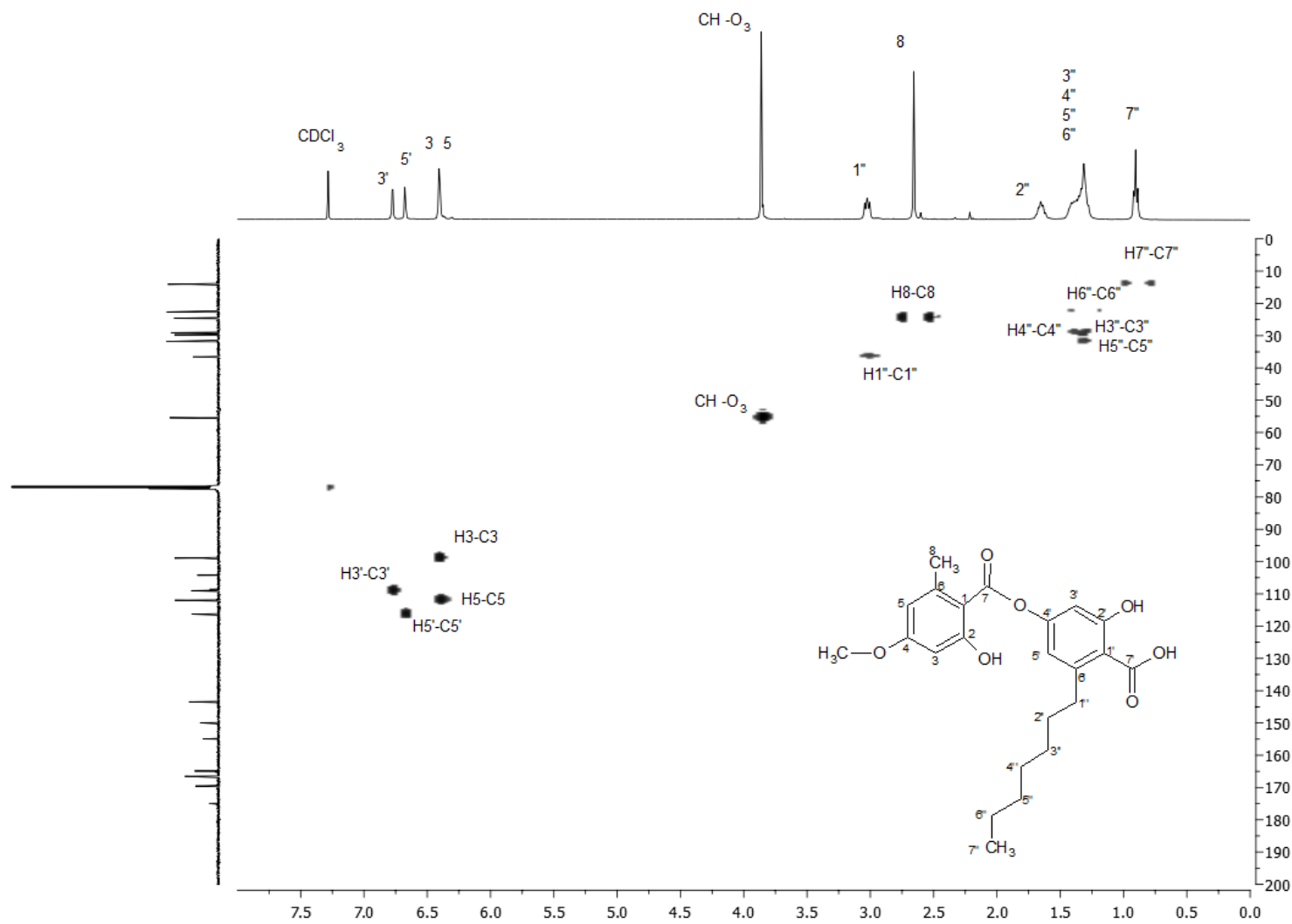


Figura 24. Espectro HMQC de la esferoforina (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 101 MHz (CDCl_3)).

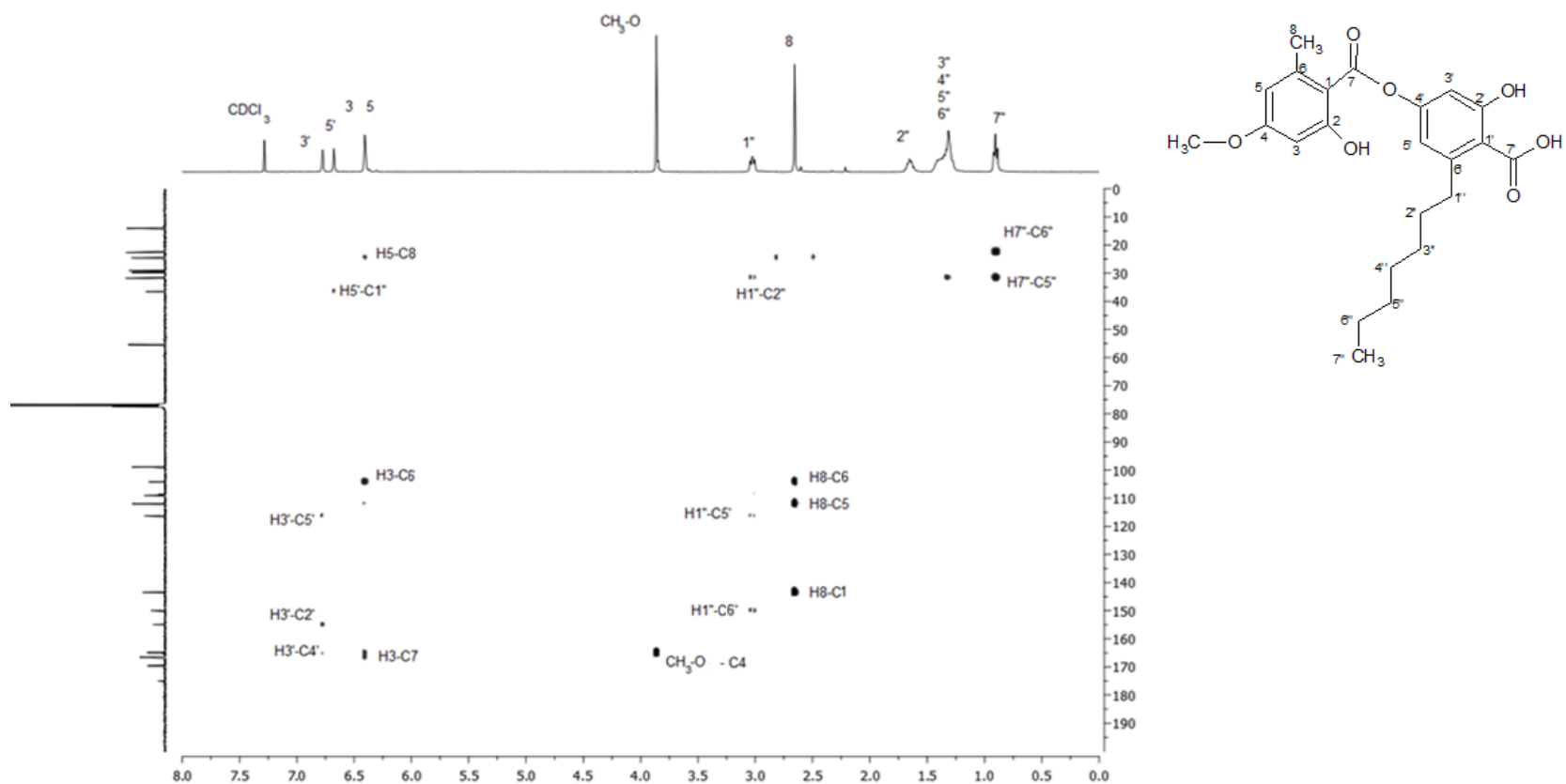


Figura 25. Espectro HMBC de la esferoforina (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 101 MHz (CDCl_3)).

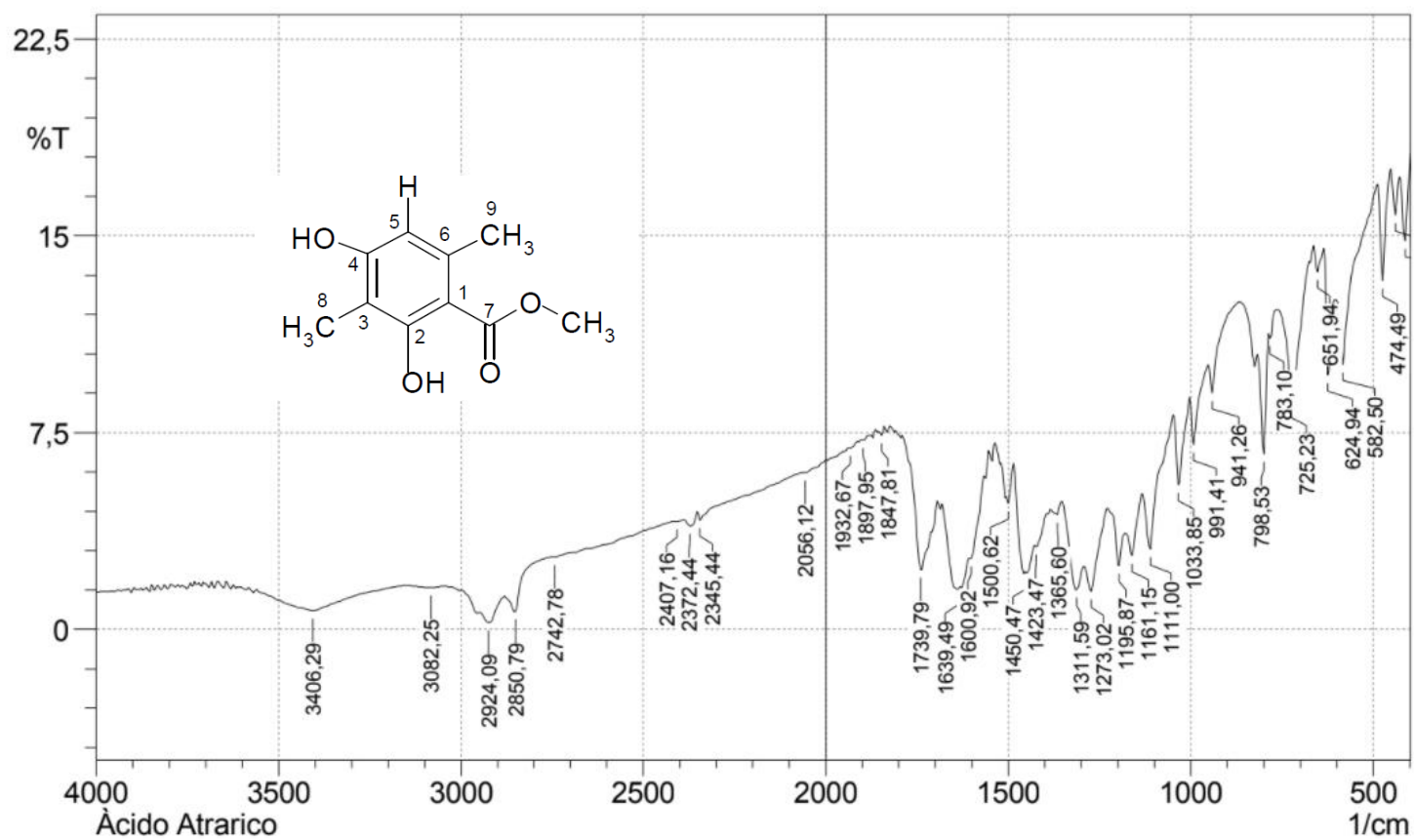


Figura 26. Espectro de Infrarrojo del ácido atrárico (KBr).

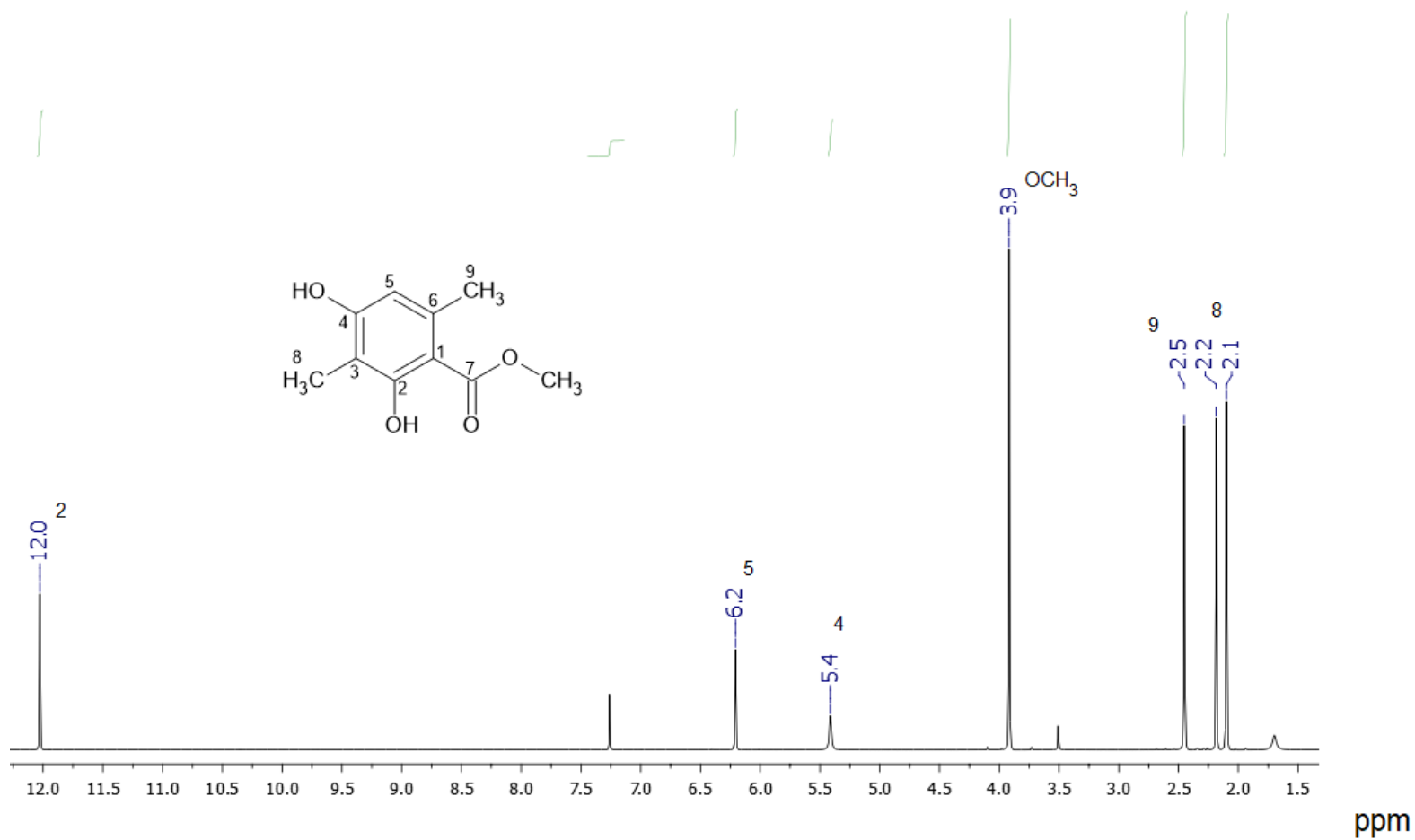


Figura 27. Resonancia Magnética Nuclear de ¹H del ácido atrárico (400 MHz (CDCl₃)).

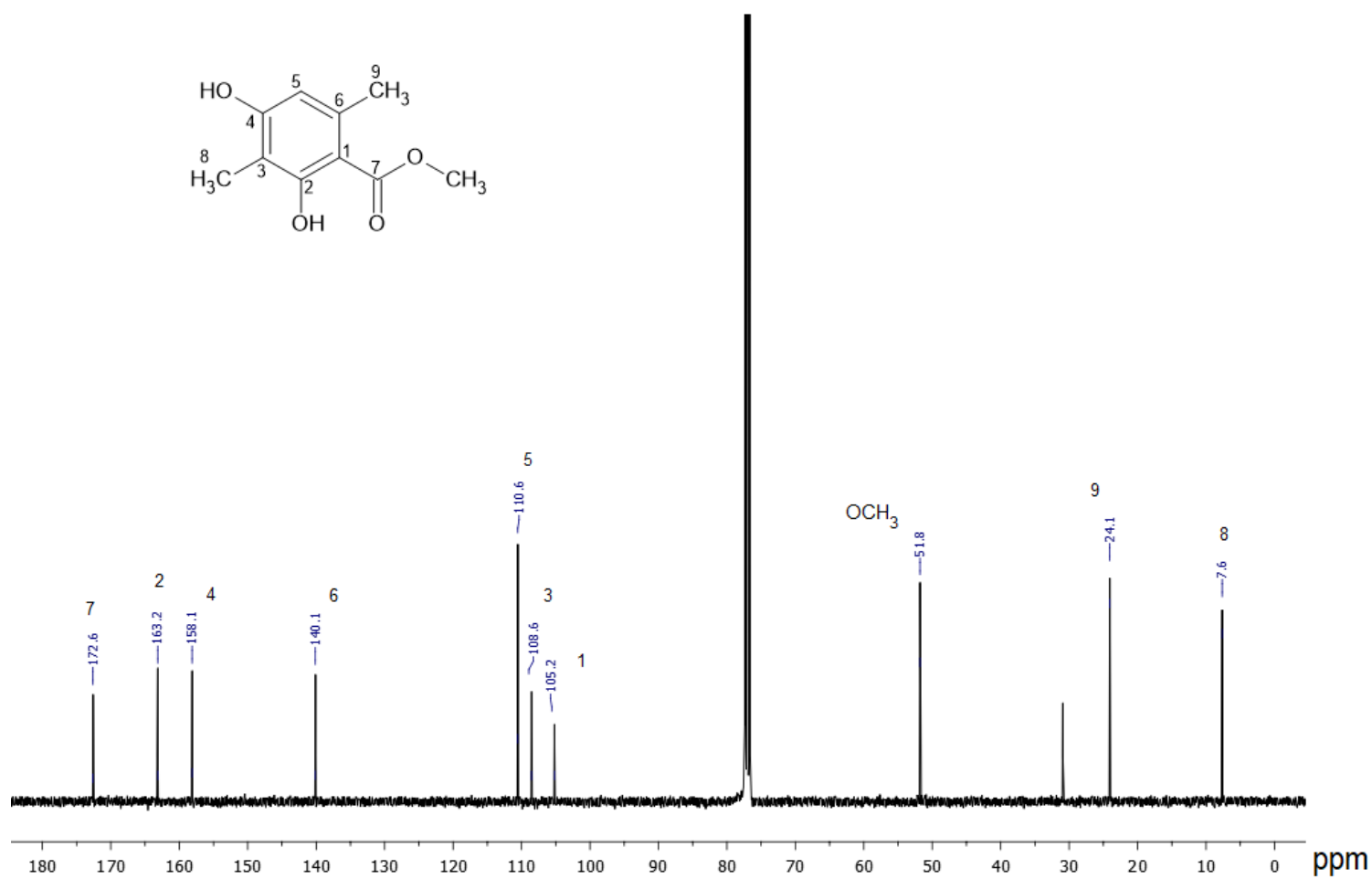


Figura 28. Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del ácido atrónico (101 MHz (CDCl_3)).

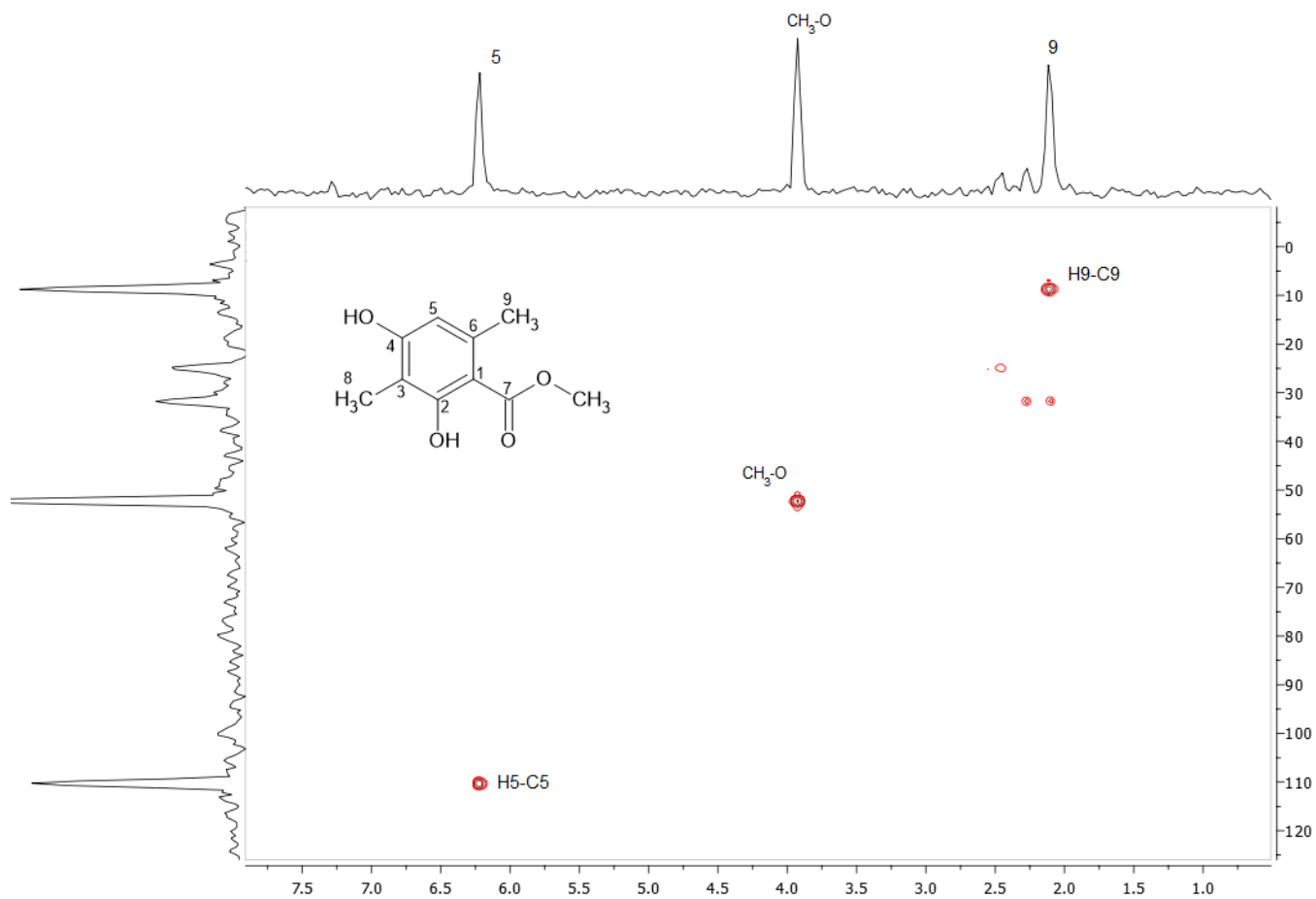


Figura 29. Espectro HMBC del ácido atrónico (^1H a 400 MHz y ^{13}C a 101 MHz (CDCl_3)).

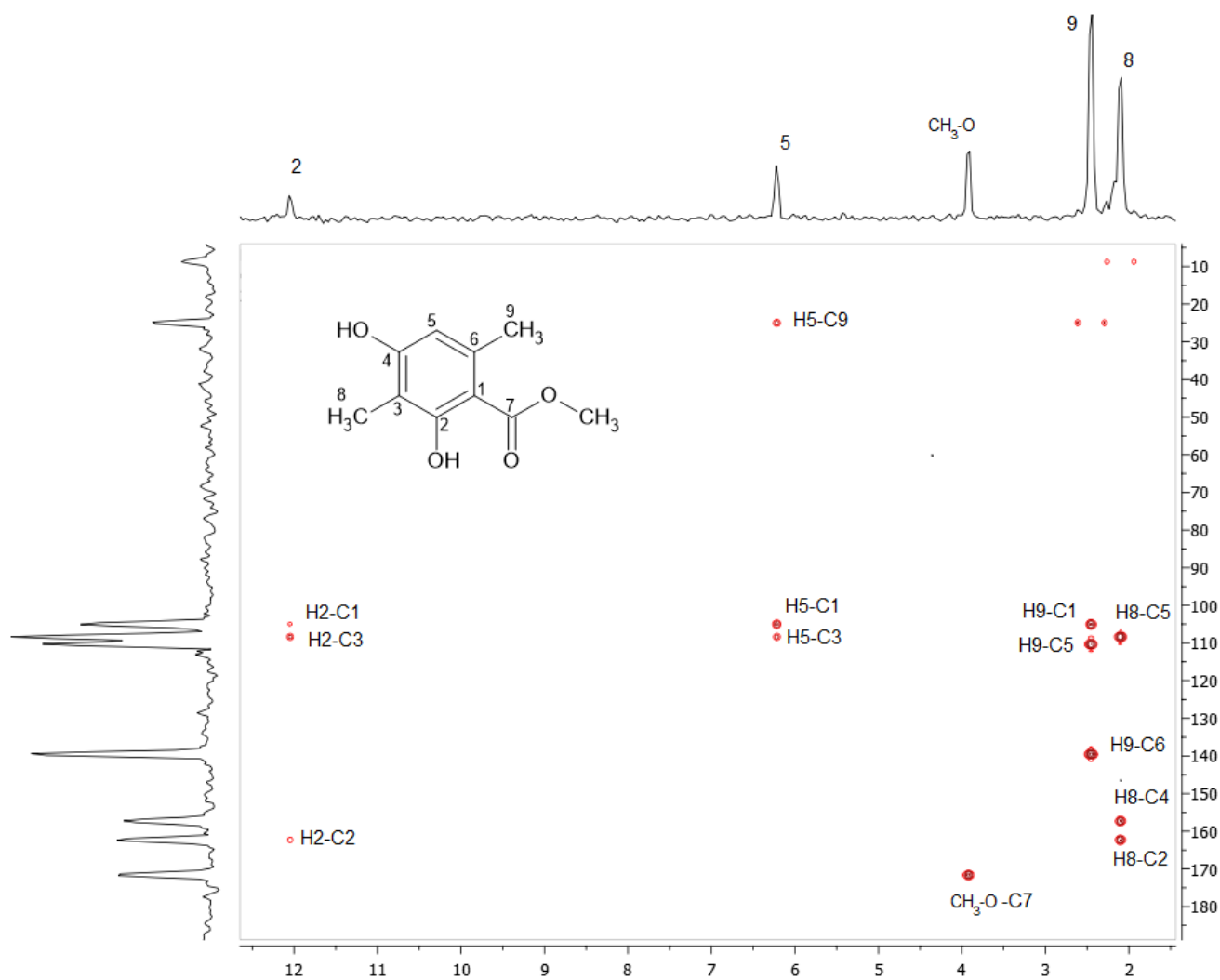


Figura 30. Espectro HMBC del ácido atrárico (¹H a 400 MHz y ¹³C a 101 MHz (CDCl₃)).

Anexo C: Coeficientes de variación de los índices de los órganos

Coeficientes de variación de los índices de los órganos						
Órgano	Máximo referencia	Aceite vegetal	Testosterona	Esferoforina	Ácido atrárico	Finasterida
Próstata	40	30.0	26.0	24.0	19.2	12.7
Vesículas seminales	40	28.2	14.2	10.3	22.3	20.1
Músculo Bulbocavernoso	20	18.1	12.1	12.0	20.1	17.1
Glándulas de Cowper	35	23.1	18.4	15.4	22.3	11.8
Glande	17	17.6	13.7	11.7	23.1	14.9
Riñones	-	4.9	5.5	4.9	13.1	4.5
Glándulas suprarrenales	-	36.7	34.8	24.9	41.9	35.6
Hígado	-	7.2	8.0	10.8	11.1	9.7

Anexo D: Test de Shapiro-Wilk

- Próstata

	<i>T</i>	<i>AV</i>	<i>F</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
estadístico	0.92263771	0.99484629	0.8556309	0.91443537	0.87365371
p-valor	0.4901626	0.99361251	0.13828428	0.42743595	0.19973522
alfa	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
normalidad	sí	sí	sí	sí	sí

- Vesículas seminales

	<i>T</i>	<i>AV</i>	<i>F</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
estadístico	0.92392147	0.89578654	0.90844501	0.95617213	0.87263113
p-valor	0.50046818	0.3870378	0.38521168	0.78530124	0.23689577
alfa	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
normalidad	sí	sí	sí	sí	sí

- Músculo bulbocavernoso

	<i>T</i>	<i>AV</i>	<i>F</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
estadístico	0.90629781	0.97778538	0.91221581	0.92291582	0.91316102
p-valor	0.41249156	0.92243893	0.41142981	0.49238444	0.41819448
alfa	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
normalidad	sí	sí	sí	sí	sí

- Glándulas de Cowper

	<i>T</i>	<i>AV</i>	<i>F</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
estadístico	0.84114457	0.93924937	0.83972118	0.95522519	0.96312798
p-valor	0.13323851	0.64975475	0.09876512	0.77687699	0.8450798
alfa	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
normalidad	sí	sí	sí	sí	sí

- Glante

	<i>T</i>	<i>AV</i>	<i>F</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
estadístico	0.94014795	0.98059421	0.90013308	0.98727913	0.91973357
p-valor	0.64005291	0.95447297	0.33178783	0.98706627	0.46732512
Alfa	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
normalidad	sí	sí	sí	sí	sí

- Riñones

	<i>T</i>	<i>AV</i>	<i>F</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
estadístico	0.96014021	0.89679633	0.97806903	0.90045457	0.90731068
p-valor	0.81993662	0.35533981	0.94965177	0.33374272	0.37756653
alfa	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
normalidad	sí	sí	sí	sí	sí

- Glándulas suprarrenales

	<i>T</i>	<i>AV</i>	<i>F</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
estadístico	0.84501954	0.93494416	0.92403066	0.84012565	0.95152175
p-valor	0.11060534	0.61878631	0.50135048	0.0996263	0.7435297
alfa	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
normalidad	sí	sí	sí	sí	sí

- Hígado

	<i>T</i>	<i>AV</i>	<i>F</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
estadístico	0.92525605	0.96275698	0.90450631	0.93537778	0.9731952
p-valor	0.51131399	0.84071639	0.35914704	0.5975037	0.92046601
alfa	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
normalidad	sí	sí	sí	sí	sí

Anexo E: Análisis de varianza (ANOVA)

- Próstata

RESUMEN					Alfa	0.05		
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Suma cuadrados	Error estándar	Inferior	Superior
T	7	0.9479	0.1354	0.0012	0.0075	0.0100	0.1150	0.1559
AV	5	0.2680	0.0536	0.0003	0.0010	0.0118	0.0294	0.0778
F	7	0.4699	0.0671	0.0001	0.0004	0.0100	0.0467	0.0876
1	7	1.0059	0.1437	0.0012	0.0071	0.0100	0.1232	0.1641
2	7	0.8743	0.1249	0.0006	0.0035	0.0100	0.1044	0.1453

ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor	
Entre grupos	0.04266689	4	0.0107	15.2912	9.6154E-07	
Dentro de los grupos	0.01953207	28	0.0007			
Total	0.06219896	32	0.0019			

- Vesículas seminales

RESUMEN		Alfa 0.05						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Suma cuadrados	Error estándar	Inferior	Superior
T	7	0.8938	0.1277	0.0003	0.0020	0.0063	0.1148	0.1405
AV	5	0.1354	0.0271	0.0001	0.0002	0.0074	0.0119	0.0423
F	7	0.3995	0.0571	0.0001	0.0008	0.0063	0.0442	0.0699
1	7	0.8362	0.1195	0.0002	0.0009	0.0063	0.1066	0.1323
2	6	0.7132	0.1189	0.0007	0.0035	0.0068	0.1050	0.1327

ANOVA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Entre grupos	0.04809815	4	0.01202	43.83888	1.9707E-11
Dentro de los grupos	0.00740581	27	0.00027		
Total	0.05550396	31	0.00179		

- Músculo bulbocavernoso

RESUMEN					Alfa	0.05			
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Suma cuadrados	Error estándar	Inferior	Superior	
T	6	1.6130	0.2688	0.0011	0.0053	0.0125	0.2431	0.2946	
AV	5	0.5149	0.1030	0.0003	0.0014	0.0137	0.0748	0.1311	
F	7	1.8962	0.2709	0.0021	0.0128	0.0116	0.2471	0.2947	
1	7	1.6878	0.2411	0.0008	0.0050	0.0116	0.2173	0.2649	
2	7	1.5362	0.2195	0.0002	0.0010	0.0116	0.1956	0.2433	

ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor	
Entre grupos	0.10267999	4	0.02567	27.23065	3.9494E-09	
Dentro de los grupos	0.02545256	27	0.00094			
Total	0.12813255	31	0.00413			

- Glándulas de Cowper

RESUMEN		Alfa 0.05						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Suma cuadrados	Error estándar	Inferior	Superior
T	6	0.1310	0.0218	1.6095E-05	8.0474E-05	0.0015	0.0188	0.0248
AV	4	0.0222	0.0056	1.6459E-06	4.9378E-06	0.0018	0.0019	0.0092
F	7	0.1448	0.0207	5.9171E-06	3.5502E-05	0.0014	0.0179	0.0235
1	7	0.1522	0.0217	1.1179E-05	6.7074E-05	0.0014	0.0190	0.0245
2	7	0.1549	0.0221	2.4414E-05	1.4648E-04	0.0014	0.0193	0.0249

ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor	
Entre grupos	0.0009038	4	0.00023	17.56414	4.2734E-07	
Dentro de los grupos	0.00033447	26	0.00001			
Total	0.00123827	30	0.00004			

- Glante

RESUMEN		Alfa 0.05						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Suma cuadrados	Error estándar	Inferior	Superior
T	7	0.2184	0.0312	1.8183E-05	0.0001	0.0017	0.0276	0.0348
AV	6	0.1190	0.0198	1.2258E-05	0.0001	0.0019	0.0160	0.0237
F	7	0.1730	0.0247	1.3489E-05	0.0001	0.0017	0.0212	0.0283
1	7	0.2007	0.0287	1.1217E-05	0.0001	0.0017	0.0251	0.0322
2	7	0.2128	0.0304	4.9209E-05	0.0003	0.0017	0.0268	0.0340

ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor	
Entre grupos	0.00056775	4	0.00014	6.70528	5.9908E-04	
Dentro de los grupos	0.00061387	29	0.00002			
Total	0.00118162	33	0.00004			

- Riñones

RESUMEN		Alfa 0.05						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Suma cuadrados	Error estándar	Inferior	Superior
T	7	4.8082	0.6869	0.0014	0.0085	0.0147	0.6568	0.7170
AV	6	3.7887	0.6314	0.0010	0.0048	0.0159	0.5990	0.6639
F	7	4.6206	0.6601	0.0009	0.0052	0.0147	0.6300	0.6902
1	7	4.7152	0.6736	0.0011	0.0065	0.0147	0.6435	0.7037
2	7	4.6681	0.6669	0.0032	0.0189	0.0147	0.6368	0.6969

ANOVA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor
Entre grupos	0.01081496	4	0.00270	1.78697	1.5848
Dentro de los grupos	0.04387788	29	0.00151		
Total	0.05469284	33	0.00166		

- Glándulas suprarrenales:

RESUMEN		Alfa 0.05						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Suma cuadrados	Error estándar	Inferior	Superior
T	7	0.1229	0.0176	3.7245E-05	2.2347E-04	0.0019	0.0137	0.0214
AV	6	0.0992	0.0165	3.6803E-05	1.8401E-04	0.0020	0.0124	0.0207
F	7	0.1040	0.0149	2.7882E-05	1.6729E-04	0.0019	0.0110	0.0187
1	7	0.1255	0.0179	1.9990E-05	1.1994E-04	0.0019	0.0141	0.0218
2	7	0.0904	0.0129	4.3070E-06	2.5842E-05	0.0019	0.0091	0.0168

ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor	
Entre grupos	0.00012063	4	0.00003	1.21370	3.2638	
Dentro de los grupos	0.00072056	29	0.00002			
Total	0.00084118	33	0.00003			

- Hígado

RESUMEN		Alfa 0.05						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Suma cuadrados	Error estándar	Inferior	Superior
T	7	32.5199	4.6457	0.1366	0.8194	0.1643	4.3096	4.9818
AV	6	25.5537	4.2590	0.0942	0.4710	0.1775	3.8959	4.6220
F	7	33.2951	4.7564	0.2132	1.2793	0.1643	4.4203	5.0926
1	7	31.3001	4.4714	0.2315	1.3892	0.1643	4.1353	4.8076
2	7	31.8442	4.5492	0.2540	1.5241	0.1643	4.2130	4.8853

ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p-valor	
Entre grupos	0.91285781	4	0.22821	1.20702	3.2909	
Dentro de los grupos	5.48311359	29	0.18907			
Total	6.3959714	33	0.19382			

Anexo F: Prueba de Tukey

- Próstata

Prueba de Tukey		alfa		0.05	
<i>Grupo</i>	<i>Promedio</i>	<i>n</i>	<i>Suma cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>q-crit</i>
T	0.13541	7	0.00745551		
AV	0.05360	5	0.00103765		
F	0.06712	7	0.00043278		
1	0.14369	7	0.00714801		
2	0.12489	7	0.00345812		
		33	0.01953207	28	4.12

<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Promedio</i>	<i>Error estándar</i>	<i>q-stat</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	<i>p-valor</i>
T	AV	0.0818	0.0109	7.4807	0.0368	0.1269	1.150E-04
T	F	0.0683	0.0100	6.8407	0.0272	0.1094	3.886E-04
T	1	0.0083	0.0100	0.8299	-0.0328	0.0494	0.9760
T	2	0.0105	0.0100	1.0534	-0.0306	0.0516	0.9439
AV	F	0.0135	0.0109	1.2361	-0.0315	0.0586	0.9040
AV	1	0.0901	0.0109	8.2383	0.0450	0.1351	2.728E-05
AV	2	0.0713	0.0109	6.5191	0.0262	0.1163	7.141E-04
F	1	0.0766	0.0100	7.6705	0.0354	0.1177	8.015E-05
F	2	0.0578	0.0100	5.7873	0.0166	0.0989	2.800E-03
1	2	0.0188	0.0100	1.8833	-0.0223	0.0599	0.6744

- Vesículas seminales

Prueba de Tukey			alfa 0.05		
Grupo	Promedio	n	Suma cuadrados	Grados de libertad	q-crit
T	0.12769	7	0.00196019		
AV	0.02708	5	0.00023354		
F	0.05707	7	0.00078661		
1	0.11945	7	0.0009028		
2	0.11886	6	0.00352268		
		32	0.00740581	27	4.13

Grupo 1	Grupo 2	Promedio	Error estándar	q-stat	Inferior	Superior	p-valor
T	AV	0.1006	0.0069	14.6722	0.0723	0.1289	6.226E-10
T	F	0.0706	0.0063	11.2817	0.0448	0.0965	1.362E-07
T	1	0.0082	0.0063	1.3163	-0.0176	0.0341	0.8824
T	2	0.0088	0.0065	1.3551	-0.0181	0.0357	0.8712
AV	F	0.0300	0.0069	4.3734	0.0017	0.0583	3.400E-02
AV	1	0.0924	0.0069	13.4706	0.0641	0.1207	3.862E-09
AV	2	0.0918	0.0071	12.9428	0.0625	0.1211	8.863E-09
F	1	0.0624	0.0063	9.9654	0.0365	0.0882	1.343E-06
F	2	0.0618	0.0065	9.4841	0.0349	0.0887	3.179E-06
1	2	0.0006	0.0065	0.0904	-0.0263	0.0275	1.0000

- Músculo bulbocavernoso

Prueba de Tukey			alfa	0.05	
<i>Grupo</i>	<i>Promedio</i>	<i>n</i>	<i>Suma cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>q-crit</i>
T	0.26883	6	0.0052893		
AV	0.10297	5	0.00138773		
F	0.27089	7	0.01281334		
1	0.24111	7	0.00498278		
2	0.21946	7	0.00097941		
		32	0.02545256	27	4.13

<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Promedio</i>	<i>Error estándar</i>	<i>q-stat</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	<i>p-valor</i>
T	AV	0.1659	0.0131	12.6164	0.1116	0.2202	1.495E-08
T	F	0.0021	0.0121	0.1702	-0.0478	0.0519	0.9999
T	1	0.0277	0.0121	2.2954	-0.0222	0.0776	0.4962
T	2	0.0494	0.0121	4.0877	-0.0005	0.0993	0.0534
AV	F	0.1679	0.0127	13.2089	0.1154	0.2204	5.818E-09
AV	1	0.1381	0.0127	10.8662	0.0856	0.1906	2.773E-07
AV	2	0.1165	0.0127	9.1632	0.0640	0.1690	5.684E-06
F	1	0.0298	0.0116	2.5663	-0.0181	0.0777	0.3862
F	2	0.0514	0.0116	4.4318	0.0035	0.0994	0.0309
1	2	0.0216	0.0116	1.8655	-0.0263	0.0696	0.6820

- Glándulas de Cowper

Prueba de Tukey		alfa		0.05	
Grupo	Promedio	n	Suma cuadrados	Grados de libertad	q-crit
T	0.02183	6	8.0474E-05		
AV	0.00556	4	4.9378E-06		
F	0.02068	7	3.5502E-05		
1	0.02175	7	6.7074E-05		
2	0.02212	7	0.00014648		
		31	0.00033447	26	4.141

Grupo 1	Grupo 2	Promedio	Error estándar	q-stat	Inferior	Superior	p-valor
T	AV	0.0163	0.0016	9.9409	0.0095	0.0231	1.728E-06
T	F	0.0011	0.0014	0.8119	-0.0047	0.0070	0.9777
T	1	0.0001	0.0014	0.0567	-0.0058	0.0059	1.0000
T	2	0.0003	0.0014	0.2090	-0.0055	0.0061	0.9999
AV	F	0.0151	0.0016	9.5171	0.0085	0.0217	3.623E-06
AV	1	0.0162	0.0016	10.1873	0.0096	0.0228	1.129E-06
AV	2	0.0166	0.0016	10.4232	0.0100	0.0232	7.535E-07
F	1	0.0011	0.0014	0.7860	-0.0045	0.0067	0.9802
F	2	0.0014	0.0014	1.0625	-0.0042	0.0071	0.9420
1	2	0.0004	0.0014	0.2765	-0.0052	0.0060	0.9997

- Glande

Prueba de Tukey		alfa		0.05	
<i>Grupo</i>	<i>Promedio</i>	<i>n</i>	<i>Suma cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>q-crit</i>
T	0.03120	7	0.0001091		
AV	0.01984	6	6.1288E-05		
F	0.02471	7	8.0931E-05		
1	0.02867	7	6.73E-05		
2	0.03040	7	0.00029525		
		34	0.00061387	29	4.111

<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Promedio</i>	<i>Error estándar</i>	<i>q-stat</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	<i>p-valor</i>
T	AV	0.0114	0.0018	6.2791	0.0039	0.0188	1.055E-03
T	F	0.0065	0.0017	3.7350	-0.0007	0.0136	0.0888
T	1	0.0025	0.0017	1.4563	-0.0046	0.0097	0.8395
T	2	0.0008	0.0017	0.4603	-0.0063	0.0079	0.9974
AV	F	0.0049	0.0018	2.6907	-0.0026	0.0123	0.3386
AV	1	0.0088	0.0018	4.8800	0.0014	0.0163	1.383E-02
AV	2	0.0106	0.0018	5.8369	0.0031	0.0180	2.433E-03
F	1	0.0040	0.0017	2.2787	-0.0032	0.0111	0.5024
F	2	0.0057	0.0017	3.2747	-0.0015	0.0128	0.1689
1	2	0.0017	0.0017	0.9960	-0.0054	0.0089	0.9539