

Carina Martins Gomes

Esteróides com atividade antitumoral

Tumores hormono-dependentes: mama e prostate

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



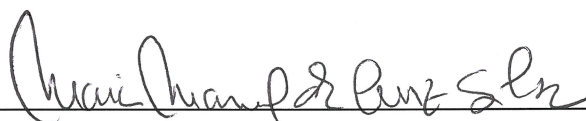
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Carina Martins Gomes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009027411, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da monografia Estágio apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Julho de 2014.

(Carina Martins Gomes)

A Tutora

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and reads "Maria Manuel Cruz Silva".

(Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva)

A Aluna

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and reads "Carina Martins Gomes".

(Carina Martins Gomes)

Agradecimentos

Um grande obrigado à Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva, por toda a atenção, paciência e disponibilidade que teve para comigo durante a realização desta monografia.

Aos meus pais e irmãos, por toda a força e apoio dado em cada momento, independentemente da distância que nos separa, um infinito obrigado.

Índice

Abreviaturas.....	2
Resumo	3
Abstract	3
Introdução.....	4
Alvos terapêuticos e respectivas abordagens terapêuticas	5
I. 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD)	5
a. 17 β -HSD 1	5
b. 17 β -HSD 3	6
c. 17 β -HSD 5	6
II. Inibidores esteróides da 17 β -HSD	6
a. Derivados E1 e E2 substituídos em C16.....	6
b. Derivados E1 substituídos em C15.....	7
c. Derivados da estrona substituídos em C2	8
d. Novas moléculas.....	8
III. Sulfatase de esteróides (STS).....	9
IV. Inibidores da STS.....	11
a. Inibidores esteróides baseados no sulfamato	12
b. Inibidores esteróides não baseados no sulfamato	13
V. Aromatase.....	14
VI. Inibidores da Aromatase (AI)	15
VII. Anti-estrogénios.....	16
VIII. 5 α redutase.....	17
IX. Inibidores da 5 α -redutase.....	18
X. Uso de esteróides como agentes transportadores de citotóxicos.....	21
XI. Conclusão	22
Referências	23

Abreviaturas

17 β -HSD – 17beta-dihidroxiesteróide desidrogenase

5 α -R – 5alfa redutase

AI – Inibidor da aromatase

BC – Cancro da mama

BPH – Hiperplasia benigna da próstata

DHEA – dihidroepiandrosterona

DHT – di-hidrotestosterona

E1 – Estrona

E1S – Sulfato de estrona

E2 – Estradiol

ER – Recetor de estrogénios

PC – Cancro da próstata

STS – Sulfatase de esteróides

T – Testosterona

Resumo

Os esteróides, pela sua bioatividade, estrutura e excelente capacidade de penetração na membrana celular e de ligação a recetores nucleares e de membrana, têm sido alvo de pesquisa para o desenvolvimento de fármacos.

O crescimento e a proliferação celular em cancros hormono-dependentes, como o da mama e da próstata, são regulados pela ação de hormonas estrogénicas e androgénicas. Estas hormonas encontram-se sobre-expressas nestas situações, por isso a diminuição da sua concentração no organismo humano leva ao controlo da proliferação das células malignas. Por este motivo têm sido investigadas diversas abordagens terapêuticas, como a inibição de enzimas-chave da biossíntese destas hormonas.

Nesta monografia, é feita uma revisão da literatura recente no que concerne à inibição da esteróide sulfatase, da aromatase, da 17β -hidroxiesteróide desidrogenase e da 5α -redutase, fazendo ainda referência ao uso de anti-estrogénios.

Abstract

The bioactivity, structure and excellent penetration ability in the cell membrane and the binding ability to nuclear and membrane receptors of steroids make them subject of research for drug development.

The cell growth and proliferation in hormone-dependent cancers, such as breast and prostate cancer, is influenced by the action of estrogenic and androgenic hormones. These hormones are expressed on these situations, so decreasing its concentration in the human body allows to control the proliferation of malignant cells. Thus, different therapeutic approaches, such as inhibition of key enzymes in the biosynthesis of these hormones have been investigated.

This monograph includes an update of recent literature concerning inhibition of steroid sulfatase, aromatase, 17β -hydroxysteroid dehydrogenase and 5α -reductase inhibition, as well as the use of anti-estrogen.

Introdução

Pela sua estrutura e variadas propriedades farmacológicas, os esteróides têm merecido uma forte pesquisa e investigação na descoberta de fármacos. Estas moléculas têm uma excelente capacidade de penetração na membrana celular e de ligação aos recetores nucleares e de membrana. Uma pequena alteração na sua estrutura pode provocar uma extensa variação da resposta biológica. Assim, têm sido exploradas diversas modificações estruturais com o intuito de induzir as propriedades farmacológicas pretendidas. Diferentes tipos de esteróides têm vindo a ser modificados para obter agentes anticancerígenos (anti-proliferativos), citotóxicos e citostáticos. (1)

O cancro de mama é a principal causa de morte por cancro entre as mulheres. Aproximadamente 60% de pacientes na pré-menopausa e 75% na pós-menopausa têm cancro da mama recetor estrogénio positivo (ER+), ou seja, a carcinogénese está associada às hormonas esteróides, que levam à rápida proliferação celular. As enzimas do metabolismo e os recetores de estrogénio têm um papel crucial nesta proliferação, assim como os próprios estrogénios. A sobre-expressão desta hormona estimula a proliferação de células sensíveis à mesma, levando a vários tipos de cancros hormono-dependentes (mama, próstata). Por este motivo, os esteróides têm vindo a ser o alvo de pesquisa para o desenvolvimento de fármacos anti hormonais. (2)

Os androgénios testosterona (T) e di-hidrotestosterona (DHT), além de desempenharem um papel importante no desenvolvimento e no crescimento da próstata, também são responsáveis pelo desenvolvimento e progressão de hiperplasia benigna da próstata (BPH) e cancro da próstata. A BPH é uma doença recorrente em 50% dos homens com 50 anos de idade e 90% dos homens de 80 anos de idade, sendo o principal responsável pela morbilidade masculina, enquanto o cancro da próstata é a segunda principal causa de morte por cancro em homens. Portanto, o nível sanguíneo destas hormonas pode ser reduzido, impedindo a conversão irreversível de T em DHT, pela inibição da 5 α -reductase (5 α -R). (3)

Existem diversas abordagens para reduzir a resposta hormonal em células cancerígenas. Uma delas envolve o uso de inibidores enzimáticos por forma a reduzir a biossíntese da hormona endógena ou pela utilização de um ligando mais forte que o substrato endógeno para formar um complexo com o recetor específico, impedindo a ligação do esteróide endógeno. Por exemplo, inibidores da sulfatase e da aromatase são inibidores enzimáticos, enquanto os anti-estrogénios são antagonistas dos RE, competindo com os estrogénios endógenos.

Alvos terapêuticos e respetivas abordagens terapêuticas

I. 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD)

As 17 β -HSDs são oxiredutases, tendo uma importante função no metabolismo de estrogénios e androgénios: catalisam as etapas finais da biossíntese de esteróides. Estas moléculas catalisam reações de oxidação/redução dependentes de NAD(P)H/NAD(P)⁺ no carbono 17 do esteróide.

As HSDs do tipo 1, 2 e 3, desempenham um papel fundamental na biossíntese de androgénios e estrogénios ao catalisarem a interconversão de 17-cetosteróides nos 17 β hidroxiderivados e vice-versa. As 17 β -HSDs são enzimas-chave envolvidas no desenvolvimento, crescimento e função de todos os tecidos reprodutivos, masculino e feminino. São, portanto, alvos adequados para modular a concentração das hormonas E2 e T no caso de doenças dependentes destes esteróides.

Consoante a sua atividade oxidativa ou redutora, regulam a concentração intracelular dos esteróides ativos e inativos. A atividade genómica exercida pelas moléculas esteróides envolve a ligação a um recetor nuclear. As 17 β -HSDs atuam como um pré-recetor molecular. Estas são enzimas-chave nas diferentes funções dos tecidos reprodutivos masculino e feminino. Considerando o papel das diferentes 17 β -HSD na modulação hormonal e da especificidade de cada uma para o seu substrato, e localização do tecido, estas proteínas constituem importantes alvos terapêuticos em doenças como cancro da mama e da próstata. (4)

a. 17 β -HSD I

A 17 β HSDI catalisa a conversão da estrona (E1) em estradiol (E2) [Fig. 1A], o estrogénio mais ativo, desempenhando um papel importante no desenvolvimento de doenças estrogénio-dependentes. Um elevado rácio E2/E1, assim como concentrações elevadas de mRNA 17 β -HSD I apontam para o papel essencial da 17 β -HSDI no cancro da mama, entre outros. Tendo esta informação, a inibição da 17 β -HSDI é considerada uma abordagem terapêutica válida para o seu tratamento. Uma vez que 17 β -HSDI e 17 β -HSD2 têm funções opostas – a 17 β -HSD2 oxida a E2 em E1 -, os inibidores da 17 β -HSDI têm de ter uma seletividade para esta isoforma.

(4)

b. 17 β -HSD 3

A 17 β -HSD3 catalisa a conversão de 4-androsteno-3,17-diona em testosterona [Fig.1B]. A enzima está presente exclusivamente no testículo e o seu mRNA está sobre-expresso nos tecidos do cancro prostático. A testosterona é responsável pela proliferação celular em doenças androgénio-dependentes. Assim, a inibição da 17 β -HSD3 constitui uma importante estratégia terapêutica para doenças como o cancro da próstata. (4)

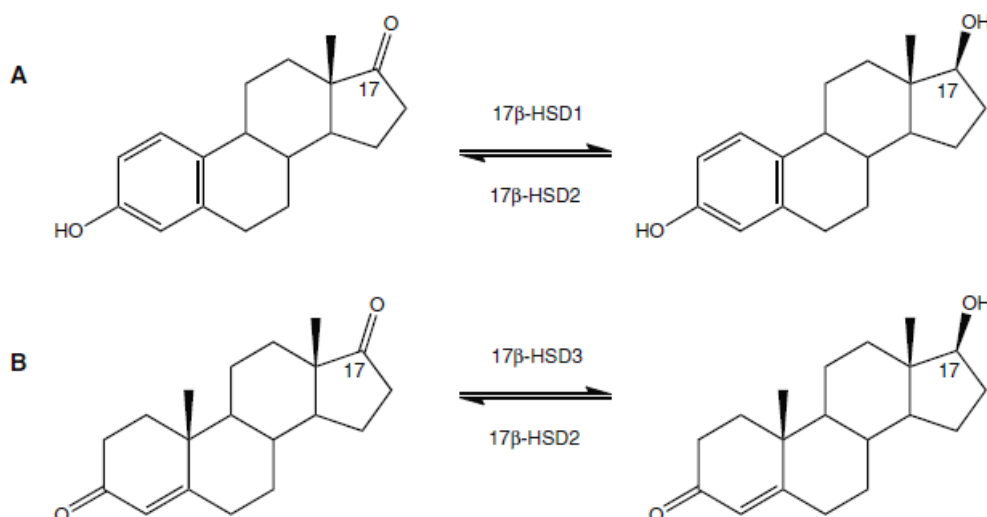


Figura 1 - (A) Conversão da estrona em 17 β -estradiol e vice-versa, (B) conversão da 4-androsteno-3,17-diona em testosterona e vice-versa.

c. 17 β -HSD 5

A 17 β -HSD5 está sobre-expressa no cancro da mama e da próstata. Tem uma elevada atividade na prostaglandina sintase. A prostaglandina produzida (PGF₂) pode induzir a proliferação celular tanto nas doenças hormono-sensíveis como nas não sensíveis. A inibição da 17 β -HSD5 bloqueia tanto os androgénios intratumorais como a síntese de PGF₂, sendo por isso uma abordagem interessante para o tratamento de ambos os tipos de tumor. (4)

II. Inibidores esteróides da 17 β -HSD

a. Derivados E1 e E2 substituídos em C16

Em 2002 foi desenhado e sintetizado um derivado do E2 com um grupo adenosina em C16 (figura 2, 1) como inibidor bifuncional (ligação em dois locais da enzima). Recentemente, a síntese do derivado E1 correspondente demonstrou um inibidor comparativamente mais forte (4nM vs. 12 nM). (5)

Como esta série de inibidores com dupla ligação à enzima não tem capacidade de penetrar a membrana celular, foi sintetizada uma nova série de derivados da E1 e do E2, substituídos em C16. A introdução de um grupo m-carbamoilbenzil leva a compostos muito ativos com valores de IC50 de 171 e 44 nM, respetivamente. Estes compostos demonstraram afinidade relativamente à 17β-HSD2, mas também potência estrogénica. O composto 3 [Fig.2] foi ainda capaz de inibir a proliferação mediada pela E1. (4)

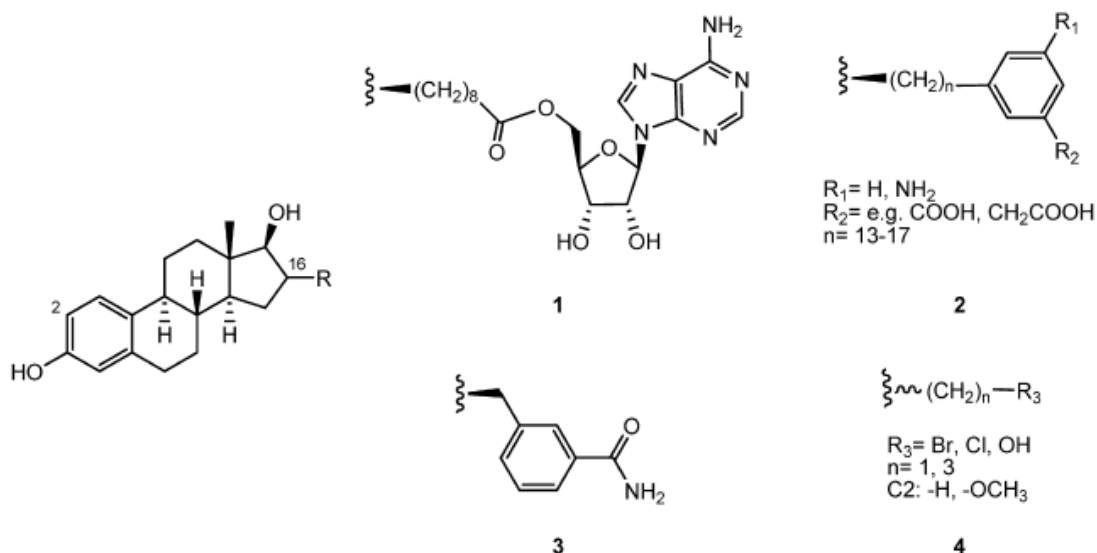


Figura 2 - Derivados do estradiol substituídos em C16 (4).

b. Derivados E1 substituídos em C15

Messinger et al., abordou o desenho de inibidores da 17β-HSD1 de uma forma diferente, modificando a E1 na posição 15 com substituintes polares ligados por um espaçador alquilo. (6) O composto mais ativo foi obtido com um substituinte metiltiazolil propanamida com um IC50 de 4nM (substrato natural 30nM) [fig. 3]. (4)

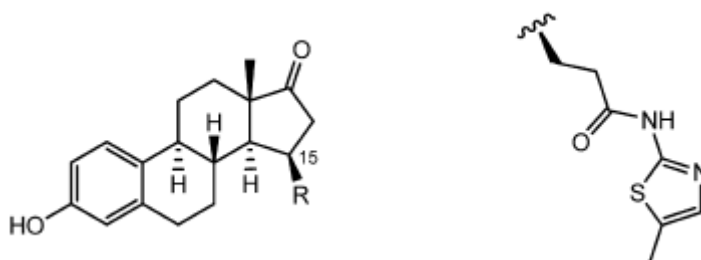
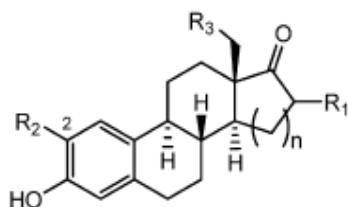


Figura 3 - Derivado da estrona em C15.

c. Derivados da estrona substituídos em C2

Modificações na posição 2 da estrona e da d-homo-estrona levam a derivados com elevada potência. Estudos sugeriram que estes compostos têm como alvo uma bolsa lipofílica secundária próxima do terminal C enzimático. O composto mais ativo obtido foi 2-fenetil-D-homo-estrona [Fig.4] com um IC50 de 15 nM. (4)



n= 1, 2
R₁= H, α-F, β-F
R₂= H, Cl, Br, I, OCH₃, phenethyl, allyl, C≡C-Ph
R₃= H, CH₃

Figura 4 - Derivado da estrona em C2.

d. Novas moléculas

Para além de catalisar a conversão da E1 em E2, a 17β HSD I também catalisa a conversão de DHEA em 5-androsteno-3β,17β-diol (5-diol), um estrogénio mais fraco mas que se torna mais importante na pós-menopausa e que pode igualmente estimular a proliferação celular no BC. (7)

Diversos estudos imuno-químicos têm relatado a presença da 17β-HSDI numa proporção aproximada de 50-60% das células tumorais do BC. (8) (9) Para além disto, um aumento significativo da expressão de 17β-HSDI tem sido observado em doentes com BC, depois de terapia com agentes quimioterapêuticos, sugerindo uma resposta enzimática compensatória da diminuição de estrogénios. (10)

Estas observações sugerem que os inibidores da 17β-HSDI podem ser úteis na inibição da biossíntese de estrogénios num grande número de BC, podendo ser vantajosos numa inibição máxima desta mesma biossíntese, uma vez que os AIs são incapazes de bloquear a produção de 5-diol. (11)

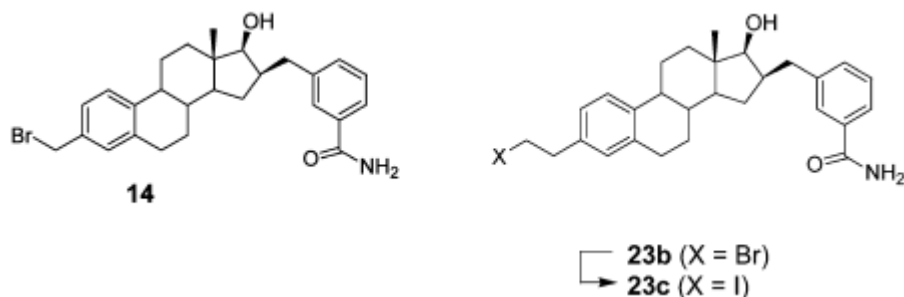


Figura 5 - Moléculas sintetizadas por Maltais et al., (11).

Maltais et al., realizaram a síntese de três séries de derivados do E2, com estudos de REA, fornecendo dados importantes acerca da tolerância da enzima a variadas modificações. Dos derivados da primeira série o derivado mais promissor foi o derivado bromoetil (14) [Fig.5], que demonstrou um nível de inibição aceitável e um perfil não estrogénico. A segunda série de compostos foi desenvolvida com base na cadeia de bromoetil do derivado (14) [Fig.5], assim como de outros compostos da primeira série, convergindo para a identificação do composto 3-[[[(16 β ,17 β)-3-(2-bromoetil)-17-hidroxiestra-1(10),2,4-trieno-16-il]metil} benzamida (23b) [Fig.5]. Este composto é um potente inibidor da 17 β -HSDI em células T-47D (IC50=68 e 97nM), sem deteção de atividade estrogénica em células estrogénio-sensíveis. Este derivado demonstrou ser um inibidor competitivo e irreversível da 17 β -HSDI, para além de ser seletivo relativamente a 17 β -HSD2, 17 β -HSD7, 17 β -HSD12 e à CYP3A4. Este é um perfil promissor para ensaios *in vivo*. (11)

Como um outra perspetiva interessante, o derivado iodeto 23c [Fig.5] pode ser útil na imagiologia molecular de tecidos que expressem a 17 β -HSDI, assim como para tratamentos radioterapêuticos. (11)

Estes novos inibidores (23b) e (23c) [Fig.5], desenvolvidos através de estudos REA representa, candidatos promissores a ensaios clínicos para o tratamento e diagnóstico de doenças estrogénio-dependentes, como o BC. (11)

III. Sulfatase de esteróides (STS)

A sulfatase de esteróides (STS) ou aril sulfatase C é um membro da superfamília da sulfatase. O substrato natural das sulfatases humanas tem diversos graus de complexidade estrutural, mas a particularidade da STS é a sua capacidade de hidrolisar esteróides sulfatados, obtendo hidroxiesteróides livres (não conjugados). Assim, os substratos mais conhecidos da STS são sulfato de colesterol (CHOLS), sulfato de pregnolona (PREGS), sulfato de

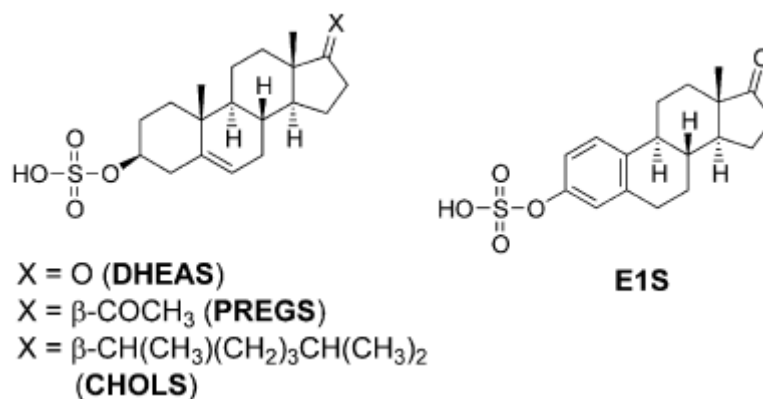


Figura 6 - Substratos esteróides (CHOLS, PREGS, DHEAS e E1S) da STS.

dihidroxiandrosterona (DHEAS) e sulfato de estrona (EIS) [Fig. 6; Tabela I]. A STS também hidrolisa substratos não esteróides, embora com menor potência catalítica.

	CHOLS	PREGS	DHEAS	EIS
Valores Km (μM)	2.0	0.6	1.7	0.8
Taxa hidrólise (nmol/min/mg)	1400	1600	1000	2900

Tabela I- Valores de Km e Taxa de hidrólise da STS para os seus diferentes substratos.

A STS catalisa uma reação não reversível, sendo que a reação inversa é proporcionada por uma outra enzima esteróide, a sulfotransferase.

A STS é uma proteína transmembranar, associada maioritariamente ao retículo endoplasmático. Estudos recentes indicam a presença de uma isoenzima STS nuclear. A STS encontra-se distribuída em tecidos como a placenta – onde se encontra em maior abundância – glândulas adrenais, ovários, testículos, pele e cérebro. A STS foi igualmente detetada em tecidos malignos da mama e da próstata, assim como em linhas celulares cancerígenas. A expressão da STS é significativamente maior nos tecidos malignos (mamário e prostático), comparativamente ao tecido normal, sugerindo um importante papel da STS em tumores hormono-dependentes.

Assim, considerando que os esteróides sulfatados não são nem ligandos dos recetores esteróides, nem hormonas ativas, a inibição da STS poderá ser uma estratégia para inativar a função biológica dos esteróides, como por exemplo o seu efeito proliferativo em células tumorais.

A estrutura desta enzima engloba um domínio polar catalítico e dois domínios transmembranares. O grupo sulfato hidrofílico (polar) está localizado no domínio catalítico e a parte hidrofóbica do substrato esteróide (anéis B-D) está para a área hidrofóbica da STS. (12)

O mecanismo da hidrólise do sulfato envolve a presença de dois elementos-chave, essenciais para a atividade catalítica: α -formilglicina (FGly) e um catião Ca^{2+} . Acredita-se que a hidrólise da sulfatase se dá por um mecanismo de transesterificação-eliminação (TE). Gosh propôs recentemente um mecanismo [Fig.7] de quatro passos para a STS:

- I. Ativação da FGly75 por uma molécula de água,
- II. Ataque nucleofílico ao átomo de enxofre facilitado pelo Ca^{2+} ,
- III. Liberação de um álcool proveniente do éster sulfato,
- IV. Liberação de HSO_4^- para regenerar o FGly. (13)

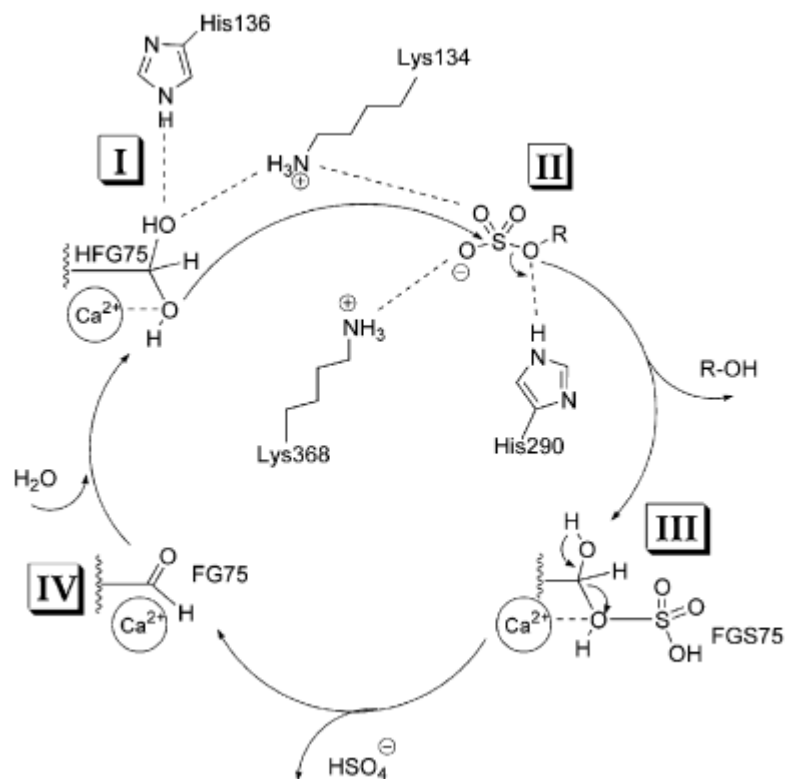


Figura 7 - Mecanismo catalítico da Esteróide Sulfatase (STS) proposto por Gosh et al., (13)
 FG75: α -formilglicina 75; HFG75: α -formilglicina 75 hidratada; FGS75: α -formilglicina 75 sulfatada.

IV. Inibidores da STS

No início dos anos 90, foi feita uma importante descoberta, quando uma modificação no substrato natural EIS originou um potente inibidor da STS: estrona-o-sulfamato (EMATE) [Fig.8]. (14) A substituição do OH do grupo sulfato por um NH_2 gerou um grupo sulfamato (OSO_2NH_2) que, quando adicionado num grupo arilo (esteróide ou não) inativa eficientemente a enzima. Verificou-se ainda que, quando um inibidor irreversível da STS contém uma cadeia lateral hidrófoba no anel-D, o derivado de fenol libertado irá interagir com o túnel hidrofóbico da enzima, proporcionando, assim, um novo inibidor de tipo reversível. (12)

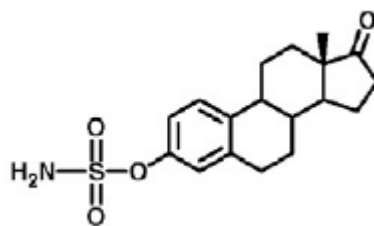


Figura 8 - EMATE.

Os vários inibidores de STS foram classificados como inibidores de primeira e de segunda geração de STS, consoante a atividade biológica de cada um. A primeira geração de inibidores STS é de inibição hormonal pura, enquanto os inibidores da STS de segunda geração são de dupla ação (são inibidores hormonais assim como inibidores da polimerização da tubulina). Os inibidores STS de primeira geração têm ação anti-proliferativa (citostático) e num segundo momento acabam por ser citotóxicos. Os inibidores da STS de segunda geração são principalmente sintetizados como análogos do 2-metoxiestradiol (2ME2), com propriedades anti-angiogénicas.

Atualmente encontra-se em desenvolvimento uma terceira geração de inibidores de STS, na qual os compostos são capazes de inibir duas enzimas - a STS e a aromatase. No entanto, até agora nenhuma molécula líder esteróide pôde ser desenvolvida eficazmente como inibidor da STS de terceira geração. Diversos grupos de investigação como MJ Reed, A. Purohit, D. Poirier, T. Suzuki, S. Ahmed e SP Newman têm contribuído para o desenvolvimento desta área. (1)

a. Inibidores esteróides baseados no sulfamato

Para obter inibidores da STS e/ou 17 β -HSD tipo I, Poirier et al., desenvolveu uma estratégia para a síntese de “bibliotecas” de sulfamato e derivados de fenol. (15) O ligante multi-destacável de sulfamato foi utilizado para gerar “bibliotecas” de N-derivados 16 β -aminopropil do E2 [Fig. 9, A], bem como N-derivados 17 α -piperazinometilo do E2 [Fig. 9, B], com bons rendimentos e purezas - homogeneizado de células que sobre-expressam a atividade de STS e EIS (100 μ M) como substrato. (16) (17) As atividades inibitórias destes compostos foram avaliadas como comparáveis ou melhores do que a do EMATE (era esperada uma baixa atividade estrogénica pela adição de uma cadeia lateral na estrutura do E2).

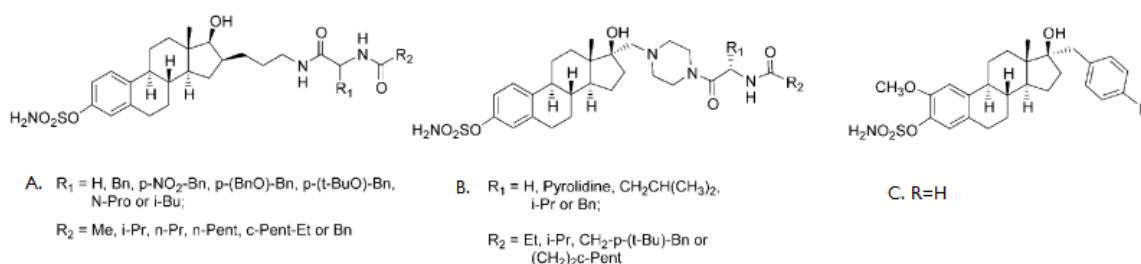


Figura 9 - A. Derivado 16 β -aminopropil da E2; B. derivado 17 α -piperazinometilo da E2; C. 2-metoxi-3-sulfamoiloxi-17 α -benzilo .

Em 2003, Ciobanu et al., relataram a potência, *in vitro* e *in vivo*, do 2-metoxi-3-sulfamoiloxi-17 α -benzilo [fig. 9, C] como inibidor de STS. Este composto revelou-se um potente inibidor *in vitro* (IC₅₀= 0,024 nM; usando homogeneizado de células que sobre-expressam STS; EIS (100 μ M) como substrato). Testado *in vivo*, o derivado de benzílico [Fig. 9, C] inibe

eficientemente o crescimento do tecido uterino induzido pelo EIS, não mostrando efeito estrogénico contrariamente ao composto original, sem um grupo 2-metoxi. (18)

O grupo de Poirier investigou o efeito inibitório de um esteróide 3-o-sulfamoiado (estrano, androstano e pregnano) na STS. Ao adicionar um grupo benzilo ao anel D esteróide, o derivado estrano ($R = H$; $IC_{50} = 1,4 \text{ nM}$) [Fig. 10,1] continua a ser um melhor inibidor do que o correspondente derivado androstano [Fig. 10, 2.a] ($IC_{50} = 14 \text{ nM}$) ou derivado de pregnano ($IC_{50} = 400 \text{ nM}$) [Fig. 10, 2.b] quando testado no mesmo ensaio enzimático (homogeneizado de células que sobre-expressam STS; EIS ($100 \mu\text{M}$) ou DHEAS ($100 \mu\text{M}$) como substrato da enzima). (19)

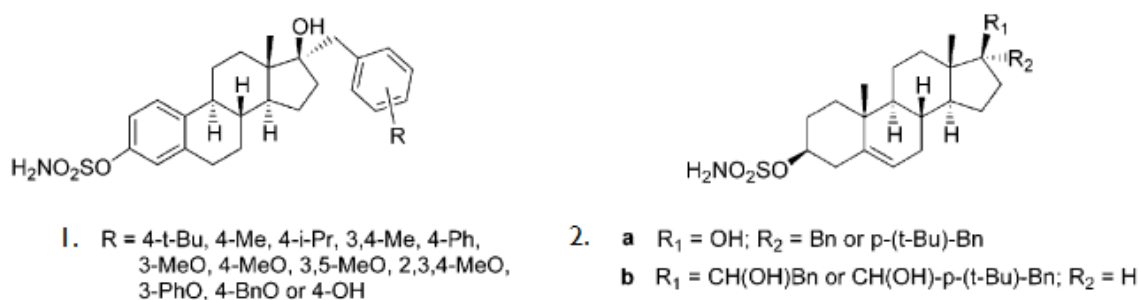


Figura 10 - 1. Derivado estrano; 2. (a) derivado androstano, (b) derivado pregnano.

b. Inibidores esteróides não baseados no sulfamato

Em 2000, Boivin et al., publicou um estudo relação estrutura-atividade (REA) em derivados do E2 17α -substituídos como inibidores da STS. Foram sintetizados e testados mais de 40 compostos como inibidores de STS, contendo uma cadeia alquilo linear ou ramificada (IC_{50} compreendido entre $0,22\text{-}19,6 \mu\text{M}$). Este estudo demonstrou claramente que a adição de um substituinte hidrofóbico na estrutura do E2 induz uma potente inibição reversível da STS. O composto representado na [Fig. 11] foi comparado com o inibidor EMATE, referência no mesmo ensaio, utilizando células que sobre expressam STS e como substrato foi utilizado EIS ($100 \mu\text{M}$), sendo que se verificou ser 7,5 vezes menos potente ($IC_{50} = 12$ e $1,6 \text{ nM}$, respetivamente). (20)

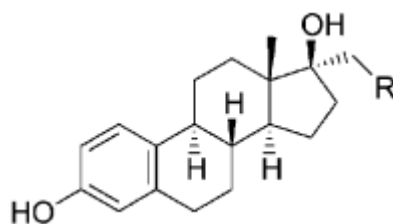


Figura 11 - Composto comparado com o EMATE, $R = p\text{-(t-Bu)-Ph}$.

Ciobanu et al.,, descreveram a síntese de duas séries de androstano e pregnano com um benzilo substituinte na posição 17α e 20, respetivamente [Fig. 12, 1 e 2], e comprovaram a

sua potência como inibidores de STS. Apesar de diferentes androstanos e pregnanos terem sido usados como suporte, foram obtidas, maioritariamente, inibições menores comparativamente ao derivado estrano correspondente. (21)

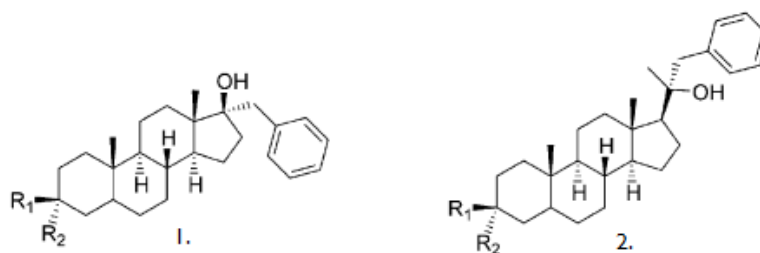


Figura 12 - Derivados Androstano e Pregnano.

Fournier sintetizou e testou uma série de dímeros do E2, representados na [Fig. 13], como inibidores de STS. Os dois esteróides encontram-se ligados tanto em C17-C17, C16-C16 ou C16-O3 com diferentes tipos de espaçadores. Os melhores inibidores foram os dímeros de E2 ligados em C17-C17 com um espaçador de 4 carbonos. Assim, a atividade inibitória do composto (1.) [Fig. 13] ($X=CH_2CH=CHCH_2$) foi semelhante ao inibidor de referência, [Fig. 11], (56 e 62% de inibição a 1 μ M, respetivamente) - ensaio enzimático com células homogeneizadas que sobre expressam STS; E1S (100 μ M) como substrato. (22)

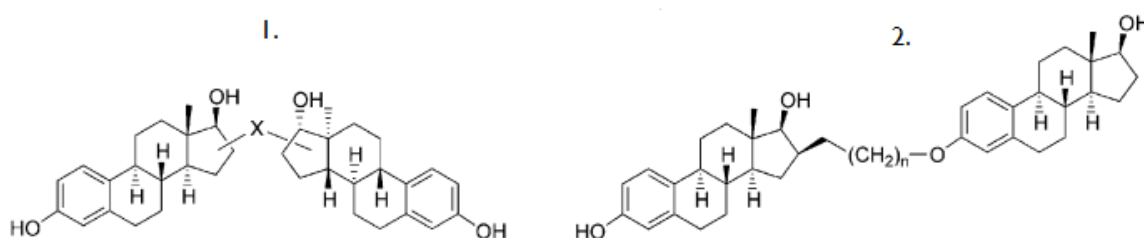


Figura 13 - Dímeros da E2 sintetizados por Fournier.

A STS, um alvo atraente para desenvolver a terapia anti-hormonal é uma nova abordagem. Até agora, nenhuma droga pôde ser desenvolvida com base nesta abordagem, mas algumas estão em ensaios clínicos.

V. Aromatase

A aromatase é uma enzima da família do citocromo P450 (CYP19A1). No último passo da biossíntese de estrogénios, esta enzima vai converter androgénios (C19) em estrogénios (E1 e E2, C18). Este é um passo importante e irreversível que ocorre nos ovários. (23)

Após a menopausa, os ovários deixam de estar funcionais, baixando os níveis plasmáticos de E2 em 10% e a conversão acima referida é realizada em tecidos periféricos, pela aromatase. (24) A androstenodiona é convertida em estrona e a testosterona em estradiol, o estrogénio endógeno mais potente. (25)

A aromatase é sobre-expressa nos tumores da mama e considerada, por isso, como um alvo para o desenvolvimento de agentes anti-cancerígenos. (25)

VI. Inibidores da Aromatase (AI)

Um AI bloqueia eficientemente a ação da enzima, o que reduz a biossíntese de estrogênios e conseqüentemente a proliferação de células tumorais. Os AIs estão classificados em duas sub-classes – tipo I e II. Os inibidores do tipo I são de estrutura esteróide e são irreversíveis, enquanto os inibidores do tipo II são não-esteróides e reversíveis. No caso dos AIs esteróides, o núcleo androsteno-3,17-diona tem sido considerado muito importante para interação com a enzima aromatase. Estes AIs ligam-se covalentemente à aromatase e convertem-na num intermediário, causando uma inibição irreversível. (23) (26)

A terceira geração de AIs é altamente específica, potente e com reduzidos efeitos secundários, sendo duas destas moléculas não esteróides (tipo II), anastrozole e letrozole, e um esteróide (tipo I), o exemestano. Actualmente, o exemestano [Fig.14], esteróide oralmente ativo, representa uma boa alternativa ao tamoxifeno, como tratamento de segunda linha em mulheres pós-menopáusicas com cancro da mama. (2)

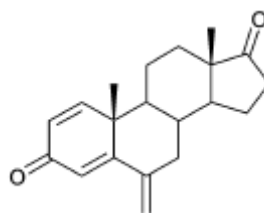


Figura 14 – Exemestano.

Algumas desvantagens do uso destes AIs (como a possibilidade de indução de osteoporose e carcinoma do endométrio) exigem a administração de terapêutica adicional para superar esses problemas (como bisfosfonatos no caso de ocorrer osteoporose). Por este motivo e por apesar da eficácia, poderem apresentar algumas resistências, novas moléculas têm sido investigadas. (26)

a. Uma nova série de esteróides baseada na 7α -aliandrostenediona, modificada nos anéis A e D foi desenhada, sintetizada e bioquimicamente avaliada relativamente à sua REA como AI. Diversos derivados demonstraram uma forte atividade enquanto AIs. Relativamente à REA,

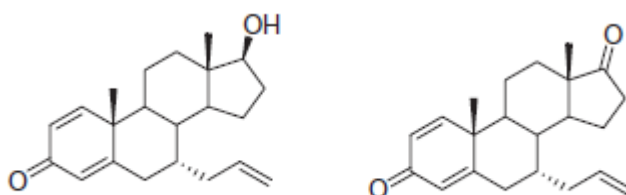


Figura 15 - Derivados 7α -aliandrostenediona.

a presença de uma dupla ligação em C1, como nos compostos (A) e (B) da [Fig. 15] aumenta a planaridade do anel A, assim como a atividade inibitória. A subtração do grupo carbonilo em C3 não favoreceu particularmente a atividade inibitória, sendo a introdução de uma dupla ligação em C1 mais benéfica. A substituição do grupo carbonilo em C17 por um grupo hidroxilo geralmente diminui a atividade inibitória, exceto se estiver presente uma dupla ligação em C1, como em (A) [Fig. 15]. (27)

b. Gosh et al., relataram a síntese e avaliação de uma série de compostos substituídos em C6: androsta-1,4-dieno-3,17-dionealquilniloxi, cujo desenho foi baseado no local ativo da aromatase. A sua estrutura esteróide é idêntica ao exemestano [Fig.14] - androsta-1,4-dieno-3,17-diona substituído em C6-metildieno (ASSD) [Fig.16, 1]. (28)

Ficou demonstrado que os novos compostos têm uma potência elevada como inibidores enzimáticos e também como potenciais compostos para ensaios em células tumorais do BC. O derivado 5 foi o mais potente (2-pentilniloxi) [Fig.16, 5].

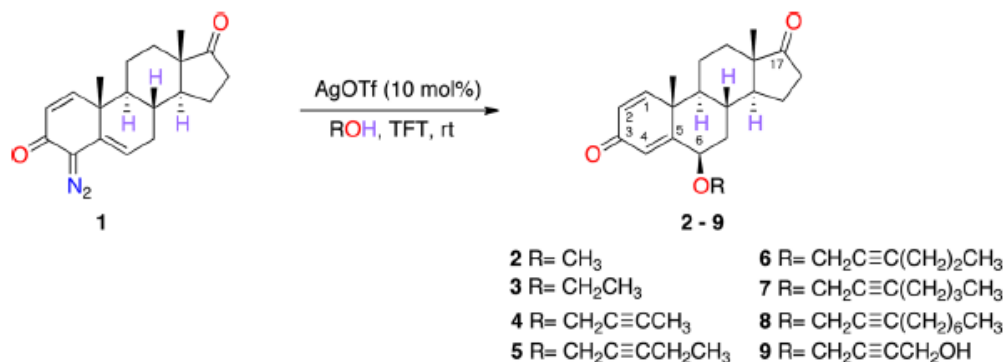


Figura 16 - Síntese de derivados C6β-2-Alquilniloxi da ASSD.

VII. Anti-estrogénios

Os anti-estrogénios competem com os estrogénios endógenos para a ligação ao recetor de estrogénio (ER) e também para a interação direta com fatores de crescimento, o que acaba por levar à inibição da ação estrogénica. Através de estudos de topologia e estudos de raio-x do local de ligação ligando-recetor, foi observado que qualquer modificação na posição 7 ou 11 é bem tolerada e conduz à indução de atividade anti-estrogénica.

Recentemente, foram realizadas modificações no núcleo esteróide, particularmente na E1 e no E2, em C 15, 16 e 17, com vista a obter uma potente molécula anti-estrogénica. No entanto, com poucas exceções, como esteróides anti-estrogénicos, com estas modificações no núcleo esteróide levam ao desenvolvimento de inibidores enzimáticos, moléculas citotóxicas ou anti-estrogénios de ação dupla.

Os potenciais anti-estrogénios foram alcançados pela modificação em 7α ou 11β do estradiol, levando à descoberta de RU 3941 [Fig. 17A], RU 51625 [Fig. 17B], ICI-164384 [Fig. 17C] e do fulvestrante [Fig. 17D].

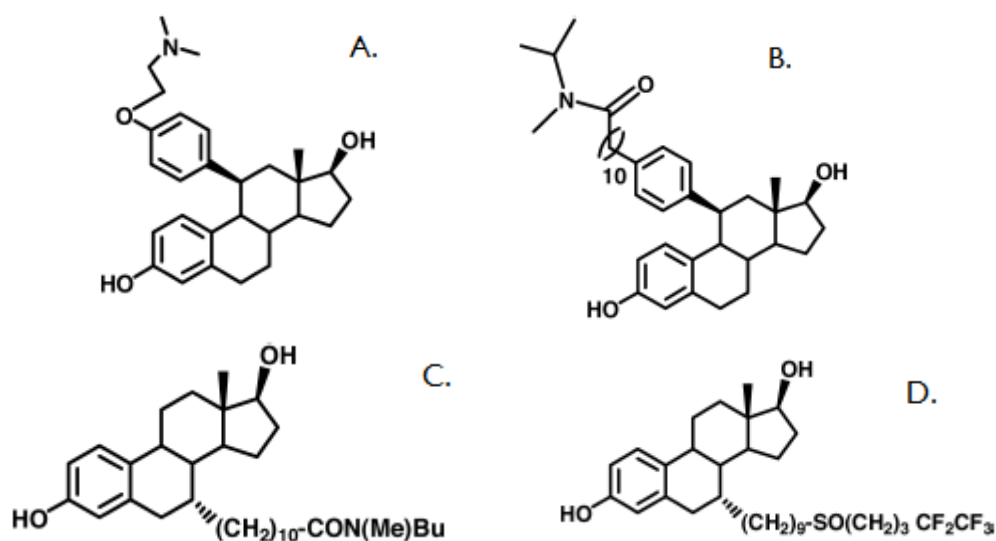


Figura 17 - Potenciais anti-estrogénios, estradiol modificado em 7α ou 11β . (1)

As REAs completas destes compostos revelam que o comprimento de cadeia do espaçador entre o núcleo esteróide e grupo funcional desempenha um papel crucial na resposta biológica. É necessária uma pequena cadeia carbonada - C4-C6 – na posição 7α , para uma atividade anti-estrogénica pura. A introdução de um grupo arilo em 7α aumenta o efeito agonista, enquanto que na posição 11β um grupo arilo é necessário para a atividade anti-estrogénica. (29)

O fulvestrante está em uso clínico para o tratamento de cancro de mama resistente ao tamoxifeno e é tratamento de segunda linha no cancro de mama metastático. É comercializado pela AstraZeneca sob o nome comercial de *Faslodex*. O fulvestrante é o único anti-estrogénio esteróide que diminui o recetor de estrogénio (ER) e é desprovido de qualquer atividade estrogénica. (1)

VIII. 5α redutase

A testosterona (T) é o androgénio mais abundante na circulação sanguínea, e é convertido na próstata em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 3-oxo- 5α -esteróide-4-desidrogenase,

5 α -redutase (5 α -R) [Fig. 18]. DHT é o principal androgénio na próstata e o principal 5 α -R pela diferenciação e crescimento da próstata. (3)

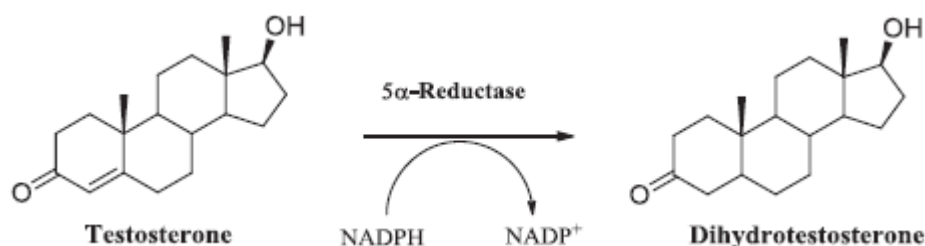


Figura 18 - Conversão da T em DHT pela 5 α -R.

A enzima 5 α -R é uma proteína ligada à membrana microsomal que reduz a dupla ligação $\Delta 4$ da testosterona (estereosselectivamente) utilizando o NADPH como co-factor, obtendo-se o correspondente 5 α -3-oxoesteróide - DHT. A catálise enzimática é iniciada pela formação de um complexo ternário, primeiro com NADPH e posteriormente com o substrato. Em seguida, o sistema de $\Delta 4$ -3-cetona da testosterona é ativado pela sua interação com um resíduo electrofílico no local ativo da enzima, originando uma carboxilação em C5. Depois deste passo, o híbrido do NADPH transfere para a face α esta carboxilação, levando à formação de um enolato de DHT, que é protonado no C4 na face β , para se obter DHT. (30)

Existem três tipos de 5 α -R, classificadas como tipo I, II e III. A forma dominante é o tipo I, sendo encontrada em vários tecidos, tendo sido mostrado que a atividade do tipo I é maior no cancro prostático do que na BPH. A isoenzima tipo II predomina na próstata e noutros tecidos genitais, desempenhando um papel importante na BPH pela maior afinidade que a testosterona apresenta para esta isoenzima, relativamente à de tipo I. (31) A isoenzima tipo III foi recentemente identificada células de cancro da próstata refratário hormonal, mas também noutros tecidos. (32) (33)

O desenvolvimento e progressão da BPH e do cancro da próstata são influenciados por androgénios. Assim, uma possível via terapêutica para estas patologias pode ser a inibição da 5 α -R - inibição da conversão irreversível de T em DHT, diminuindo a ação hormonal. Os inibidores da 5 α -R (RIs) podem ser classificados em esteróides e não-esteróides. O desenvolvimento de RI não-esteróides tem aumentado nos últimos anos, embora não mostrem atividades inibitórias promissoras de 5 α -R quando comparados com compostos esteróides. (3)

IX. Inibidores da 5 α -redutase

Ao longo dos anos, muitos inibidores da 5 α -R têm sido desenvolvidos, e alguns deles têm sido utilizados na prática clínica.

Os primeiros RIs esteróides foram desenhados modificando a T, o substrato natural da enzima. Isto porque a estrutura cristalina da 5 α -R não é muito conhecida pela instabilidade que apresenta na sua purificação. Assim, ao longo dos anos, a maioria dos inibidores foi desenvolvida principalmente considerando a estrutura do substrato (T), o mecanismo de reação proposto para este processo enzimático e o conhecimento qualitativo e quantitativo da relação estrutura-atividade. (31) (30)

Os inibidores da 5 α -R (RIs) podem ser classificados em esteróides e não-esteróides. (34) O desenvolvimento de RI não-esteróides tem aumentado nos últimos anos, embora não mostrem atividades inibitórias promissoras de 5 α -R quando comparados com compostos esteróides. (3)

Inibidores da 5 α -redutase do tipo esteróide podem ser estruturalmente classificados em três tipos: azasteróides, ácidos 3-carboxílicos e derivados de pregnano/androstano. De todos estes, os mais importantes são os azasteróides, que foram desenvolvidos para mimetizar o intermediário enolato ligado à enzima, por uma mudança isostérica entre um carbono e nitrogénio. (31) (30)

Uma das principais modificações foi a substituição de um átomo de carbono de um dos anéis da estrutura esteróide por um heteroátomo, geralmente azoto, levando à descoberta de potentes inibidores da 5 α -R humana, tais como 4-azasteróides, 6-azasteróides e 10-azasteróides. (35)

O primeiro e mais conhecido 4-azasteróide utilizado como RI foi a finasterida, [Fig. 19] que inibe seletivamente o isómero 5 α -R tipo II, clinicamente aprovado para o tratamento da BPH em 1992. (36), (37)

Foram então realizadas modificações estruturais que englobam mudanças na cadeia lateral ligada ao C17, a introdução de um grupo metilo no nitrogénio e a redução dupla ligação Δ^1 em C7 (31). Uma melhoria significativa foi o desenvolvimento de inibidores duais das duas isoenzimas, o que significa que um bloqueio mais geral de síntese de DHT. (38)

Mais tarde, um outro 4-azasteróide, dutasterida [Fig. 19], foi também aprovado pela FDA para ser usada para o tratamento sintomático da BPH. (31) A dutasterida emergiu como um potente inibidor duplo, reduzindo o nível circulante de DHT mais de 90%, melhorando os resultados clínicos em BPH. Além disso, a dutasterida é bem tolerada e tem efeitos colaterais transitórios. (39)

A finasterida e dutasterida formam complexos ternários com o complexo 5α -R-NADPH, sendo potentes e irreversíveis inibidores de 5α -R. (34) Ambos RIs reduzem os níveis de DHT intraprostática e, por conseguinte, o tamanho da próstata, sendo utilizados atualmente na clínica para o tratamento de BPH, tendo sido igualmente propostos para a quimioprevenção e tratamento do cancro da próstata. (40)

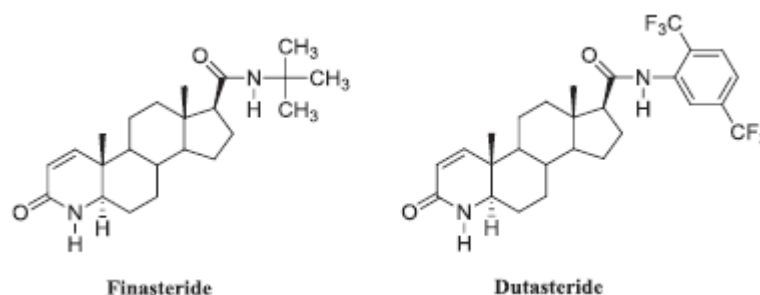


Figura 19 - Finasterida e Dutasterida, inibidores da 5α -R.

Apesar do sucesso do finasterida e dutasterida, estas moléculas apresentam algumas desvantagens, como o aumento da perda óssea e muscular, e impotência sexual. Além disso, diferentes estudos clínicos demonstraram que estes RIs aumentam o risco de cancro de próstata avançado, o que impede a aprovação da FDA de finasterida e dutasterida para o tratamento do cancro da próstata. Por esta razão, é importante procurar outras moléculas potentes e específicas, com efeitos secundários mais baixos. (41)

Como a única diferença estrutural entre a finasterida e dutasterida está na sua ligação cadeia lateral C17, uma série de modificações nesta parte da estrutura tem sido mais explorada. Um composto interessante resultante a partir desses estudos é o composto A [Fig. 20], o qual inibe potentemente do tipo I e II isoenzimas.

Outro grupo de sucesso é o dos 6-azasteróides, alguns dos quais também apresentaram uma potente dupla atividade inibidora da enzima, ex.: [Fig. 20, B].

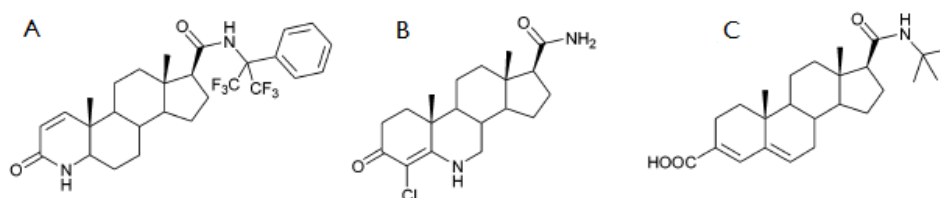


Figura 20 - 6-Azasteróides.

Os inibidores esteróides do ácido 3-carboxílico foram concebidos para mimetizar o presumido intermediário enolato ligado à enzima, introduzindo hibridização sp^2 em C3 e C4 e um ácido carboxílico aniónico em C3 para substituir o oxianião enolato. Estudos de REA evidenciaram que as duplas ligações Δ^3 e Δ^5 , bem como as amidas diisopropil e pivalilo em C17 são importantes para a potência da inibição enzimática. O membro mais representativo deste grupo é epristerida [Fig.20C], que é um potente inibidor da 5α -redutase de tipo II e um

inibidor fraco da isoenzima tipo I - entrou em ensaios clínicos para o tratamento da BPH. Outras estruturas desta classe que revelaram atividades interessantes incluindo vários estratrieno-3-carboxilatos contendo um anel A aromático e ácidos esteróides 3-sulfónico, 3-fosfónicos e 3-fosfinicos. (31) (30)

Outro grupo relevante neste domínio inclui derivados do esteróide pregnano. Vários pregnanos (função nos anéis A, B e D) foram desenvolvidos ao longo do tempo, tendo alguns deles potentes propriedades inibidoras da 5 α -redutase, muitas vezes maior do que a finasterida. Alguns compostos deste grupo resultaram da introdução de um halogénio no C4 ou C6 de Δ^4 -3-cetonas, esterificação da 17 α -OH em derivados de progesterona [Fig. 21A] e do 3-OH de 16-desidropregnanos [Fig. 21B] com ácido benzóico de p-substituído ou com substituintes alifáticos. (42)

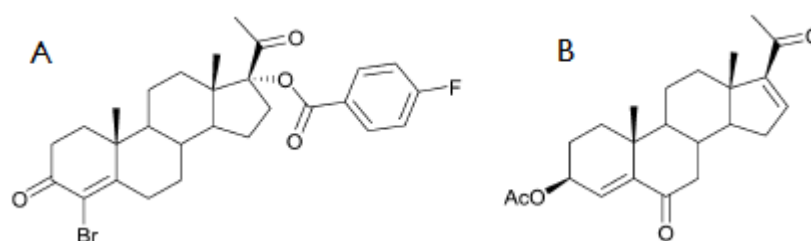


Figura 21 - Derivados Pregnano.

Também foram desenvolvidos vários derivados de androstano como inibidores da 5 α -R e potenciais agentes anti cancerígenos no PC. Estes incluem, por exemplo, 17 α -aza-D-homo [Fig. 22A], que tem atividade anti-proliferativa em células do PC e diminuem os níveis séricos de T (modelo de rato). (43) Neste contexto, os derivados de outros ésteres desidroepiandrosterona e dos derivados 17 α -oxa-D-homo, tendo estruturas 5 α , 6 β -dibromo e Δ^5 -insaturados e vários ésteres lineares ligados ao grupo 3 β -OH [Fig. 22 B, C], também foram desenvolvidos como anti-andrógenos. (35) (44) Os autores demonstraram que vários destes compostos, não só diminuem o peso da próstata e das vesículas seminais (em comparação com os animais tratados com testosterona), mas também inibem a enzima 5 α -R. (38)

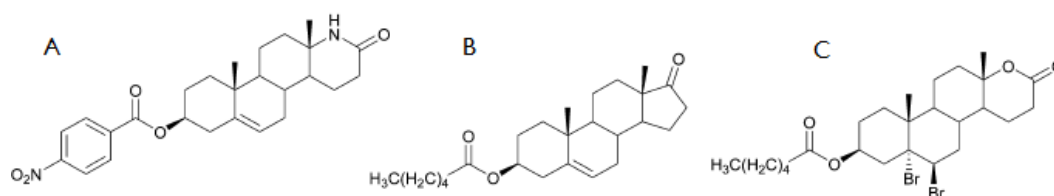


Figura 22 - Derivados androstano.

X. Uso de esteróides como agentes transportadores de citotóxicos

A seleção de agentes quimioterapêuticos para o tratamento do cancro é realizada consoante o estágio do cancro. Numa fase inicial, o uso de fármacos citostáticos é preferencial

(fármacos antiproliferativos ou inibidores enzimáticos), enquanto num estado avançado da doença, tende-se a usar vários fármacos citotóxicos com diferentes modos de ação. No caso da resistência ao fármaco, a combinação de um fármaco citotóxico com um anti-estrogénio ou com um inibidor enzimático é utilizada para ultrapassar o problema. Diversas categorias de fármacos têm sido desenvolvidas como fármacos citotóxicos, tais como paclitaxel, combretastatina, doxorrubicina, cisplatina e fluorouracilo. Várias moléculas esteróides citotóxicas activas contra diferentes linhas celulares de cancro humano, também têm sido alvo de pesquisa e desenvolvimento. Estas moléculas geralmente têm diferentes modos de ação, com alvos não-hormonais (tubulina, topoisomerase). Para além da sua atividade anticancerígena, estas moléculas podem ou não ter efeitos anti hormonais, sendo denominadas de esteróides citotóxicos. Apesar da utilização de esteróides para o desenvolvimento de agentes anti-proliferativos, compostos citotóxicos e inibidores enzimáticos, estes também têm sido usados com sucesso como mediadores do transporte de fármacos. Este conceito levou à síntese de diversos conjugados de esteróides com moléculas citotóxicas, para aumentar a seletividade, tais como nucleósidos, compostos organometálicos e doxorrubicina. Este tipo de moléculas evoca o seu potencial anticancerígeno no local de ação pois a parte citotóxica segue o modo de ação de modo específico (graças à molécula esteróide. Estruturalmente os anéis A e D de esteróides foram mais “recetivos” a modificações. Assim, a maioria dos análogos foram desenvolvidos após modificação desses anéis. (1) (45) (46)

Esteróides citotóxicos não são, necessariamente, agentes anti-cancerígenos selectivos mas têm a capacidade de eliminar o tumor existente.

XI. Conclusão

Existem diversas vantagens em utilizar moléculas esteróides no desenvolvimento de fármacos. Uma delas é a estrutura que, para além da boa biodisponibilidade, por semelhança com moléculas endógenas, de ter uma excelente capacidade de penetração das membranas lipofílicas, a versatilidade que apresenta para modificações funcionais, cobrindo um largo espectro de aplicações.

Fármacos anticancerígenos de estrutura esteróide têm uma excelente perspetiva, pois a sua biosemelhança diminui os efeitos secundários, provocados por outros compostos. Esta semelhança com compostos endógenos também traz uma desvantagem: pode acarretar efeitos hormonais não desejáveis. É então necessária uma melhor compreensão das propriedades do recetor, a fim de poder melhorar as modificações na molécula esteróide.

Referências

1. **GUPTA, A., KUMAR, B.S. and NEGI, A.S.** Current status on development of steroids as anticancer agents. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 137, 2013, pp. 242-270.
2. **AMARAL, C., et al.,,,.** Effects of steroidal aromatase inhibitors on sensitive and resistant breast cancer cells: Aromatase inhibition and autophagy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 135, 2013, pp. 51-59.
3. **AMARAL, Cristina, et al.,** New steroidal 17b-carboxy derivatives present anti-5a-reductase activity and anti-proliferative effects in a human androgen-responsive prostate cancer cell line. *Biochimie*. 95, 2013, pp. 2097-2106.
4. **MARCHAIS-OBERWINKLER, S., et al.,.** 17B-Hydroxysteroid dehydrogenases (17B-HSDs) as therapeutic targets:Protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 125, 2011, pp. 66-82.
5. **BERUBE, M. and POIRIER, D.** Design, chemical synthesis, and in vitro biological evaluation of simplified estradiol-adenosine hybrids as inhibitors of 17B-hydroxysteroid dehydrogenase type I. *Canadian Journal of Chemistry*. 87, 2009, pp. 1180-1199.
6. **MESSINGER, J., et al.,.** Estrone C15 derivatives – a new class of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I inhibitors. *Journal of Molecular and Cellular Endocrinology*. 301, 2009, pp. 216-224.
7. **SIMARD, J., et al.,.** Full oestrogenic activity of C19-delta 5 adrenal steroids in rat pituitary lactotrophs and somatotrophs. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 55, 1988.
8. **NAGASAKI, S., et al.,.** 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenases in human breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1155, 2009.
9. **HELLQVIST, E. and STAL, O.** 17beta-Hidroxysteroid dehydrogenases involved in local oestrogen sythesis have prognostic significance in breast cancer. *British Journal of Cancer*. 92, 2005.
10. **CHANPLAKORN, N., et al.,.** Increased estrogen sulfatase (STS) and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type I (17β-HSDI) following neoadjuvant aromatase inhibitor therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. 120, 2010.

11. **MALTAIS, R., et al.,** Discovery of a Non-Estrogenic Irreversible Inhibitor of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I from 3-Substituted- 16 β -(m-carbamoylbenzyl)-estradiol Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 57, 2014.
12. **MALTAIS, RENÉ and POIRIER, DONALD.** Steroid sulfatase inhibitors: A review covering the promising 2000–2010 decade. *Steroids*. 76, 2011, pp. 929-948.
13. **GOSH, D.** Human sulfatases: a structural perspective to catalysis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64, 2007.
14. **HOWART, N., PUROHIT, A. and REED, M.** Estrone sulfamates: potent inhibitors of estrone sulfatase with therapeutic potential. *Journal of Medicinal Chemistry*. 37, 1994, pp. 789-824.
15. **POIRIER, D, CIOBANU, LC and BERUBE, M.** A multidetachable sulfamate linker successfully used in a solid-phase strategy to generate libraries of sulfamate and phenol derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 12, 2002.
16. **CIOBANU, L. and POIRIER, D.** Synthesis of libraries of 16-aminopropyl estradiol derivatives for targeting two key steroidogenic enzymes. *ChemMedChem*. 2006.
17. **CIOBANU, L. and POIRIER, D.** Solid-phase parallel synthesis of 17 α -substituted estradiol sulfamate and phenol libraries using the multidetachable sulfamate linker. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 5, 2003.
18. **CIOBANU, L., et al.,** Inhibition of estrone sulfate-induced uterine growth by potent nonestrogenic steroidal inhibitors of steroid sulfatase. *Cancer Research*. 63, 2003.
19. **CIOBANU, LC, et al.,** 3 β -Sulfamate derivatives of C19 and C21 steroids bearing a t-butylbenzyl or a benzyl group: synthesis and evaluation as non-estrogenic and non-androgenic steroid sulfatase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 18, 2003.
20. **BOIVIN, RP, et al.,** Structure-activity relationships of 17 α -derivatives of estradiol as inhibitors of steroid sulfatase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 43, 2000.
21. **CIOBANU, L., et al.,** Synthesis and steroid sulfatase inhibitory activity of C19- and C21-steroidal derivatives bearing a benzyl-inhibiting group. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 36, 2001.
22. **FOURNIER, D. and POIRIER, D.** Estradiol dimers as a new class of steroid sulfatase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19, 2009.

23. **GOSH, D., et al.,** Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature*. 457, 2009.
24. **GEISLER, J.** Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 86, 2003, pp. 245-253.
25. **WATERMAN, M.R.** Anticancer drug target pictured. *Nature*. 457, 2009.
26. **CHUMSRI, S., et al.,** Aromatase, aromatase inhibitors and breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 125, 2011.
27. **VARELA, Carla, et al.,** Design, synthesis and biochemical studies of new 7 α -allyandrostanes as aromatase inhibitors. *Steroids*. 78, 2013, pp. 662-669.
28. **GOSH, D., et al.,** Novel Aromatase Inhibitors by Structure-Guided Design. *Journal of Medicinal Chemistry*. 55, 2012.
29. **RAY, S. and DWIVEDY, I.** Development of estrogen antagonists as pharmaceutical agents. *Advances in Drug Research*. 29, 1997.
30. **SUN, J., et al.,** 2011, *Current Medicinal Chemistry*, pp. 3576-3589.
31. **AGGARWAL, S., et al.,** An overview on 5 α -reductase inhibitors. *Steroids*. 75, 2010, pp. 109-153.
32. **UEMURA, M., et al.,** 2008, *Cancer Sci*, pp. 81-86.
33. **LI, J., et al.,** 2011, *PLoS One*.
34. **AZZOUNI, F., et al.,** The 5 α -reductase isoenzyme family: a review of basic biology and their role in human diseases. *Advances in Urology*. 2012.
35. **ARELLANO, Y., et al.,** New ester derivatives of dehydroepiandrosterone as 5 α -reductase inhibitors. *Steroids*. 76, 2011, pp. 1241-1246.
36. **GORMLEY, G.J., et al.,** The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. *New England Journal of Medicine*. 1992, pp. 1185-1191.
37. **FINN, D.A., et al.,** A new look at the 5 α -reductase inhibitor finasteride. *CNS Drug Review*. 12, 2006, pp. 53-76.
38. **SALVADOR, Jorge, et al.,** Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. *Natural Products Report*. 2, 2013, Vol. 30, pp. 205-376.
39. **KEAM, S.J. and SCOTT, L.J.** 2008, *Drugs*, 68, pp. 463-485.

40. **ANDRIOLE, G.L., et al.,** Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer. *New England Journal of Medicine*. 362, 2010, pp. 1192-1202.
41. **TAMMELA, T.L.** Endocrine prevention and treatment of prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 360, 2012, pp. 59-67.
42. **BRATOEFF, E., et al.,** 2009, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*, pp. 655-662.
43. **DHINGRA, N., et al.,** 2010, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, pp. 2229-2236.
44. **GARRIDO, M., et al.,** 2011, *Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127, pp. 367-373.
45. **GASPER, R., et al.,** FTIR spectral signature of the effect of cardiotoxic steroids with antitumoral properties on a prostate cancer cell line. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1802, 2010.
46. **WANG, Z., et al.,** Synthesis of B-ring homologated estradiol analogues that modulate tubulin polymerization and microtubule stability. *Journal of Medicinal Chemistry*. 43, 2000.
47. **YAMASHITA, D.S., et al.,** 1996, *Bioorg. Med. Chem*, 4, pp. 1481-1485.
48. **POIRIER, D. and BOIVIN, R.** 17 alpha-alkyl- or 17-alpha-substituted benzyl-17 beta-estradiols: a new family of estrone-sulfatase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1998.