



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS DERIVADOS DEL
PREGNANO CON UNA FUNCIÓN ÉSTER EN C-3 COMO INHIBIDORES DE LA
ENZIMA 5 α -REDUCTASA

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ELKIN EDUARDO SANABRIA CHANAGA

TUTOR: EUGENE BRATOEFF
LABORATORIO 125, DEPARTAMENTO DE FARMACIA,
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F., 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Jesús Sandoval Ramírez

VOCAL: Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

VOCAL: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet

VOCAL: Dr. René Miranda Ruvalcaba

SECRETARIO: Dr. Alejandro Cordero Vargas

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO:

- Laboratorio 125, Departamento de Farmacia, Conjunto "E", Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección del Dr. Eugene Bratoeff.
- Laboratorio G-006, Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal, UAM-Xochimilco, bajo la dirección de la Dra. Marisa Cabeza Salinas.

PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTE PROYECTO FUERON PRESENTADOS EN:

- **10ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica**

Universidad Autónoma de San Luis Potosí, UASLP, San Luis Potosí, México, del 5 al 9 de Mayo de 2014.

"Síntesis de nuevos derivados del pregnano con una función éster en C-3 como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa"

Elkin Eduardo Sanabria C.^a; Eugene Bratoeff^{a*}; Marisa Cabeza S.^b, ^a Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México D.F., C.P. 04510, México. ^b Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100, México D.F., C.P. 04960, México.

- **4º Congreso de Alumnos de posgrado, UNAM, 2014.**

Unidad de Posgrado, UNAM, México D.F. del 23 al 25 de Abril de 2014.

"Síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados del pregnano con un éster en C-3 como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa"

Elkin Eduardo Sanabria C.^a; Eugene Bratoeff^{a*}; Marisa Cabeza S.^b, ^a Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F, México. ^b Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y abrirme las puertas a nuevos conocimientos

Al Dr. Eugene Bratoeff por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, compartir conmigo parte de su vasto conocimiento y tener la paciencia para guiarme

A la Dra. Elena Ramírez por sus consejos y amistad, por estar siempre ahí cuando la necesité, por ser esa gran persona que me apoyó desde el principio

A la Dra. Marisa Cabeza por la realización de las pruebas biológicas y por darme parte de su tiempo para resolver algunas de mis dudas

Al posgrado en ciencias químicas, en especial a Josefina Tenopala por el apoyo incondicional en todos los percances que aparecieron en mis estudios de maestría

Al personal de la unidad de servicios de apoyo a la investigación (USAI) por la toma de los espectros de UV-Vis, IR, EM-FAB y RMN

A los miembros del jurado por su tiempo y valiosos aportes, por haber mostrado bastante interés en este trabajo y darme tan buenos consejos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de maestría (número de becario 273595)

A mi familia, que desde la distancia me ha apoyado incondicionalmente y siempre disfruta mis triunfos y sufre mis problemas, a ellos que son todo para mí, infinitas gracias

A mis amigos de la Universidad Industrial de Santander (UIS), quienes se han convertido en otra familia, con quienes nos hemos apoyado mutuamente y hemos pasado tantas alegrías

A mis amigos y compañeros del laboratorio 125, de los cuales aprendí tantas cosas y compartí tan agradables momentos

A Sara Cortés por aparecer en el momento indicado y convertirse en esa persona que inundó mi vida de alegría y tranquilidad



A mis padres y mis hermanos



ABREVIATURAS

16-DPA	Acetato de 16-deshidropregnenolona
17 β HSD	17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa
^1H - ^1H COSY	^1H - ^1H Correlation spectroscopy
AR	Receptor de andrógenos
ATR	Reflectancia total atenuada
CYP	Citocromo P450
DCC	Dicilohexilcarbodiimida
DCU	Diciclohexilurea
DHT	Dihidrotestosterona
DMAP	Dimetilaminopiridina
FAB	Bombardeo con átomos rápidos
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria 50%
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LH	Hormona Luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de la hormona Luteinizante
Log P	Coefficiente de partición
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
P.f.	Punto de fusión



PSA	Antígeno prostático específico
Py	Piridina
R_f	Factor de retención
RMN ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ^1H	Resonancia magnética nuclear de protones
Rpm	Revoluciones por minuto
SRD5A	5 α -reductasa
T	Testosterona
UV-Vis	Ultravioleta – visible
V	Longitud de onda
Δ	Desplazamiento químico



TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Próstata	3
2.2. Hiperplasia prostática benigna (HPB)	3
2.3. Cáncer de próstata	5
2.3.1. Factores de riesgo	5
2.3.2. Diagnóstico y tratamiento	6
2.3.3. Terapia hormonal	7
2.4. Enzima 5 α -reductasa	12
2.4.1. Inhibiendo a la enzima 5 α -reductasa	13
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo general	15
4.2. Objetivos específicos	15
5. PARTE EXPERIMENTAL	16
5.1. Parte química	16
5.1.1 Purificación del acetato de 16-deshidropregnenolona (16-DPA) 1	17
5.1.2. Obtención del 3 β -acetoxi-5 ξ ,6 ξ -epoxipregna-16-en-20-ona (2)	18
5.1.3. Oxidación de 2 para acceder a la 3 β -acetoxi-5 ξ -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3)	19
5.1.4. Preparación de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4)	19
5.1.5. Desacetilación de 4 para llegar a la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)	20
5.1.6. Síntesis de los compuestos derivados de la 3 β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona 6a-h	21



5.2. Parte biológica	26
5.2.1. Ensayo <i>in vitro</i>	26
5.2.2. Ensayo <i>in vivo</i>	28
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	30
6.1. Parte química	30
6.2. Parte biológica	41
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44
ANEXOS	49



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Próstata sana y afectada por un tumor	1
Figura 2. Aparato reproductor masculino	3
Figura 3. Estructura de los bloqueadores $\alpha 1$	4
Figura 4. Antiandrógenos esteroidales y no esteroidales	10
Figura 5. Estructura general de la Abiraterona	11
Figura 6. Nuevos inhibidores de la CYP17A1	11
Figura 7. Estructura de la Enzalutamida	12
Figura 8. Estructura de la finasterida (Proscar [®])	13
Figura 9. Núcleo del pregnano	14
Figura 10. Estructura de la 16-deshidropregnenolona (16-DPA)	17
Figura 11. Numeración de los compuestos 6a-h	22
Figura 12. Integrales de las señales correspondientes a 16-H y 6-H para los dos estereoisómeros	32
Figura 13. Ampliación del experimento HMBC mostrando la interacción entre 19-CH ₃ y 5-C	33
Figura 14. Efecto anisotrópico del anillo aromático y estructura resonante del éster	37
Figura 15. Ampliación del espectro HSQC para el compuesto 6b	37
Figura 16. Ampliación del espectro ¹ H, ¹ H-COSY de 6b mostrando la interacción entre el protón 16-H y los protones 15-H	38
Figura 17. Ampliación del espectro NOESY del compuesto 6b, mostrando la interacción de 16-H con 21-CH ₃	39
Figura 18. Orientación y efecto anisotrópico del grupo carbonilo en 20-C	39
Figura 19. Espectros de RMN ¹ H, ¹ H, ¹ H-COSY y NOESY del compuesto 1	38
Figura 20. Efecto antiandrogénico sobre los nódulos pigmentados	41



ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pag.
Esquema 1. Esteroidogénesis resaltando las enzimas CYP17A1, SRD5A y $n\beta$ HSD	9
Esquema 2. Mecanismo de acción de la enzima 5α -reductasa	12
Esquema 3. Ruta sintética propuesta para acceder a los compuestos 6a-h	16
Esquema 4. Epoxidación quimioselectiva de 1	18
Esquema 5. Síntesis de 3β -acetoxi- 5ξ -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3)	19
Esquema 6. Reacción de deshidratación en las posiciones 4,5	19
Esquema 7. Desprotección del -OH en C-3	20
Esquema 8. Obtención de los productos finales 6a-h	21
Esquema 9. Posible patrón de fragmentación de la 16-DPA	30
Esquema 10. Patrón de fragmentación propuesto para el epóxido 2	31
Esquema 11. Propuesta de patrón de fragmentación de la 3β -acetoxi- 5 -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3)	34
Esquema 12. Patrón de fragmentación propuesto para los derivados 6a-h	36



ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Comparación entre las 3 isoformas de la enzima 5 α -reductasa	13
Tabla 2. Resultados de las pruebas <i>in vivo</i>	29
Tabla 3. Valores de Log P de los derivados 6a-h	42



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pag
Anexo 1.1. Espectro de UV-Vis del acetato de 16-deshidropregnenolona (1)	50
Anexo 1.2. Espectro de IR del acetato de 16-deshidropregnenolona (1)	50
Anexo 1.3. Espectro de EM-FAB del acetato de 16-deshidropregnenolona (1)	51
Anexo 1.4. Espectro de RMN ¹ H del acetato de 16-deshidropregnenolona (1)	51
Anexo 1.4. Espectro de RMN ¹³ C del acetato de 16-deshidropregnenolona (1)	52
Anexo 2.1. Espectro de UV-Vis de la 3β-acetoxi-5ξ,6ξ-epoxipregna-16-en-20-ona (2)	53
Anexo 2.2. Espectro de IR de la 3β-acetoxi-5ξ,6ξ-epoxipregna-16-en-20-ona (2)	53
Anexo 2.3. Espectro de EM-FAB de la 3β-acetoxi-5ξ,6ξ-epoxipregna-16-en-20-ona (2)	54
Anexo 2.4. Espectro de RMN ¹ H de la 3β-acetoxi-5ξ,6ξ-epoxipregna-16-en-20-ona (2)	54
Anexo 2.5. Espectro de RMN ¹³ C de la 3β-acetoxi-5ξ,6ξ-epoxipregna-16-en-20-ona (2)	55
Anexo 3.1. Espectro de UV-Vis de la 3β-acetoxi-5ξ-hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (3)	56
Anexo 3.2. Espectro de IR de la 3β-acetoxi-5ξ-hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (3)	56
Anexo 3.3. Espectro de EM-FAB de la 3β-acetoxi-5ξ-hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (3)	57
Anexo 3.4. Espectro de RMN ¹ H de la 3β-acetoxi-5ξ-hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (3)	57
Anexo 3.5. Espectro de RMN ¹³ C de la 3β-acetoxi-5ξ-hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (3)	58
Anexo 4.1. Espectro de UV-Vis de la 3β-acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4)	59
Anexo 4.2. Espectro de IR de la 3β-acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4)	59
Anexo 4.3. Espectro de EM-FAB de la 3β-acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4)	60



Anexo 4.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4)	60
Anexo 4.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4)	61
Anexo 5.1. Espectro de UV-Vis de la 3β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)	62
Anexo 5.2. Espectro de IR de la 3β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)	62
Anexo 5.3. Espectro de EM-FAB de la 3β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)	63
Anexo 5.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)	63
Anexo 5.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)	64
Anexo 6a.1. Espectro de UV-Vis de la 3β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6a)	65
Anexo 6a.2. Espectro de IR de la 3β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6a)	65
Anexo 6a.3. Espectro de EM-FAB de la 3β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6a)	66
Anexo 6a.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6a)	66
Anexo 6a.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6a)	67
Anexo 6b.1. Espectro de UV-Vis de la 3β -(<i>p</i> -fluoro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6b)	67
Anexo 6b.2. Espectro de IR de la 3β -(<i>p</i> -fluoro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6b)	68
Anexo 6b.3. Espectro de EM-FAB de la 3β -(<i>p</i> -fluoro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6b)	68
Anexo 6b.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -(<i>p</i> -fluoro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6b)	69
Anexo 6b.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -(<i>p</i> -fluoro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6b)	69
Anexo 6c.1. Espectro de UV-Vis de la 3β -(<i>p</i> -cloro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6c)	70
Anexo 6c.2. Espectro de IR de la 3β -(<i>p</i> -cloro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6c)	70



Anexo 6c.3. Espectro de EM-FAB de la 3 β -(<i>p</i> -cloro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6c)	71
Anexo 6c.4. Espectro de RMN ¹ H de la 3 β -(<i>p</i> -cloro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6c)	71
Anexo 6c.5. Espectro de RMN ¹³ C de la 3 β -(<i>p</i> -cloro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6c)	72
Anexo 6d.1. Espectro de UV-Vis de la 3 β -(<i>p</i> -bromo)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6d)	72
Anexo 6d.2. Espectro de IR de la 3 β -(<i>p</i> -bromo)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6d)	73
Anexo 6d.3. Espectro de EM-FAB de la 3 β -(<i>p</i> -bromo)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6d)	73
Anexo 6d.4. Espectro de RMN ¹ H de la 3 β -(<i>p</i> -bromo)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6d)	74
Anexo 6d.5. Espectro de RMN ¹ H de la 3 β -(<i>p</i> -bromo)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6d)	74
Anexo 6e.1. Espectro de UV-Vis de la 3 β -(<i>p</i> -metil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6e)	75
Anexo 6e.2. Espectro de IR de la 3 β -(<i>p</i> -metil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6e)	75
Anexo 6e.3. Espectro de EM-FAB de la 3 β -(<i>p</i> -metil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6e)	76
Anexo 6e.4. Espectro de RMN ¹ H de la 3 β -(<i>p</i> -metil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6e)	76
Anexo 6e.5. Espectro de RMN ¹³ C de la 3 β -(<i>p</i> -metil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6e)	77
Anexo 6f.1. Espectro de UV-Vis de la 3 β -(<i>p</i> -trifluorometil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6f)	77
Anexo 6f.2. Espectro de IR de la 3 β -(<i>p</i> -trifluorometil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6f)	78
Anexo 6f.3. Espectro de EM-FAB de la 3 β -(<i>p</i> -trifluorometil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6f)	78



Anexo 6f.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -(<i>p</i> -trifluorometil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6f)	79
Anexo 6f.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -(<i>p</i> -trifluorometil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6f)	79
Anexo 6g.1. Espectro de UV-Vis de la 3β -(<i>p</i> -formil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6g)	80
Anexo 6g.2. Espectro de IR de la 3β -(<i>p</i> -formil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6g)	80
Anexo 6g.3. Espectro de EM-FAB de la 3β -(<i>p</i> -formil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6g)	81
Anexo 6g.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -(<i>p</i> -formil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6g)	81
Anexo 6g.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -(<i>p</i> -formil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6g)	82
Anexo 6h.1. Espectro de UV-Vis de la 3β -(<i>p</i> -metoxi)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6h)	82
Anexo 6h.2. Espectro de IR de la 3β -(<i>p</i> -metoxi)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6h)	83
Anexo 6h.3. Espectro de EM-FAB de la 3β -(<i>p</i> -metoxi)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6h)	83
Anexo 6h.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -(<i>p</i> -metoxi)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6h)	84
Anexo 6h.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -(<i>p</i> -metoxi)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6h)	84



RESUMEN

El uso de antiandrógenos esteroidales ha tomado mucha importancia en el tratamiento del cáncer de próstata y de la hiperplasia prostática benigna, dos enfermedades que afectan a la población masculina de edad avanzada; ya que se ha demostrado que estas condiciones están relacionadas con la dependencia de andrógenos. El andrógeno más potente es la dihidrotestosterona, la cual se obtiene a partir de la reducción de la testosterona por acción de la enzima 5 α -reductasa.

Los derivados del núcleo del pregnano se han perfilado como candidatos prometedores en la búsqueda de nuevos compuestos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa. Así, en este trabajo se realizó la síntesis de 8 nuevos derivados pregnánicos, partiendo del acetato de 16-deshidropregnenolona, la cual se sometió a una serie de reacciones: epoxidación, oxidación, deshidratación, desacetilación y finalmente una esterificación con diferentes derivados del ácido cinámico para obtener así la nueva serie de 3 β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-dionas con grupos electro-donadores y electro-aceptores en la posición *para* del cinamato, para los cuales se presentan por primera vez sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Se evidenció que la epoxidación es estereoselectiva, y utilizando los experimentos de RMN se pudieron diferenciar las señales de los dos estereoisómeros formados y calcular su proporción. Además en los productos finales se pudo observar un desplazamiento poco convencional para uno de los hidrógenos en posición 12, debido a la orientación y el efecto anisotrópico del grupo carbonilo en la posición 20; con lo cual se pudo corroborar al analizar los espectros bidimensionales de los intermediarios, que la disposición transoide es la preferida para todos los compuestos sintetizado es este trabajo

Los resultados de actividad biológica mostraron que sólo el compuesto sin sustituyente en el anillo aromático resultó activo en las pruebas *in vitro* con una actividad comparable al fármaco de referencia y en la prueba *in vivo* del diámetro del órgano del flanco resultó ser más activo que el fármaco de referencia; los demás compuestos no mostraron actividad significativa.



1. INTRODUCCIÓN

La Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) y el cáncer de próstata constituyen en la actualidad dos enfermedades urológicas comunes entre la población masculina de edad avanzada. Con respecto al cáncer de próstata, se ha identificado como la segunda causa principal de muerte por cáncer en los hombres, después del cáncer de pulmón.

En México, según datos del INEGI; en el 2011 el cáncer de próstata fue la primera causa de muerte en hombres con un 16.9%, seguida del cáncer de bronquios y pulmón con un 12.8%.

Al analizar las tasas de mortalidad por cáncer de próstata en México, se aprecia un incremento notable con la edad, para los hombres entre 65 a 74 años el índice de mortalidad por esta enfermedad es de 69 por cada 100 mil hombres, el cual incrementa a 180 defunciones para el intervalo de 75 a 79 años y se duplica a partir de los 80 años.

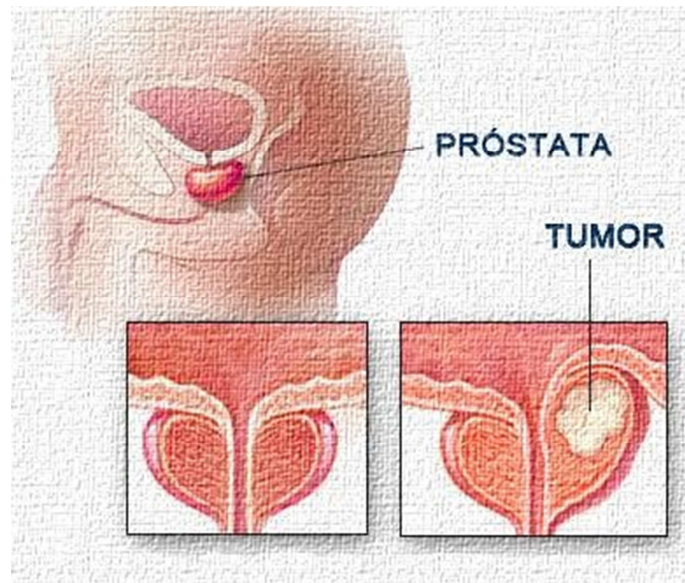


Figura 1. Próstata sana y afectada por un tumor

Para este tipo de padecimientos se han desarrollado fármacos esteroidales y no esteroidales; sin embargo, los fármacos esteroidales han tenido mayor impacto en las últimas décadas, ya que estas enfermedades están íntimamente asociadas con la dependencia de andrógenos, especialmente de dihidrotestosterona, la cual es producida a partir de testosterona por acción de la enzima 5 α -reductasa.



Introducción

Es así como en este trabajo se describe la síntesis y evaluación biológica sobre la enzima 5α -reductasa de una nueva serie de 8 derivados esteroidales basados en el esqueleto del pregnano en los cuales se incorporan en la posición 3 ésteres derivados del ácido cinámico.



2. ANTECEDENTES

2.1. Próstata

La próstata es una glándula del tamaño de una nuez, situada en la parte inferior de la vejiga, atravesada por la uretra (uretra prostática) y los conductos eyaculadores (Fig. 2). La próstata fabrica un líquido blanquecino que nutre y protege a los espermatozoides. Entre los componentes de la secreción prostática, destaca la fosfatasa alcalina, la cual aumenta con los tumores prostáticos.

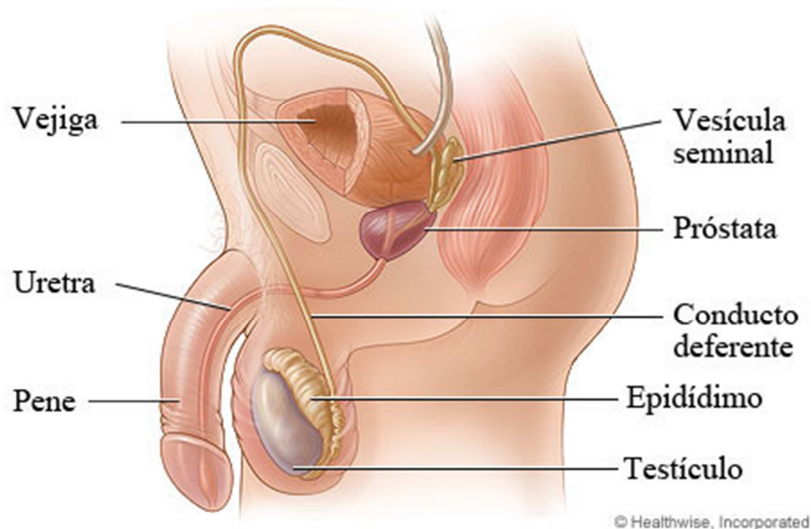


Figura 2. Aparato reproductor masculino

El interés médico de esta estructura se debe al riesgo de padecer cáncer de próstata a partir de los 55 años. Con esta enfermedad la morfología de la glándula cambia a irregular y endurecida. Además, a partir de edades medianas experimenta un aumento de tamaño benigno; la llamada Hiperplasia Prostática Benigna (HPB).¹

2.2. Hiperplasia prostática benigna (HPB)

La HPB es una enfermedad común en el hombre. A los 60 años de edad un 50% de los varones presentan hallazgos microscópicos de HPB y se estima que el 90% lo sufre a los 85 años. Es una enfermedad lentamente progresiva y su sintomatología puede fluctuar en el tiempo.² Se define como un aumento de la glándula prostática.³ Los síntomas del tracto urinario inferior son causadas por la interferencia con la función del esfínter muscular y obstrucción del flujo de orina a través de la uretra prostática.⁴



La causa de la HPB no está bien definida. Diversos estudios la relacionan a una proliferación de las células prostáticas que deriva de una disminución de la proporción testosterona/estrógenos; produciéndose un aumento en la tasa de conversión de testosterona a dihidrotestosterona (DHT) por la 5α -reductasa y la acumulación de DHT favorece la proliferación de las células y, por último, la hipertrofia de la glándula.² Estudios de otros factores de riesgo han mostrado resultados contradictorios; pero se han propuesto la obesidad, hipertensión y diabetes como factores de riesgo. La vasectomía y la actividad sexual no han mostrado tener influencia.⁵

La elección del tratamiento apropiado se basa en la severidad de los síntomas, en que tanto afectan el estilo de vida del paciente y en la presencia de cualquier otra condición médica. En general, la primera etapa del tratamiento incluye un control del paciente, llamado, terapia expectante, en la cual se observa la evolución de la enfermedad. Las opciones de tratamiento incluyen: uso de diferentes medicamentos y diversos tipos de cirugía.⁶

- **Medicamentos**

Bloqueadores $\alpha 1$: La terapia actual puede incluir el uso de bloqueadores $\alpha 1$, los cuales también son utilizados en el tratamiento de la hipertensión arterial. La función de estos compuestos (Fig. 3) es relajar los músculos del cuello de la vesícula y facilitar la micción; dos tercios de las personas tratadas con estos bloqueadores manifiestan mejoría de los síntomas.

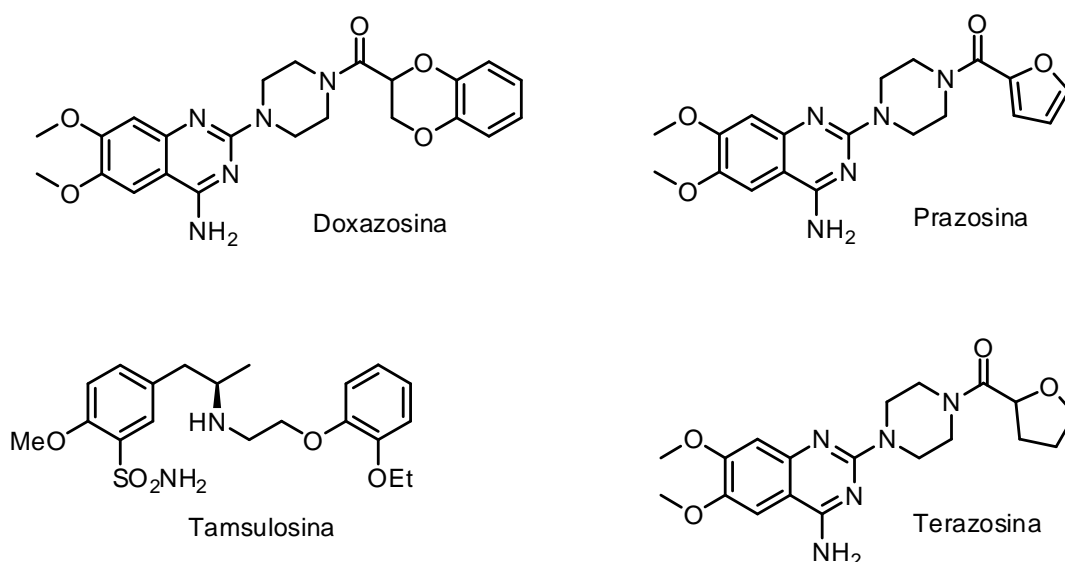


Figura 3. Estructura de los bloqueadores $\alpha 1$



Otro tipo de medicamentos son los inhibidores de la enzima 5 α -reductasa, de los cuales se profundizará en un apartado posterior.

- **Cirugía**

La cirugía se aconseja generalmente en los casos con síntomas de incontinencia, hematuria recurrente, retención urinaria e infecciones urinarias recurrentes. La elección del tipo de procedimiento quirúrgico se basa en la severidad de los síntomas y el tamaño y forma de la próstata.

2.3. Cáncer de próstata

En la próstata se encuentran varios tipos de células, pero casi todos los casos de cáncer de próstata se desarrollan a partir de las células glandulares. Las células glandulares producen el líquido de la próstata que se agrega al semen. El término médico para un cáncer que comienza en las células glandulares es *adenocarcinoma*.⁷

Los adenocarcinomas de próstata se consideran tumores genitales masculinos y ocurren principalmente en hombres de avanzada edad; este adenocarcinoma es extremadamente raro en hombres menores de 30 años.⁸

El cáncer de próstata tiene la prevalencia más alta que cualquier cáncer no cutáneo en el cuerpo humano, la probabilidad de focos neoplásicos dentro de la próstata es similar en hombres de todo el mundo, independiente de la dieta, ocupación, estilo de vida u otros factores. Esencialmente todos los hombres con andrógenos circulantes desarrollarán cáncer de próstata microscópico si viven lo suficiente.

Determinar qué hombres están en mayor riesgo de desarrollar cáncer de próstata ha sido un gran problema; identificar qué factores influyen en el desarrollo de esta enfermedad es de mucha importancia para los esfuerzos de salud pública.⁴

Es así como muchos estudios se han enfocado en determinar dichos factores de riesgo, aunque en algunos casos no está clara la asociación de estos factores con la posibilidad de desarrollar cáncer de próstata.

2.3.1. Factores de riesgo

- **Edad**

El cáncer de próstata está estrechamente relacionado con la edad, rara vez aparece antes de los 40 años, y por lo general es identificado en los hombres alrededor de los 70 años. Esta vinculación extraordinaria con la edad sugiere que



el cáncer de próstata puede resultar de la acumulación de daño genético, quizás debido a estrés oxidativo o de otros factores endógenos o exógenos.

- **Historial familiar**

La historia familiar se asocia de forma significativa con el riesgo de cáncer de próstata en estudios epidemiológicos.⁹ Una característica de los carcinomas hereditarios es la combinación de diferentes tipos de cáncer en una familia, causados por una sola mutación de un gen con susceptibilidad al cáncer.¹⁰

Se ha demostrado una considerable elevación en el riesgo de desarrollar cáncer de próstata en aquellos hombres con un pariente de primer o segundo orden afectado por esta enfermedad; además, cuanto más genéticamente cercano es el hombre al pariente afectado y mayor el número de miembros de la familia afectados, el riesgo de desarrollar carcinoma de próstata se incrementa considerablemente.¹¹

- **Raza**

Las mayores tasas de incidencia de cáncer de próstata en el mundo se encuentran entre los hombres afroamericanos, que tienen un mayor riesgo que los hombres blancos americanos. Sin embargo, las diferencias raciales pueden reflejar diferencias en el acceso a la atención, las diferencias en el proceso de toma de decisiones en cuanto a si se debe buscar atención médica y el seguimiento de la misma; además de la variación polimórfica.

- **Dieta**

Una amplia variedad de factores dietéticos han sido implicados en el desarrollo del cáncer de próstata. El consumo de grasa, especialmente de grasa poliinsaturada, muestra una fuerte correlación positiva con la incidencia de cáncer de próstata y la mortalidad.⁴

2.3.2. Diagnóstico y tratamiento

La mayoría de los cánceres de próstata se detecta primero mediante la prueba sanguínea del antígeno prostático específico (PSA) o el examen digital rectal. Por lo general, los cánceres de próstata en etapas iniciales no causan síntomas, en cambio, los cánceres avanzados se pueden detectar debido a los síntomas que causan. Si de acuerdo con las pruebas de detección o los síntomas se sospecha cáncer, el diagnóstico definitivo sólo se puede hacer mediante una biopsia de la próstata.



Una vez que se haya diagnosticado y determinado la etapa del cáncer, las opciones de tratamiento pueden incluir: terapia expectante o vigilancia activa, cirugía, radioterapia, criocirugía, quimioterapia o terapia hormonal.⁷ Esta última estrategia de tratamiento es en la que está enfocada este trabajo; por lo cual se profundizará en algunos detalles.

2.3.3. Terapia hormonal

Han pasado más de 60 años desde que Huggins y Hogges publicaron su trabajo "*The Effect of Castration, of Estrogen, and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate*".¹² Estos investigadores fueron los primeros en mostrar que la paliación de la enfermedad se podría lograr con la manipulación hormonal. Los resultados de este trabajo se convirtieron en el punto de partida para el desarrollo de la terapia hormonal. En el tratamiento del cáncer avanzado de próstata hay un creciente interés en la terapia hormonal temporal antes de la prostatectomía radical definitiva o la irradiación.^{13,14}

Algunos de los métodos desarrollados son:

- **Orquiectomía (Castración)**

Consiste en la extirpación de los testículos, que son la principal fuente de testosterona, ya que allí se sintetiza aproximadamente el 90% de la misma, mientras que el 10% restante es sintetizado por las glándulas suprarrenales.¹⁵ En general, es un procedimiento quirúrgico muy seguro, aunque puede haber complicaciones menores como sangrado o infección, que también se pueden encontrar en otro tipo de cirugías. Los efectos secundarios pueden consistir en pérdida de la libido, impotencia y sofocos. El mayor inconveniente de la orquiectomía sigue siendo el aspecto psicológico.

- **Estrógenos**

Los estrógenos ejercen su efecto principalmente por retroalimentación negativa, es decir, actuando sobre el hipotálamo para suprimir la liberación de LHRH (Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante), lo que resulta en la supresión de la LH (Hormona Luteinizante) de la pituitaria anterior y por ende de testosterona.

- **Agonistas de LHRH**

La hormona liberadora de la hormona Luteinizante también es conocida como hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH).¹³ Este tipo de compuestos produce una súper-estimulación de la pituitaria.¹⁶ La regulación a la baja de los sitios



receptores en la hipófisis anterior conduce a una caída en la producción de LHRH. Con el uso de un agonista de LHRH hay un aumento transitorio inicial de la testosterona, que puede dar lugar a un empeoramiento de los síntomas durante los primeros días de la terapia.

- **Antiandrógenos**

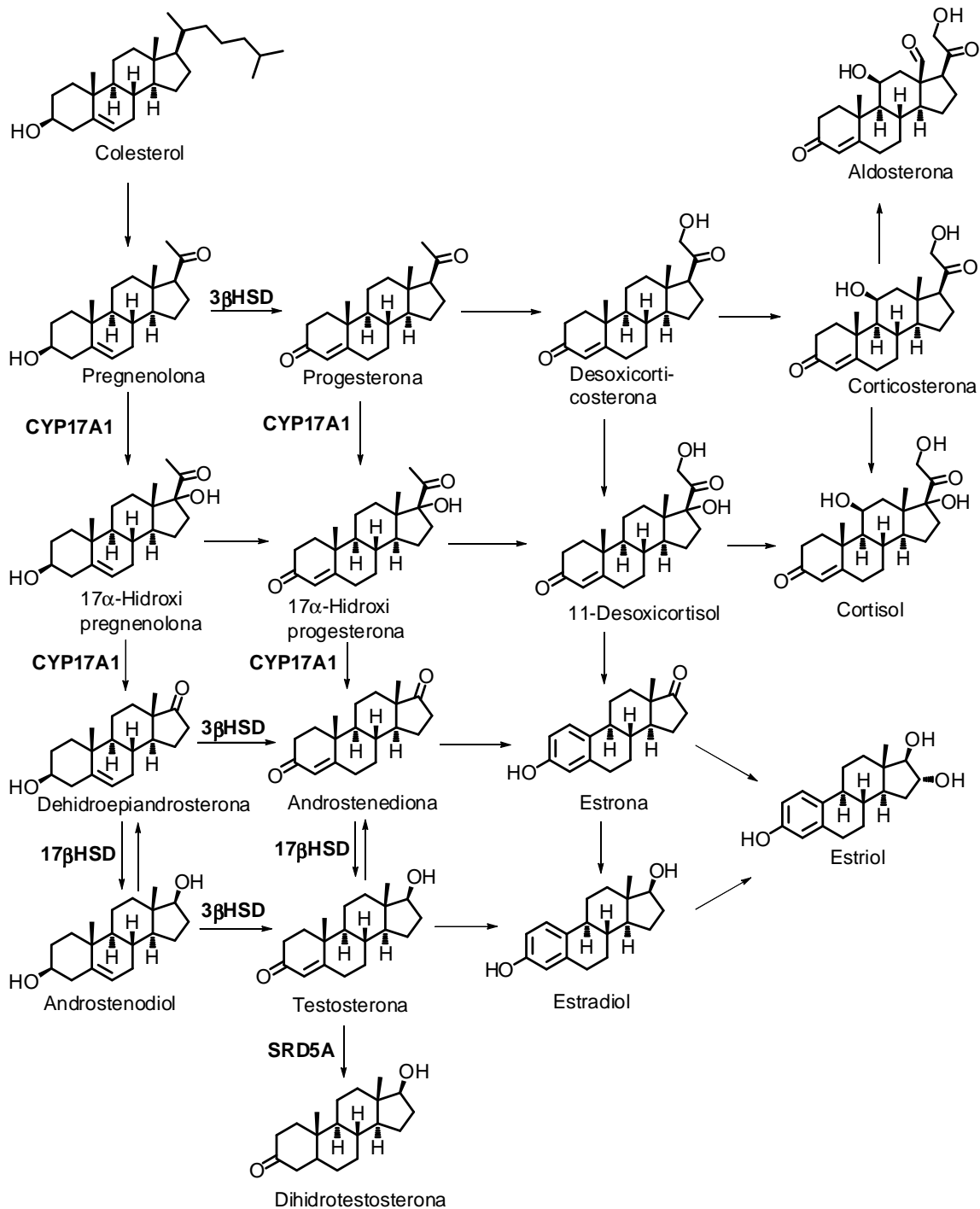
Antes de explicar la función de los antiandrógenos, es importante mencionar algunos aspectos de los andrógenos.

Los andrógenos son hormonas esteroidales derivadas del androstano (núcleo de 19 átomos de carbono) que regulan un amplio espectro de funciones, tales como la diferenciación, desarrollo y crecimiento de los órganos reproductivos masculinos así como el mantenimiento de las características sexuales secundarias.¹⁷

Los andrógenos son necesarios para el crecimiento normal y actividades funcionales de la próstata. La producción de andrógenos está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. La GnRH es secretada por el hipotálamo en pulsos, estimulando de este modo la secreción de LH de la glándula pituitaria, LH actúa sobre las células de Leydig en los testículos para iniciar la producción de andrógenos. En los hombres el principal andrógeno circulante es la testosterona.¹⁸

La esteroidogénesis comienza con la escisión irreversible de una cadena de 6 carbonos a partir del colesterol, produciendo la pregnenolona por acción del citocromo P450_{scc} (enzima de escisión de cadena lateral, CYP11A1), luego otra serie de enzimas convierten la pregnenolona en otros esteroides de 21 carbonos (incluyendo las progestinas, los glucocorticoides y mineralocorticoides), esteroides de 19 carbonos (androstanos) y esteroides de 18 carbonos (estrógenos), (Esquema 1).¹⁹

En la próstata, la testosterona es convertida al andrógeno más potente, la dihidrotestosterona (DHT) por acción de la enzima 5 α -reductasa; tanto la testosterona como la DHT pueden unirse al receptor de andrógenos (AR) en el núcleo. Sin embargo, la DHT forma un complejo receptor-ligando más estable y es de 3 a 10 veces más potente. Una vez que el AR se une a los andrógenos, entra en un estado activo. La principal función del AR es inducir el crecimiento de las estructuras urogenitales masculinas. Los andrógenos juegan un papel importante en la carcinogénesis del cáncer de próstata, en especial la DHT.¹⁸



Esquema 1. Esteroidogénesis resaltando las enzimas CYP17A1, SRD5A y $n\beta$ -HSD

La función de los antiandrógenos es principalmente suprimir el papel de la DHT; al observar el esquema 1, se puede ver que hay múltiples opciones de inhibir la producción de la misma. Algunos trabajos se han enfocado en la inhibición de la



interacción entre la DHT y el receptor de andrógenos;²⁰ usando antiandrógenos tanto esteroidales,²¹ como no esteroidales (Fig. 4).²²

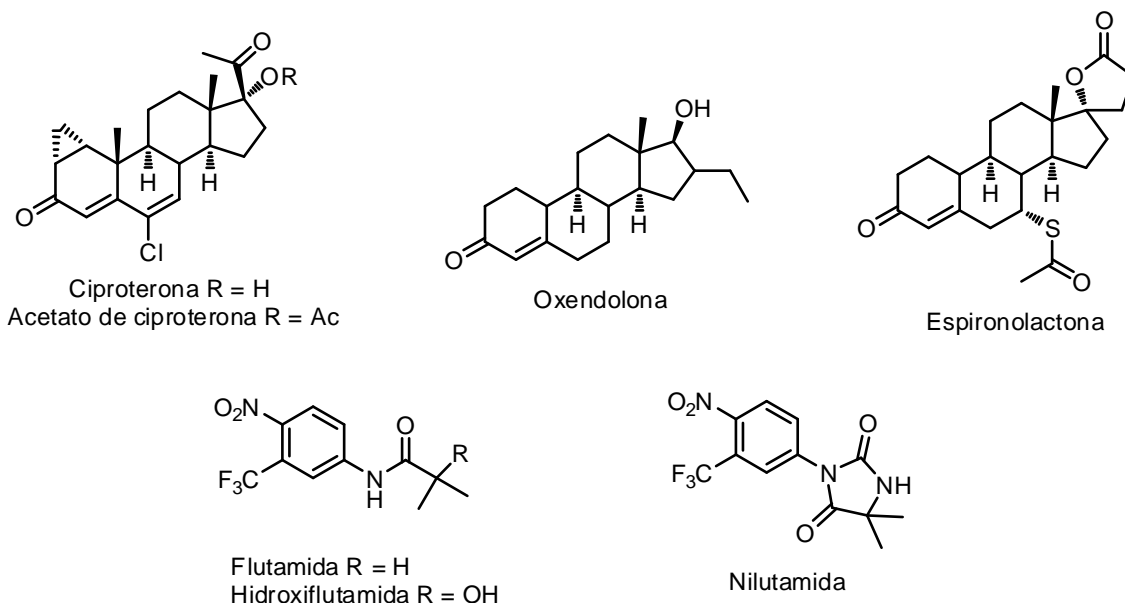
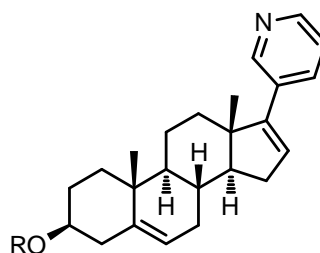


Figura 4. Antiandrógenos esteroidales y no esteroidales

De igual manera, se ha buscado inhibir la acción de la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD),^{23,24} y la enzima CYP17A1.^{19,25} Uno de los inhibidores de la CYP17A1 es la Abiraterona como alcohol libre o en forma de acetato (Fig. 5). El problema del uso de este compuesto es su baja especificidad, ya que además inhibe a la 17-hidroxilasa y no sólo a las 17,20-liasa, lo cual elimina el cortisol y provoca un aumento de la hormona adenocorticotrópica con el consiguiente aumento de desoxicorticosterona y corticosterona, imitando los efectos observados en familias con mutaciones de inactivación de CYP17A1 congénitas. El déficit de cortisol puede provocar disminución de la presión sanguínea y el rendimiento cardíaco, además, niveles elevados de precursores de corticosterona que tienen propiedades de mineralocorticoides pueden provocar hipocalemia, hipertensión y retención de líquidos. Para prevenir los efectos secundarios, se utilizan dos estrategias: (i) la administración de glucocorticoides exógenos para evitar el aumento de la hormona adenocorticotrópica y (ii) la administración de antagonistas de los receptores mineralocorticoides.



Abiraterona R = H
Acetato de abiraterona R = Ac

Figura 5. Estructura general de la abiraterona

Teniendo en cuenta los inconvenientes de la inhibición de la 17 α -hidroxilasa, hay un interés considerable en el desarrollo de nuevos inhibidores de CYP17A1 específicos para la 17,20-liasa; se ha encontrado un grupo de compuestos entre los que sobresalen el orteronel (TAK-700) el cual inhibe la actividad de la 17,20-liasa 5.4 veces más que la 17 α -hidroxilasa y la galeterona (Fig. 6), la cual alcanza una actividad inhibitoria 60 veces mayor para la 17,20-liasa sobre la 17 α -hidroxilasa, además está última también inhibe al receptor de andrógenos y a la enzima 5 α -reductasa.¹⁹

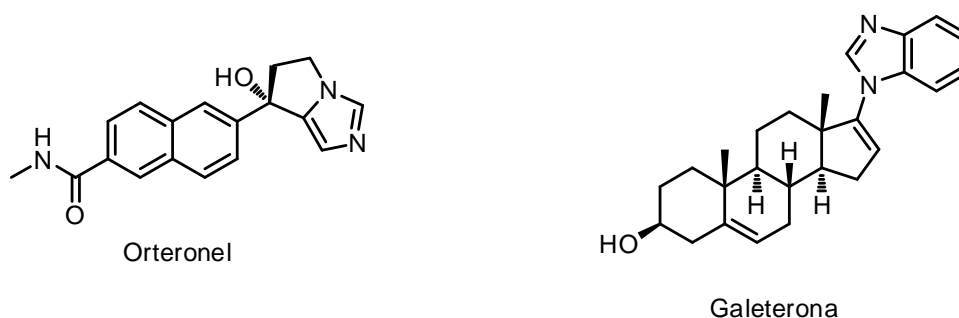


Figura 6. Nuevos inhibidores de la CYP17A1

Recientemente, se ha incorporado al arsenal de antiandrógenos, la enzalutamida, la cual fue seleccionada de una amplia biblioteca de compuestos para el desarrollo clínico debido a su alta afinidad con el AR. La enzalutamida fue aprobada para ser usada en el tratamiento contra el cáncer de próstata resistente a castración (CRPC),²⁶ ya que, a pesar de que los pacientes muestren una excelente respuesta inicial al alguno de los tratamientos mencionados anteriormente, en algunos casos, después de 2 – 3 años se produce una recaída con la aparición del CRPC. El tratamiento para esta afección ha estado limitado al uso del docetaxel,²⁷ y en otros casos a la abiraterona.²⁸



La introducción de la enzalutamida (Fig. 7) ha resultado promisoriosa ya que este nuevo compuesto ha demostrado, además de su alta afinidad con el AR, una actividad antitumoral significativa contra el cáncer de próstata metastático resistente a la castración, mostrando así que es efectivo independientemente del estado del tumor;²⁹ también, el tratamiento con enzalutamida, a diferencia de la Abiraterona, no requiere de la administración de glucocorticoides.

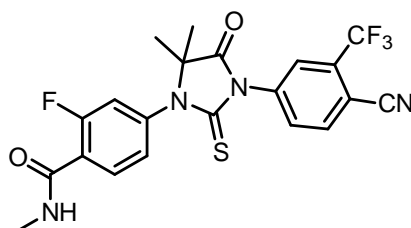
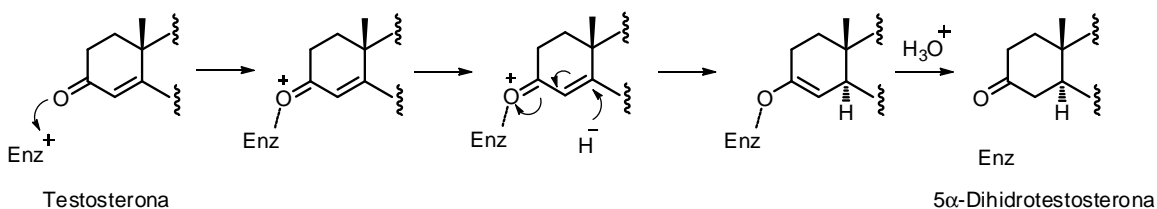


Figura 7. Estructura de la enzalutamida

En nuestro grupo de investigación el trabajo se ha centrado en la inhibición de la enzima 5 α -reductasa (SRD5A); por lo cual se ahondará sobre esta en el siguiente apartado.

2.4. Enzima 5 α -reductasa

La enzima 5 α -reductasa es una enzima NADPH dependiente, su función es catalizar la reducción irreversible y estereoselectiva de testosterona a dihidrotestosterona (Esquema 2). El mecanismo de esta transformación empieza con la formación de un complejo entre la enzima y el cofactor NADPH; posteriormente la testosterona se une a este complejo. Una vez unida, se realiza una transferencia regio y estereoselectiva de un hidruro del cofactor a la posición 5 de la testosterona. El enolato formado libera la DHT por tautomerismo ceto-enólico regenerando el complejo, como 5 α -reductasa-NADP⁺, y finalmente la enzima se regenera liberando al cofactor oxidado NADP⁺.³⁰



Esquema 2. Mecanismo de acción de la enzima 5 α -reductasa

Existen 3 isoformas de esta enzima, codificadas como SRD5A1, SRD5A2 y SRD5A3. La de tipo I consta de 259 aminoácidos y se expresa en la piel y el hígado. La de tipo II consta de 254 aminoácidos y predomina en la próstata.³¹ La de tipo III consta de 318 aminoácidos, la homología entre las isoenzimas I y II es



de aproximadamente 47% mientras que entre I y III es de 19% y de 20% entre II y III.³² A continuación se muestra una tabla comparativa entre las 3 isoformas de esta enzima.

Tabla 1. Comparación entre las 3 isoformas de la enzima 5 α -reductasa

Características	Isoenzima I	Isoenzima II	Isoenzima III
No. De Aminoácidos	259	254	318
pH óptimo	5.0 – 5.5	6.0 – 7.0	6.5 – 6.9
Peso molecular (KDa)	29.5	28.4	---
Gen responsable	5p15	2p23	4q12

En muchos trabajos se reporta que en el cáncer de próstata la expresión de la isoenzima tipo I incrementa y la tipo II disminuye en comparación con la próstata sana y la HPB. Recientemente se demostró que la expresión de la isoenzima tipo III se aumenta en cáncer de próstata y más importante aún, en cáncer de próstata resistente a castración.^{33,34}

2.4.1. Inhibiendo a la enzima 5 α -reductasa

Una gran cantidad de inhibidores de la enzima 5 α -reductasa han sido descritos, pero son los inhibidores de tipo esteroidal los que han repercutido con mayor fuerza ya que han mostrado actividad inhibitoria importante.³⁵⁻³⁹ Entre estos, sobresale la finasterida (Proscar[®]) (Fig. 8). La cual ha mostrado ser un potente inhibidor de esta enzima;^{40,41} Sin embargo, la administración de este compuesto ha mostrado efectos secundarios como disminución de la libido y del volumen de eyaculación.⁴²

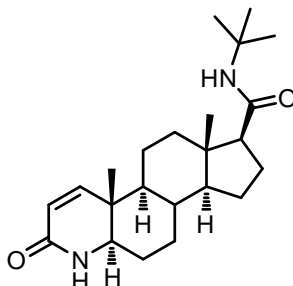


Figura 8. Estructura de la finasterida (Proscar[®])



Es por esto que diferentes trabajos se han enfocado en la búsqueda de nuevos derivados esteroidales que puedan inhibir a esta enzima sin provocar efectos secundarios tan importantes. Entre los diferentes núcleos estudiados, sobresalen los derivados del pregnano (Fig. 9); debido a que ya se ha reportado que estos presentan actividad anticancerígena;⁴³⁻⁴⁶ y en especial se ha demostrado la actividad contra la enzima 5 α -reductasa.⁴⁷⁻⁴⁹

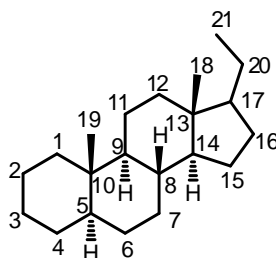


Figura 9. Núcleo del pregnano

Es así como teniendo como referencia el trabajo realizado por Alejandra Chávez,⁴¹ en el cual se incorporan derivados del ácido benzoico en la posición 3 de un sistema basado en el esqueleto del pregnano, en este trabajo se propone el uso de la estrategia de vinílogos,⁵⁰ incorporando derivados del ácido cinámico en esta misma posición para así comparar el efecto de la inserción de un nuevo doble enlace en los compuestos previamente sintetizados.

La estrategia de vinílogos es una de las metodologías utilizadas en la optimización de la interacción de fármacos con su receptor, se basa en la idea de que si se tiene un fármaco con 2 puntos importantes de unión al receptor, al alargar la distancia entre estos dos sitios, es posible mejorar la actividad biológica, siempre y cuando el receptor lo permita.⁵⁰ Los resultados de este trabajo, aportarán información importante sobre los requerimientos estéricos del sitio activo de la enzima 5 α -reductasa.

Además, es importante resaltar que diferentes sistemas derivados del ácido cinámico han mostrado tener una actividad anticancerígena importante,⁵¹⁻⁵⁴ pero son pocos los reportes en la literatura especializada que describen la fusión de estos dos sistemas,^{55,56} por lo cual la síntesis de estos híbridos resulta de gran interés para conocer aún más los requerimientos estructurales para el diseño de nuevos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.



3. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta la importante actividad biológica mostrada por los derivados del pregnano en trabajos anteriores, se espera que utilizando la estrategia de vinílogos, funcionalizando la posición C-3 con derivados del ácido cinámico se obtenga información importante sobre los requerimientos espaciales del sitio activo de la enzima 5 α -reductasa.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Sintetizar una nueva serie de compuestos esteroidales basados en el esqueleto del pregnano con una función éster en C-3 con derivados del ácido cinámico utilizando una secuencia la secuencia de reacción: epoxidación, oxidación, deshidratación, desacetilación y esterificación con el fin de analizar la influencia de la elongación del sustituyente en C-3 en la actividad inhibitoria sobre la enzima 5 α -reductasa.

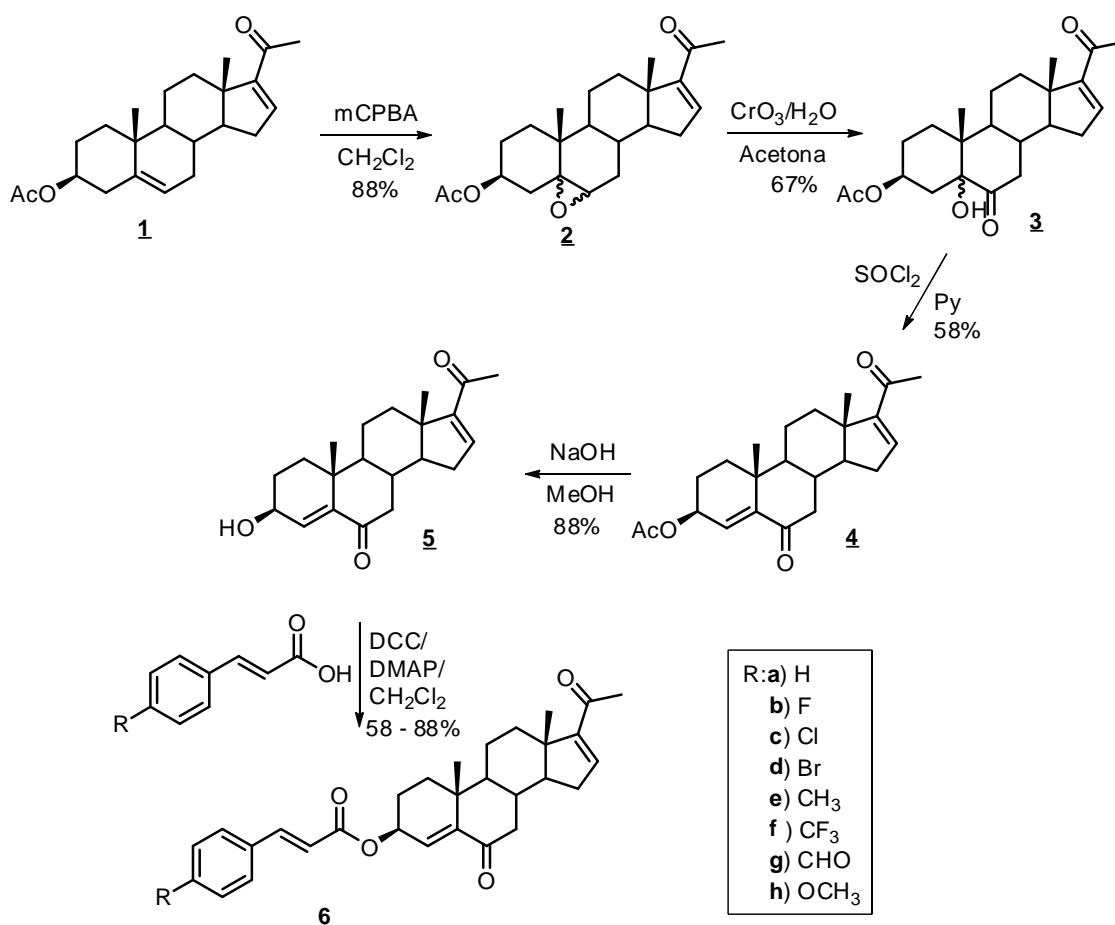
4.2. Objetivos Específicos

- Epoxidar el enlace doble en 5,6 del acetato de 16-deshidropregnenolona para así acceder al 3 β -acetoxi-5 ξ ,6 ξ -epoxipregna-16-en-20-ona **2**.
- Oxidar el compuesto **2** en 5,6 para obtener el derivado 3 β -acetoxi-5 ξ -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (**3**).
- Sintetizar el intermediario 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**4**), por medio de una deshidratación en 4,5.
- Desacetilar el hidroxilo en C-3, para llegar a la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**5**).
- Preparar los 8 productos finales **6a-h** esterificando con derivados del ácido cinámico en la posición 3.
- Purificar y caracterizar todos los intermediarios y productos finales utilizando las técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.
- Evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados sobre la enzima 5 α -reductasa.



5. PARTE EXPERIMENTAL

El componente experimental del presente trabajo consta de 2 partes. En la primera parte se describe la síntesis y caracterización de los intermediarios y productos finales sintetizados empleando la metodología mostrada en el Esquema 3. La segunda parte muestra la metodología utilizada para hacer los ensayos *in vitro* sobre la enzima 5 α -reductasa de humanos e *in vivo* en hámsteres castrados usando los ensayos sobre el órgano del flanco, la próstata y las vesículas seminales.



Esquema 3. Ruta sintética propuesta para acceder a los compuestos 6a-h

5.1. Parte química

Los reactivos empleados en las diferentes reacciones fueron de grado para síntesis de las marcas Aldrich y J.T. Baker. Los disolventes utilizados en las reacciones, recristalizaciones y como mezcla de eluyentes en las purificaciones por cromatografía de columna fueron de la marca Química Barsa.



El control del curso de las reacciones se realizó por cromatografía de capa fina sobre cromatoplasmas de gel de sílice 60GF254 de Merck, las cuales se revelaron en una cámara UV-Vis marca Spectroline Model CM-10 a la longitud de onda de 254 nm o utilizando como revelador una solución de CoCl_2 al 2% en H_2SO_4 2N. Algunos compuestos fueron purificados por cromatografía en columna empleando gel de sílice (60 Mesh, Merck) y eluyendo con mezclas n-hexano-acetato de etilo con aumento gradual de la polaridad.

Los puntos de fusión (no corregidos) de todos los compuestos se determinaron en un fusiómetro Fisher-Johns. Los espectros de absorción UV se tomaron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo lambda 2. Los espectros de IR fueron adquiridos en un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum 400 FT-IR/FT-FIR spectrometer con un aditamento Perkin Elmer Universal ATR sampling accessory. Los espectros de masas se registraron empleando un espectrómetro de masas Thermo-Electron, modelo DFS (Double Focus Sector) con un analizador másico de doble sector, mediante la técnica FAB con bombardeo de iones de cesio a una temperatura de cámara menor a $50\text{ }^\circ\text{C}$ mediante la detección de iones positivos. Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron obtenidos utilizando equipos Varian Unity Inova 300 MHz, Varian VNMRS 400 MHz y Varian MR 400, usando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente.

Teniendo en cuenta que en los espectros de masas obtenidos con la técnica de FAB aparecen, otras señales correspondientes a la matriz (alcohol *p*-nitrobencílico); cabe resaltar que las abundancias relativas se calcularon sin tener en cuenta las señales de la matriz.

5.1.1. Purificación del acetato de 16-deshidropregnenolona (16-DPA) 1

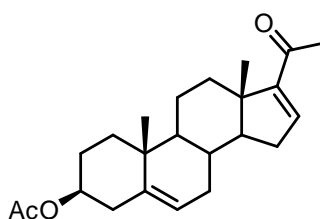


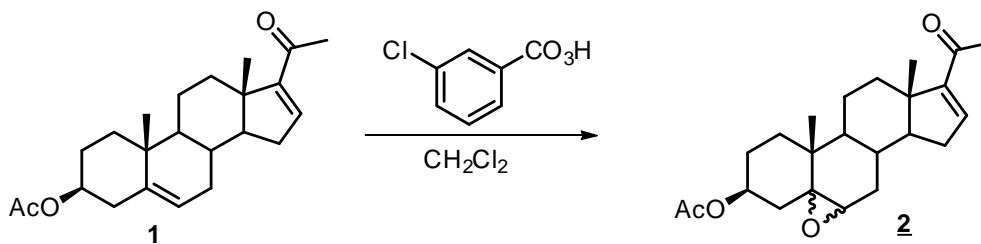
Figura 10. Estructura del acetato de 16-deshidropregnenolona (16-DPA)

La 16-DPA (Fig. 10) se recristalizó de metanol; obteniéndose la materia prima pura, $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_3$ (356.24 g/mol) como agujas blancas. P.f. $170\text{-}172\text{ }^\circ\text{C}$. $R_f = 0.83$ (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis: 244.64 (20-C=O, α,β -insaturado) nm; IR (ATR) ν_{max} : 2943 (C-H), 1728 (C=O, AcO), 1660 (20-C=O), 1584 (16-C=C) cm^{-1} ; EM FAB; m/z (% ar): 357 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 297 (55); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3); δ : 0.91 (3H, s, 18- CH_3), 1.05 (3H, s, 19- CH_3), 2.02 (3H, s, CH_3COO), 2.25 (3H, s, 21-



CH₃), 2.40 (1H, m, 12-**H_A**), 4.60 (1H, tdd, $J = 10.4, 6.2, 4.2$ Hz, 3-**H**), 5.38 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, 6-**H**), 6.70 (1H, dd, $J = 3.3, 1.2$ Hz, 16-**H**); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ : 15.7 (18-**CH₃**), 19.2 (19-**CH₃**), 21.4 (**CH₃COO**), 27.7 (21-**CH₃**), 34.7 (12-**C**), 73.9 (3-**C**), 122.0 (6-**C**), 140.3 (5-**C**), 144.4 (16-**C**), 155.4 (17-**C**), 170.5 (**COO**), 196.8 (20-**C**).

5.1.2. Obtención del 3 β -acetoxi-5 ξ ,6 ξ -epoxipregna-16-en-20-ona (**2**)

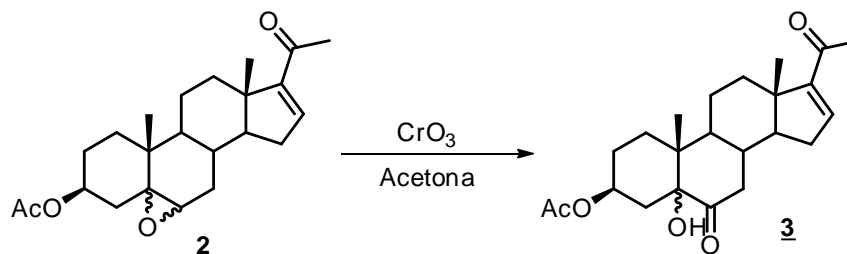


Esquema 4. Epoxidación quimioselectiva de **1**

En un matraz de bola de 100 mL se colocó 1.00 g (2.8 mmoles) de la 16-DPA y 0.97 g (5.6 mmoles) de ácido *m*-cloroperoxibenzoico en 20 mL de diclorometano. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez concluida la reacción se agregó una solución saturada de bicarbonato de sodio (40 mL) con 1 g de bisulfito de sodio. La reacción se dejó en agitación con esta solución durante 3 horas y luego se extrajo con diclorometano (3x50 mL), la fase orgánica se lavó con agua (3x50 mL) y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Finalmente se destiló el disolvente a presión reducida y el residuo remanente se recrystalizó de metanol. De la recrystalización se obtuvo 0.91 g (2.4 mmol, 88%) de **2**, C₂₃H₃₂O₄ (372.23 g/mol), como cristales blancos. P.f. 173-175 °C. $R_f = 0.60$ (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis: 244.29 (20-C=O, α,β -insaturado) nm; IR (ATR) ν_{max} : 2938 (C-H), 1731 (C=O, en AcO), 1658 (20-C=O), 1237 (C-O-C, epóxido) cm⁻¹; EM FAB; m/z (% ar): 373 (62) [M+H]⁺, 329 (42), 313 (38), 225 (100); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) isómero α : δ : 0.83 (3H, s, 18-**CH₃**), 1.10 (3H, s, 19-**CH₃**), 2.00 (3H, s, **CH₃COO**), 2.23 (3H, s, 21-**CH₃**), 2.91 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, 6-**H**), 4.94 (1H, tt, $J = 11.5, 4.9$ Hz, 3-**H**), 6.66 (1H, dd, $J = 3.5, 1.9$ Hz, 16-**H**); isómero β : δ : 0.86 (3H, s, 18-**CH₃**), 1.03 (3H, s, 19-**CH₃**), 2.02 (3H, s, **CH₃COO**), 2.23 (3H, s, 21-**CH₃**), 3.09 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, 6-**H**), 4.75 (1H, m, 3-**H**), 6.67 (1H, dd, $J = 3.7, 1.9$ Hz, 16-**H**); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) isómero α : δ : 15.6 (18-**CH₃**), 15.8 (19-**CH₃**), 21.3 (**CH₃COO**), 27.1 (21-**CH₃**), 58.7 (6-**C**), 65.4 (5-**C**), 71.2 (3-**C**), 144.1 (16-**C**), 155.1 (17-**C**), 170.2 (**COO**), 196.7 (20-**C**); isómero β : δ : 15.7 (18-**CH₃**), 17.0 (19-**CH₃**), 21.4 (**CH₃COO**), 27.2 (21-**CH₃**), 62.7 (5-**C**), 63.2 (6-**C**), 71.2 (3-**C**), 144.1 (16-**C**), 155.2 (17-**C**), 170.5 (**COO**), 196.7 (20-**C**).



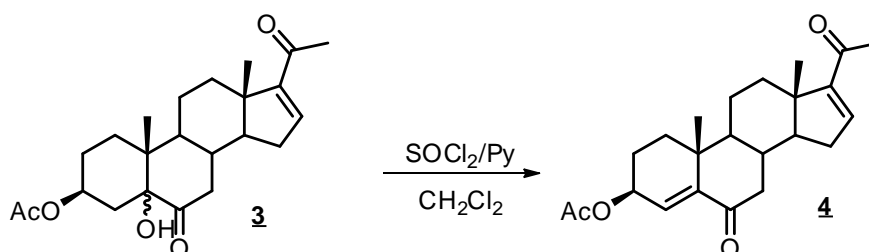
5.1.3. Oxidación de **2** para acceder a la 3β-acetoxi-5ξ-hidroxipregna-16-en-6,20-diona (**3**)



Esquema 5. Síntesis de 3β-acetoxi-5ξ-hidroxipregna-16-en-6,20-diona (**3**)

En un matraz de bola de 100 mL se agregó 1.00 g (2.7 mmoles) del compuesto **2** y se disolvió en 20 mL de acetona. En un vaso de precipitados se preparó una solución de CrO_3 (1.6 g en 10 mL de agua), la cual se adicionó en 3 tiempos con 30 minutos de diferencia al matraz que contenía el compuesto **2**. Una vez concluida la reacción se agregó hielo y se dejó precipitar el producto. Luego se filtró y se lavó con agua hasta que el compuesto quedó blanco. El producto se recristalizó de metanol obteniendo 0.69 g (1.8 mmol, 67%) de **3**, $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (388.22 g/mol) como cristales blancos. P.f. 244-245 °C. $R_f = 0.42$ (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis; 244.46 (20-C=O, α,β -insaturado) nm; IR (ATR) ν_{max} : 3353 (5-OH), 2946 (C-H), 1733 (C=O, AcO), 1701 (6-C=O), 1651 (20-C=O), 1586 (16-C=C) cm^{-1} ; EM FAB; m/z (% ar): 389 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 363 (21), 345 (32), 329 (38), 311 (48); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3); δ : 0.84 (3H, s, 18- CH_3), 0.86 (3H, s, 19- CH_3), 2.01 (3H, s, CH_3COO), 2.26 (3H, s, 21- CH_3), 2.90 (1H, t, $J = 12.1$ Hz, 7 $_{\text{A}}$ -H), 3.80 (1H, s, 5-OH), 5.04 (1H, m, 3-H), 6.70 (1H, br. s, 16-H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3); δ : 13.7 (18- CH_3), 15.7 (19- CH_3), 21.3 (CH_3COO), 27.0 (21- CH_3), 70.7 (3-C), 80.0 (5-C), 144.0 (16-C), 154.9 (17-C), 171.2 (COO), 196.7 (20-C), 212.1 (6-C).

5.1.4. Preparación de la 3β-acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**4**)



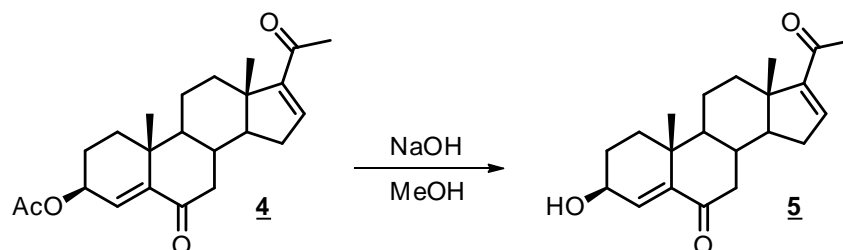
Esquema 6. Reacción de deshidratación en las posiciones 4,5

En un matraz de bola de 50 mL se colocó 1.00 g (2.6 mmoles) de **3**, se disolvió en 10 mL de diclorometano seco, bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se adicionaron



0.2 mL (2.8 mmoles) de cloruro de tionilo y 0.5 mL (6.2 mmoles) de piridina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Concluida la reacción, se agregó una solución de HCl diluido (20 mL) y se agitó por 30 minutos. Finalmente, la mezcla se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ y se extrajo con CHCl₃ (3x50 mL), la fase orgánica se lavó con suficiente agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se recrystalizó de metanol, obteniendo 0.56 g (1.5 mmol, 58%) del compuesto **4**, C₂₃H₃₀O₄ (370.21 g/mol) como cristales blancos. P.f. 193-194 °C. *R_f* = 0.53 (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis; 244.46 (6 y 20-C=O, α,β-insaturado) nm; IR (ATR) *v_{max}*: 2942 (C-H), 1734 (C=O, AcO), 1680 (6-C=O), 1658 (20-C=O) cm⁻¹; EM FAB; *m/z* (% ar): 371 (17) [M+H]⁺, 327 (33), 311 (100); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃); δ: 0.93 (3H, s, 18-CH₃), 1.06 (3H, s, 19-CH₃), 2.07 (3H, s, CH₃COO), 2.28 (3H, s, 21-CH₃), 2.48 (1H, d, *J* = 12.6, 12_A-H), 2.60 (1H, d, *J* = 12.6, 7_A-H), 5.33 (1H, m, 3-H), 6.10 (1H, br. s, 4-H), 6.71 (1H, br. s, 16-H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃); δ: 15.8 (18-CH₃), 19.6 (19-CH₃), 21.2 (CH₃COO), 27.1 (21-CH₃), 34.2 (12-C), 69.2 (3-C), 129.1 (4-C), 143.8 (16-C), 147.9 (5-C), 154.9 (17-C), 170.7 (COO), 196.6 (20-C), 201.8 (6-C).

5.1.5. Desacetilación de **4** para llegar a la 3β-hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**5**)



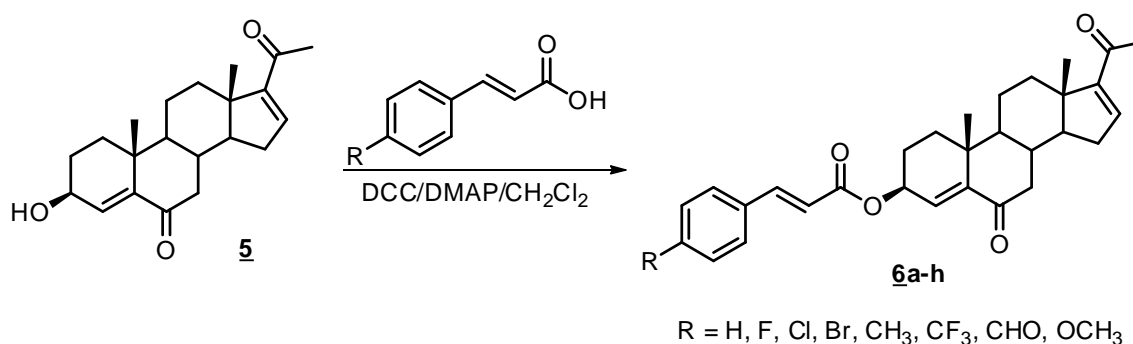
Esquema 7. Desprotección del -OH en C-3

En un matraz de bola de 250 mL se puso 1.00 g (2.7 mmoles) de **4** y se disolvió en 150 mL de metanol; se dejó en agitación hasta disolución completa y luego se agregaron 10 mL de una solución de NaOH al 2%. La mezcla resultante se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalizada la reacción se eliminó el disolvente utilizando corrientes de aire por un tiempo de 6 horas aproximadamente. El sólido resultante se lavó con agua para eliminar así el remanente de NaOH y posteriormente se sometió a purificación por cromatografía en columna, utilizando como eluyente mezclas n-hexano-acetato de etilo con incremento gradual de la polaridad y como fase estacionaria gel de sílice, aislándose así 0.78 g (0.24 mmol, 88%) del esteroide **5**, C₂₁H₂₈O₃ (328.20 g/mol), como cristales blancos. P.f. 169-170 °C. *R_f* = 0.18 (hexano:acetato de etilo; 6:4);



UV-Vis: 244.70 (6 y 20-C=O, α,β -insaturado) nm; IR (ATR) ν_{max} : 3425 (3-OH), 2941 (C-H), 1678 (6-C=O), 1650 (20-C=O) cm^{-1} ; EM FAB; m/z (% ar): 329 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 311 (40), 291 (70); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3); δ : 0.91 (3H, s, 18- CH_3), 1.03 (3H, s, 19- CH_3), 2.26 (3H, s, 21- CH_3), 2.29 (1H, ddd, $J = 17.0, 6.5, 3.4$ Hz, 15- H_A), 2.45 (1H, ddd, $J = 12.8, 4.2, 2.4$ Hz, 12- H_A), 2.57 (1H, dd, $J = 15.4, 3.8$ Hz), 4.23 (1H, m, 3- H), 6.17 (1H, m, 4- H), 6.69 (1H, dd, $J = 3.3, 1.8$ Hz, 16- H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3); δ : 15.9 (18- CH_3), 19.9 (19- CH_3), 27.2 (21- CH_3), 32.1 (15- C), 34.4 (12- C), 46.2 (7- C), 67.1 (3- C), 133.4 (4- C), 144.0 (16- C), 146.5 (5- C), 155.0 (17- C), 196.8 (20- C), 202.5 (6- C).

5.1.6. Síntesis de los compuestos derivados de la 3 β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona 6a-h



Esquema 8. Obtención de los productos finales 6a-h

En un matraz de bola de 50 mL se agregaron 1.8 mmoles del derivado de ácido cinámico correspondiente, 0.30 g (1.4 mmoles) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, 0.20 g (1.6 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina y 10 mL de CH_2Cl_2 , la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta observar turbidez; en este punto se agregaron 0.6 mmoles del intermediario **5** y se dejó en agitación durante 60-90 minutos. Terminada la reacción, se agregaron 30 mL de acetato de etilo para así inducir la precipitación de la *N,N'*-diciclohexilurea formada en la reacción. Una vez filtrada la DCU, se evaporó el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se dejó agitando durante media hora con una solución 1:1 de *n*-hexano-metanol, usando acetato de etilo como codisolvente y se filtró. El residuo obtenido se recrystalizó de metanol para obtener así los productos deseados **6a-h** con rendimientos entre el 58 – 88%. El análisis por RMN se realizó utilizando la numeración mostrada en la figura 11.

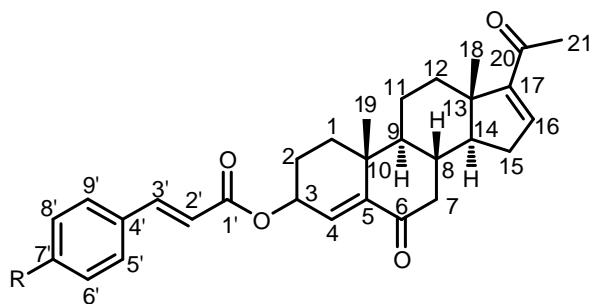


Figura 11. Numeración de los compuestos 6a-h

5.1.6.1. 3β-cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6a). De 0.27 g (1.8 mmoles) del ácido cinámico, 0.20 g (0.6 mmoles) de **5**, 0.30 g (1.4 mmoles) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, 0.20 g (1.6 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina y 10 mL de CH₂Cl₂ y después de 90 minutos, se obtuvieron 0.18 g (0.38 mmoles, 65%) del producto, C₃₀H₃₄O₄ (458.25 g/mol) como cristales blancos; p.f. 204 – 205 °C; *R_f* = 0.62 (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis: 276.47 (cinamato), 238.57 (6 y 20-C=O, α,β-insaturado), 222.07 (COO, α,β-insaturado), 204.06 (COO) nm; IR (ATR) *v_{max}*: 3052 (Ar-H), 2948 (C-H), 1713 (C=O, en C-3), 1686 (6-C=O), 1661 (20-C=O), 1586 (Ar-C=C-), 1160 (=C-COO) cm⁻¹; EM FAB; *m/z* (% ar): 459 (30) [M+H]⁺, 311 (100), 131 (97); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃); δ: 0.93 (3H, s, 18-CH₃), 1.09 (3H, s, 19-CH₃), 2.27 (3H, s, 21-CH₃), 2.32 (1H, ddd, *J* = 17.0, 6.4, 3.2 Hz, 15_A-H), 2.48 (1H, dd, *J* = 12.2, 2.4 Hz, 12_A-H), 2.60 (1H, m, 7_A-H), 5.47 (1H, ddd, *J* = 8.6, 6.3, 2.1 Hz, 3-H), 6.17 (1H, br. s, 4-H), 6.42 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, 2'-H), 6.70 (1H, br. s, 16-H), 7.39 (3H, m, 6'-H, 7'-H y 8'-H), 7.52 (2H, dd, *J* = 4.0, 2.1 Hz, 5'-H y 9'-H), 7.70 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, 3'-H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃); δ: 15.9 (18-CH₃), 19.7 (19-CH₃), 27.2 (21-CH₃), 32.0 (15-C), 34.4 (12-C), 46.2 (7-C), 69.4 (3-C), 118.01 (2'-C), 128.2 (6'-C y 8'-C), 129.0 (5'-C y 9'-C), 129.3 (4-C), 130.5 (4'-C), 134.4 (7'-C), 143.9 (16-C), 145.3 (3'-C), 148.1 (5-C), 155.0 (17-C), 166.6 (1'-C), 196.7 (20-C), 202.0 (6-C).

5.1.6.2. 3β-(*p*-fluoro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6b). De 0.30 g (1.8 mmoles) del ácido *p*-fluorocinámico, 0.20 g (0.6 mmoles) de **5**, 0.30 g (1.4 mmoles) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, 0.20 g (1.6 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina y 10 mL de CH₂Cl₂ y después de 60 minutos, se obtuvieron 0.21 g (0.45 mmoles, 75%) del producto, C₃₀H₃₃FO₄ (476.24 g/mol) como cristales blancos; p.f. 193 – 194 °C; *R_f* = 0.62 (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis: 276.33 (*p*-fluorocinamato), 240.20 (6 y 20-C=O, α,β-insaturado), 222.66 (COO, α,β-insaturado), 204.47 (COO) nm; IR (ATR) *v_{max}*: 3054 (Ar-H), 2939 (C-H), 1707 (C=O, en C-3), 1687 (6-C=O), 1654 (20-C=O), 1585 (Ar-C=C-), 1156 (=C-COO), 824 (C-F) cm⁻¹; EM FAB; *m/z* (% ar): 477 (39) [M+H]⁺, 311 (100), 149 (84); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 0.93 (3H, s, 18-CH₃), 1.08 (3H, s, 19-CH₃), 2.27 (3H, s,



21-CH₃), 2.31 (1H, ddd, $J = 17.0, 6.5, 3.4$ Hz, 15_A-H), 2.47 (1H, dd, $J = 10.8, 1.7$ Hz, 12_A-H), 2.60 (1H, dd, $J = 15.0, 3.3$ Hz, 7_A-H), 5.46 (1H, ddd, $J = 9.8, 6.3, 1.9$ Hz, 3-H), 6.16 (1H, br. s, 4-H), 6.34 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 2'-H), 6.70 (1H, m, 16-H), 7.07 (2H, dd, $J = 8.6, 8.6$ Hz, 6'-H y 8'-H), 7.51 (2H, dd, $J = 8.6, 5.4$ Hz, 5'-H y 9'-H), 7.65 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 3'-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 15.9 (18-CH₃), 19.8 (19-CH₃), 27.3 (21-CH₃), 32.0 (15-C), 34.3 (12-C), 46.2 (7-C), 69.5 (3-C), 116.2 (d, $J = 22.0$ Hz, 6'-C y 8'-C), 117.8 (2'-C), 129.3 (4-C), 130.1 (d, $J = 8.5$ Hz, 5'-C y 9'-C), 130.7 (d, $J = 3.4$ Hz, 4'-C), 143.9 (16-C), 144.0 (3'-C), 148.2 (5-C), 155.0 (17-C), 164.1 (d, $J = 251.5$ Hz, 7'-C), 166.5 (1'-C), 196.7 (20-C), 202.0 (6-C).

5.1.6.3. 3β-(*p*-cloro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6c). De 0.33 g (1.8 mmoles) del ácido *p*-clorocinámico, 0.20 g (0.6 mmoles) de **5**, 0.30 g (1.4 mmoles) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, 0.20 g (1.6 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina y 10 mL de CH₂Cl₂ y después de 60 minutos, se obtuvieron 0.20 g (0.41 mmoles, 68%) del producto, C₃₀H₃₃ClO₄ (492.21 g/mol) como cristales blancos; p.f. 203 – 204 °C; $R_f = 0.62$ (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis: 283.52 (*p*-clorocinamato), 236.86 (6 y 20-C=O, α,β-insaturado), 225.45 (COO, α,β-insaturado), 207.46 (COO) nm; IR (ATR) ν_{max} : 3054 (Ar-H), 2940 (C-H), 1710 (C=O, en C-3), 1685 (6-C=O), 1656 (20-C=O), 1584 (Ar-C=C-), 1159 (=C-COO), 817 (C-Cl) cm⁻¹; EM FAB; m/z (% ar): 493 (15) [M+H]⁺, 311 (50), 165 (100); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃); δ: 0.93 (3H, s, 18-CH₃), 1.08 (3H, s, 19-CH₃), 2.27 (3H, s, 21-CH₃), 2.31 (1H, ddd, $J = 17.0, 6.5, 3.3$ Hz, 15_A-H), 2.48 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, 12_A-H), 2.60 (1H, dd, $J = 14.4, 2.7$ Hz, 7_A-H), 5.46 (1H, ddd, $J = 8.6, 6.3, 1.6$ Hz, 3-H), 6.16 (1H, br. s, 4-H), 6.38 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 2'-H), 6.70 (1H, m, 16-H), 7.36 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 6'-H y 8'-H), 7.45 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 5'-H y 9'-H), 7.64 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 3'-H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃); δ: 15.9 (18-CH₃), 19.7 (19-CH₃), 27.2 (21-CH₃), 32.0 (15-C), 34.3 (12-C), 46.2 (7-C), 69.6 (3-C), 118.6 (2'-C), 129.2 (6'-C y 8'-C), 129.3 (5'-C y 9'-C), 129.4 (4-C), 132.9 (4'-C), 136.4 (7'-C), 143.8 (16-C), 144.0 (3'-C), 148.2 (5-C), 155.0 (17-C), 166.3 (1'-C), 196.7 (20-C), 202.0 (6-C).

5.1.6.4. 3β-(*p*-bromo)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6d). De 0.42 g (1.8 mmoles) del ácido *p*-bromocinámico, 0.20 g (0.6 mmoles) de **5**, 0.30 g (1.4 mmoles) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, 0.20 g (1.6 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina y 10 mL de CH₂Cl₂ y después de 70 minutos, se obtuvieron 0.21 g (0.39 mmoles, 65%) del producto, C₃₀H₃₃BrO₄ (536.16 g/mol) como cristales blancos; p.f. 203 – 204 °C; $R_f = 0.60$ (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis: 284.96 (*p*-bromocinamato), 222.66 (COO, α,β-insaturado) nm; IR (ATR) ν_{max} : 3046 (Ar-H), 2949 (C-H), 1711 (C=O, en C-3), 1687 (6-C=O), 1665 (20-C=O), 1586 (Ar-C=C-), 1171 (=C-COO), 818 (C-Br) cm⁻¹; EM FAB; m/z (% ar): 537 (20) [M+H]⁺, 311 (100), 209 (44); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃); δ: 0.91 (3H, s, 18-CH₃), 1.06 (3H, s, 19-CH₃), 2.25 (3H, s, 21-CH₃), 2.47 (1H, dd, $J = 12.7, 1.5$ Hz, 12_A-H), 2.60 (1H, m, 7_A-H),



5.45 (1H, m, 3-H), 6.14 (1H, m, 4-H), 6.39 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 2'-H), 6.69 (1H, m, 16-H), 7.36 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 6'-H y 8'-H), 7.50 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 5'-H y 9'-H), 7.61 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 3'-H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3); δ : 15.9 (18- CH_3), 19.7 (19- CH_3), 27.2 (21- CH_3), 32.0 (15-C), 34.2 (12-C), 46.1 (7-C), 69.6 (3-C), 118.71 (2'-C), 124.7 (6'-C y 8'-C), 129.1 (5'-C y 9'-C), 129.6 (4-C), 132.2 (4'-C), 133.3 (7'-C), 143.9 (16-C), 143.9 (3'-C), 148.1 (5-C), 154.9 (17-C), 166.3 (1'-C), 196.6 (20-C), 201.9 (6-C).

5.1.6.5. 3 β -(*p*-metil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6e). De 0.30 g (1.8 mmoles) del ácido *p*-metilcinámico, 0.20 g (0.6 mmoles) de **5**, 0.30 g (1.4 mmoles) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, 0.20 g (1.6 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina y 10 mL de CH_2Cl_2 y después de 90 minutos, se obtuvieron 0.18 g (0.38 mmoles, 63%) del producto, $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{O}_4$ (472.26 g/mol) como cristales blancos; p.f. 191 – 191 °C; $R_f = 0.58$ (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis: 284.83 (*p*-metilcinamato), 226.81 (COO, α,β -insaturado), 207.64 (COO) nm; IR (ATR) ν_{max} : 3031 (Ar-H), 2939 (C-H), 1698 (C=O, en C-3), 1686 (6-C=O), 1665 (20-C=O), 1589 (Ar-C=C-), 1167 (=C-COO) cm^{-1} ; EM FAB; m/z (% ar): 473 (18) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 311 (47), 145 (100); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3); δ : 0.93 (3H, s, 18- CH_3), 1.08 (3H, s, 19- CH_3), 2.27 (3H, s, 21- CH_3) 2.36 (3H, s, 7'-C- CH_3), 2.47 (1H, m, 12_A-H), 2.60 (1H, dd, $J = 14.4$, 2.8 Hz, 7_A-H), 5.46 (1H, ddd, $J = 8.6$, 6.3, 2.0 Hz, 3-H), 6.17 (1H, br. s, 4-H), 6.37 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 2'-H), 6.69 (1H, m, 16-H), 7.18 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, 6'-H y 8'-H), 7.41 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 5'-H y 9'-H), 7.67 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 3'-H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3); δ : 15.8 (18- CH_3), 19.6 (19- CH_3), 21.5 (7'-C- CH_3), 27.2 (21- CH_3), 32.0 (15-C), 34.2 (12-C), 46.1 (7-C), 69.2 (3-C), 116.8 (2'-C), 128.1 (6'-C y 8'-C), 129.4 (5'-C y 9'-C), 129.6 (4-C), 131.6 (4'-C), 140.8 (7'-C), 143.9 (16-C), 145.2 (3'-C), 147.9 (5-C), 154.9 (17-C), 166.7 (1'-C), 196.6 (20-C), 201.9 (6-C).

5.1.6.6. 3 β -(*p*-(trifluorometil))cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6f). De 0.40 g (1.8 mmoles) del ácido *p*-(trifluorometil)cinámico, 0.20 g (0.6 mmoles) de **5**, 0.30 g (1.4 mmoles) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, 0.20 g (1.6 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina y 10 mL de CH_2Cl_2 y después de 60 minutos, se obtuvieron 0.26 g (0.49 mmoles, 81%) del producto, $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{O}_4$ (526.23 g/mol) como cristales blancos; p.f. 203 – 204 °C; $R_f = 0.60$ (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis: 268.55 (*p*-(trifluorometil)cinamato), 218.93 (COO, α,β -insaturado) nm; IR (ATR) ν_{max} : 3051 (Ar-H), 2950 (C-H), 1707 (C=O, en C-3), 1687 (6-C=O), 1667 (20-C=O), 1587 (Ar-C=C-), 1165 (=C-COO), 835 (C-F) cm^{-1} ; EM FAB; m/z (% ar): 527 (19) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 311 (93), 199 (100); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3); δ : 0.93 (3H, s, 18- CH_3), 1.09 (3H, s, 19- CH_3), 2.27 (3H, s, 21- CH_3), 2.32 (1H, ddd, $J = 17.0$, 6.6, 3.4 Hz, 15_A-H), 2.48 (1H, ddd, $J = 12.7$, 4.2, 2.3 Hz, 12_A-H), 2.61 (1H, dd, $J = 15.1$, 3.5 Hz, 7_A-H), 5.48 (1H, ddd, $J = 10.2$, 6.3, 2.2 Hz, 3-H), 6.16 (1H, m, 4-H), 6.49 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, 2'-H), 6.70 (1H, dd, $J = 3.4$, 1.9 Hz 16-H), 7.64 (4H, m, 5'-H, 6'-H, 8'-H y 9'-H), 7.71



(1H, d, $J = 16.1$ Hz, 3'-H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3); δ : 15.8 (18- CH_3), 19.6 (19- CH_3), 27.1 (21- CH_3), 32.0 (15-C), 34.2 (12-C), 46.1 (7-C), 69.6 (3-C), 120.5 (2'-C), 123.8 (d, $J = 272.3$ Hz, 7'-C- CF_3) 129.2 (6'-C y 8'-C), 125.9 (d, $J = 3.8$ Hz, 5'-C y 9'-C), 128.8 (4-C), 131.8 (d, $J = 32.7$ Hz, 7'-C), 137.7 (4'-C), 143.3 (16-C), 143.8 (3'-C), 148.1 (5-C), 154.8 (17-C), 165.9 (1'-C), 196.6 (20-C), 201.8 (6-C).

5.1.6.7. 3 β -(*p*-formil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6g). De 0.32 g (1.8 mmoles) del ácido *p*-formilcinámico, 0.20 g (0.6 mmoles) de **5**, 0.30 g (1.4 mmoles) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, 0.20 g (1.6 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina y 10 mL de CH_2Cl_2 y después de 60 minutos, se obtuvieron 0.26 g (0.53 mmoles, 88%) del producto, $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{O}_5$ (486.24 g/mol) como cristales blancos; p. descomposición 213 – 215 °C; $R_f = 0.42$ (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis: 292.55 (*p*-formilcinamato), 217.59 (COO, α,β -insaturado) nm; IR (ATR) ν_{max} : 3052 (Ar-H), 2942 (C-H), 1700 (C=O, en C-3), 1654 (20-C=O), 1585 (Ar-C=C-), 1163 (=C-COO) cm^{-1} ; EM FAB; m/z (% ar): 487 (21) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 311 (100), 159 (43); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3); δ : 0.93 (3H, s, 18- CH_3), 1.08 (3H, s, 19- CH_3), 2.26 (3H, s, 21- CH_3), 2.31 (1H, ddd, $J = 17.0, 6.6, 3.4$ Hz, 15_A-H), 2.48 (1H, ddd, $J = 12.7, 4.1, 2.3$ Hz, 12_A-H), 2.60 (1H, dd, $J = 15.1, 3.5$ Hz, 7_A-H), 5.47 (1H, ddd, $J = 10.1, 6.3, 2.1$ Hz, 3-H), 6.16 (1H, m, 4-H), 6.52 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 2'-H), 6.69 (1H, dd, $J = 3.3, 1.8, 16$ -H), 7.66 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, 5'-H y 9'-H), 7.71 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 3'-H), 7.90 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, 6-H y 8'-H), 10.02 (1H, s, 7'-C-CHO); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3); δ : 15.9 (18- CH_3), 19.7 (19- CH_3), 27.2 (21- CH_3), 32.0 (15-C), 34.3 (12-C), 46.2 (7-C), 69.8 (3-C), 121.2 (2'-C), 128.7 (5'-C y 9'-C), 128.9 (4-C), 130.3 (5'-C y 9'-C), 137.3 (4'-C), 140.1 (7'-C), 143.5 (3'-C), 143.9 (16-C), 148.3 (5-C), 155.0 (17-C), 166.0 (1'-C), 191.6 (7'-C-CHO), 196.7 (20-C), 202.0 (6-C).

5.1.6.8. 3 β -(*p*-metoxi)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6h). De 0.33 g (1.8 mmoles) del ácido *p*-metoxicinámico, 0.20 g (0.6 mmoles) de **5**, 0.30 g (1.4 mmoles) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, 0.20 g (1.6 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina y 10 mL de CH_2Cl_2 y después de 90 minutos, se obtuvieron 0.17 g (0.35 mmoles, 58%) del producto, $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{O}_5$ (488.26 g/mol) como cristales blancos; p.f. 204 – 205 °C; $R_f = 0.45$ (hexano:acetato de etilo; 6:4); UV-Vis: 309.15 (*p*-metoxicinamato), 230.52 (COO, α,β -insaturado) nm; IR (ATR) ν_{max} : 3024 (Ar-H), 2945 (C-H), 1708 (C=O, en C-3), 1690 (6-C=O), 1664 (20-C=O), 1602 (Ar-C=C-), 1159 (=C-COO) cm^{-1} ; EM FAB; m/z (% ar): 489 (8) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 311 (31), 161 (100); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3); δ : 0.91 (3H, s, 18- CH_3), 1.06 (3H, s, 19- CH_3), 2.25 (3H, s, 21- CH_3), 2.46 (1H, d, $J = 10.9$ Hz, 12_A-H), 2.58 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, 7_A-H), 3.82 (3H, s, 7'-C-O CH_3), 5.44 (1H, br. s, 3-H), 6.16 (1H, br. s, 4-H), 6.27 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 2'-H), 6.69 (1H, br. s, 16-H), 6.89 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, 6'-H y 8'-H), 7.46 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, 5'-H y 9'-H), 7.64 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, 3'-H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3); δ : 15.7 (18- CH_3), 19.5 (19- CH_3), 27.1 (21- CH_3), 32.0 (15-C), 34.1 (12-C),



45.9 (7-C), 55.3 (7'-C-OCH₃), 69.0 (3-C), 114.2 (6'-C y 8'-C), 115.2 (2'-C), 126.9 (4'-C), 129.3 (4-C), 129.7 (5'-C y 9'-C), 143.8 (16-C), 144.8 (3'-C), 147.8 (5-C), 154.8 (17-C), 161.3 (7'-C) 166.7 (1'-C), 196.5 (20-C), 201.8 (6-C).

5.2. Parte Biológica

Los estudios de actividad biológica se realizaron utilizando hámsteres machos de la cepa Syrian Golden con un peso promedio de 200 – 250 g y tejido de próstata humana de cadáver conservado a -70 °C proporcionado por el Dr. Avissai Alcántara del Departamento de Patología del Hospital General de México.

Las sustancias utilizadas fueron, Testosterona [³H] (T [³H]) actividad específica 85 – 105 Ci/mmol suministrado por NEN Life Science Products, Inc. (Boston, MA) y Mibolerona [³H] actividad específica 70 – 87 Ci/mmol suministrado por NEN Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA).

Para los ensayos *in vitro* se utilizaron además los siguientes equipos; ultracentrífuga marca Beckman modelo Optima L-70K, centrífuga marca Beckman Allegra 6R, analizador de centelleo Packard modelo Tri-Carb 2100 TR y Placas cromatográficas de Gel de Sílice 60 GF254 en soporte de aluminio (Merck).

5.2.1. Ensayo *in vitro*

Esta prueba consta de dos partes, la primera es la extracción de la enzima 5 α -reductasa y la segunda es la determinación de la concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) de los compuestos **6a-h**.

5.2.1.1. Extracción de la enzima 5 α -reductasa

La próstata de cadáver humano se cortó y homogenizó utilizando una solución que contenía fosfato de sodio (20 mM), sucrosa (0.32 M), ditiotreitól (0.1 mM) a pH = 6.5 la que se referenciará como medio A. El homogenizado se centrifugó a 1500 rpm durante 20 min. El pellet formado se separó y se lavó con 3 volúmenes del medio A, una vez más se centrifugó a 4400 rpm durante 10 min. Finalmente el pellet se resuspendió en el medio A y se almacenó a -70 °C. Se determinó el contenido de proteínas utilizando el método de Bradford⁵⁷ y albumina sérica bovina como referencia.



5.2.1.2. Determinación de la concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) de la enzima 5 α -reductasa en glándula prostática humana

Para cada uno de los compuestos **6a-h** se prepararon 6 series de tubos de ensayo que contenían concentraciones crecientes (10^{-10} – 10^{-4} M) disueltos en metanol y con T [3 H] a una concentración final de 2 nM; así mismo se incluyeron tubos controles a los que sólo se les adicionó T [3 H] a una concentración final de 2 nM. Los tubos se colocaron en baño de agua y en atmósfera de nitrógeno hasta evaporar totalmente el disolvente; en seguida se añadió 720 μ L de buffer de fosfatos (40 mM, pH = 6.5), 80 μ L de fracción microsomal de próstata de cadáver humano, que contenía 360 μ g/mL de proteína. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de DTT (1 mM) y 100 μ L de NADPH (2 mM) con lo que se dio inicio a la reacción.

Los tubos se agitaron en un vortex y se incubaron a 37 °C por una hora; finalizado el tiempo de incubación se agregó 1 mL de diclorometano para detener la reacción y se agitó nuevamente. Se extrajo la fase orgánica en la que se encontraba la DHT [3 H] realizando 3 extracciones más y una vez reunidos los extractos, el disolvente se evaporó en un baño de agua. El sólido formado se resuspendió con 0.5 mL de metanol y se aplicó gota a gota en una placa cromatográfica para separar la DHT [3 H] formada; el procedimiento se repitió 5 veces; adicionalmente, se aplicaron los estándares de testosterona y dihidrotestosterona en cada extremo de la placa. Se eluyó 3 veces en un sistema cloroformo:acetona 9:1.

Para la visualización de los estándares, las placas cromatográficas se observaron bajo luz UV ($\lambda = 254$ nm) y posteriormente se revelaron con una solución de ácido fosfomolibdico en metanol al 8%. Se marcó y cortó la zona correspondiente a la DHT [3 H] ($R_f = 0.64$), después, los pedazos de sílice se colocaron en viales en donde se les adicionó 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold (Packard) y finalmente se leyó la radiactividad producida por la DHT [3 H] en el analizador de centelleo. La actividad de la enzima se calculó en base a los controles que se incubaron en presencia únicamente de T [3 H]. Cada experimento se realizó por duplicado.

Los resultados de este estudio se compararon con la actividad de la Finasterida (Proscar ®), en el ensayo de T+Finasterida se encontró un IC₅₀ = 8.5×10^{-9} M; mientras que de los compuestos evaluados, sólo el derivado **6a** mostró una actividad inhibitoria importante con un IC₅₀ = 4.7×10^{-8} M, los demás derivados no mostraron actividad inhibitoria.



5.2.2. Ensayo *in vivo*

El efecto antiandrogénico de los compuestos sintetizados sobre el peso de la próstata de hámsteres machos castrados de la cepa Syrian Golden, se determinó en 11 grupos de 4 animales por experimento. Los animales fueron seleccionados al azar y gonadectomizados 30 días antes de iniciar los experimentos, manteniéndolos a una temperatura controlada de 22 °C y en periodos de luz – oscuridad de 12 h, la comida y el agua fue suministrada *ad libitum*. Diariamente y durante 6 días se les administró subcutáneamente:

- Grupo control 1: 200 μ L de aceite de sésamo (vehículo).
- Grupo control 2: 200 μ g de testosterona en 200 μ L de aceite de sésamo.
- Grupo control 3: 200 μ g de testosterona más 200 μ g de Finasterida en 200 μ L de aceite de sésamo.
- Grupos experimentales (4-11): 200 μ g de testosterona más 400 μ g de cada uno de los compuestos **6a-h** en 200 μ L de aceite de sésamo.

Después del tratamiento, los hámsteres se sacrificaron con CO₂ y posteriormente se realizó la disección de las próstatas para ser pesadas.

El **órgano del flanco** son dos nódulos pigmentados localizados en la superficie de la piel dorsal de hámster. En los machos mide alrededor de 8 mm mientras que en las hembras mide solamente 2 mm. En los machos estos nódulos disminuyen después de la castración, sin embargo, las inyecciones diarias o aplicaciones tópicas de testosterona o dihidrotestosterona lo regresan a su tamaño original. Los órganos flanco son capaces de metabolizar la testosterona a dihidrotestosterona tanto en hámsteres castrados como en no castrados.

Las **vesículas seminales** son glándulas anexas al aparato reproductor masculino. En los hámsteres castrados, su tamaño disminuye y al igual que los órganos flanco son andrógeno-dependientes. Las vesículas seminales son capaces de reducir la testosterona a dihidrotestosterona, tanto en hámsteres castrados como en no castrados. El peso de la próstata y las vesículas seminales, así como el diámetro de los órganos flanco permitieron evaluar el efecto inhibitorio de los compuestos sobre la enzima 5 α -reductasa. Los resultados obtenidos se condensan en la tabla 2:



Tabla 2. Resultados de las pruebas in vivo

Tratamiento	Diámetro de los nódulos pigmentados (mm)	Peso de la próstata (mg)	Peso de las vesículas seminales (mg)
CONTROL	1.95±0.8	46.2±12.2	92.8±13.8
T	3.6±1.5	83±15.96	169.1±52
T+F	2.9±0.6	69.5±23.9	110.9±33.15
T+6a	2.5±1.8	77.98±8.57	174.80±39.8
T+6b	3.2±0.95	81.5±5.2	190.8±28
T+6c	3.98±1.63	79.5±16.8	184±37.7
T+6d	3.8±1.9	88.8±15.2	188.3±55.3
T+6e	3.9±1.49	85.4±13.5	154.2±31
T+6f	3.1±1.45	85.8±12.3	185.6±51.4
T+6g	3.3±0.99	81.8±15.3	164.8±20
T+6h	3.5±1.5	83.5±18	170.5±13

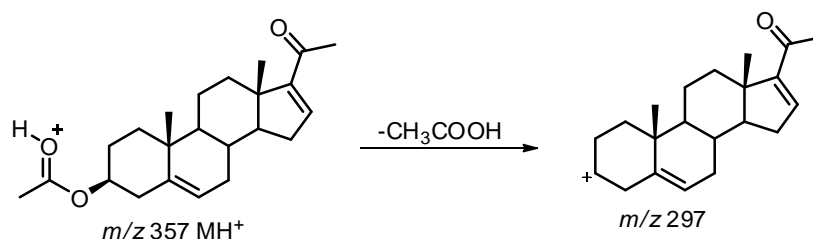


6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1. Parte Química

A pesar de que la actividad anticancerígena tanto de derivados del pregnano⁴³⁻⁴⁶ como de derivados del ácido cinámico⁵¹⁻⁵⁴ ha sido ampliamente estudiada; es de notar que son pocos los reportes en la literatura especializada que describen la fusión de estos sistemas y sus propiedades; en conexión con lo anterior y basados en trabajos previos, en especial el realizado por Alejandra Chávez,⁴¹ en el cual se describe la esterificación de derivados del ácido benzoico en la posición C-3 del compuesto **5** (pág. 20). En el presente trabajo se abordó la estrategia de vinílogos para estudiar el efecto que produce la inserción de un doble enlace en la actividad inhibitoria sobre la enzima 5 α -reductasa de los compuestos sintetizados en la tesis ya citada.

En la síntesis de esta nueva serie de derivados esteroidales **6a-h** (pág. 21), se usó como punto de partida el acetato de 16-deshidropregnenolona (**1**) (pág. 17), ya que es un compuesto comercialmente disponible y de costo accesible, el cual se caracterizó para correlacionar los datos obtenidos con los de la literatura. El análisis del espectro de UV-Vis muestra la presencia de un grupo carbonilo α,β -insaturado en 244.64 nm. El espectro de IR revela la presencia de las bandas de absorción de la vibración de tensión de los grupos C=O, característicos de un carbonilo α,β -insaturado (1660 cm⁻¹) y de un carboxilato (1728 cm⁻¹). El espectro de masas comprobó la presencia de la 16-DPA no sólo por registrar el ión molecular correspondiente a su fórmula condensada protonada [MH]⁺, sino además porque se puede ver la pérdida de 60 unidades de masa correspondiente a la pérdida de ácido acético (Esquema 9) comprobando la existencia de un acetato.



Esquema 9. Posible patrón de fragmentación de la 16-DPA

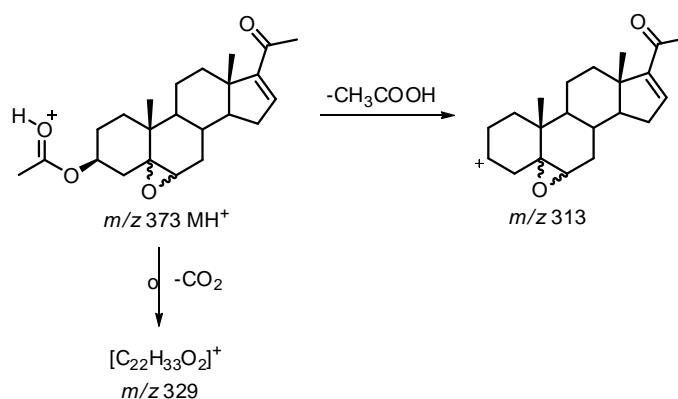
En el espectro de RMN ¹H se observa la presencia de 4 singuletes que integran para 3 protones cada uno en 0.91, 1.05, 2.25 y 2.02 los cuales fueron asignados a los -CH₃ en las posiciones 18, 19, 21 y el metilo del acetato respectivamente, además a campo bajo aparecen en 4.60, 5.38 y 6.70 las señales correspondientes



a los protones en las posiciones 3, 6 y 16. De igual forma, en el espectro de RMN ^{13}C se aprecian a campo alto los metilos de las posiciones 18, 19, 21 y el metilo del acetato en 15.7, 19.2, 27.7 y 21.4 ppm respectivamente, también se observan las señales de los carbonos 6-C y 16-C en 122.0 y 144.4 ppm y los desplazamientos de los carbonos cuaternarios 5, 17, 20 y el del carboxilato en 140.3, 155.4, 196.8 y 170.5 respectivamente.

El primer paso de la reacción consiste en la epoxidación quimioselectiva de **1** utilizando ácido *m*-cloroperoxibenzoico en CH_2Cl_2 , la epoxidación es selectiva en las posiciones 5,6 debido a la diferencia en la naturaleza de los dos enlaces dobles, ya que el enlace doble que reacciona es nucleofílico y reacciona fácilmente con el oxígeno del peroxi-ácido mientras que el doble enlace en 16,17 está conjugado con el carbonilo en 20 y esto lo hace electrofílico, lo que impide que reaccione con el peroxi-ácido.

La caracterización estructural se realizó por medio de espectroscopia UV-Vis, IR, espectrometría de masas y RMN ^1H y ^{13}C , así como los experimentos bidimensionales de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY y heteronuclear HSQC y HMBC. En el espectro de UV-Vis evidencia la presencia de un grupo $\text{C}=\text{O}$ α,β -insaturado a 237.69 nm. En el espectro de IR, además de las señales características de los enlaces $\text{C}=\text{O}$ del éster en 1733 cm^{-1} y del 20-C en 1659 cm^{-1} , aparece una nueva señal en 1240 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión del enlace $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ lo cual es un primer indicio de la formación del epóxido. El análisis del espectro de masas corrobora la formación del 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona al registrar el ión molecular correspondiente al peso de su fórmula condensada protonada, también se puede notar la pérdida de 44 unidades de masa correspondiente a un rearrreglo con pérdida de CO_2 , además, como producto de la pérdida de ácido acético se registra el catión con un m/z de 313 (Esquema 10).



Esquema 10. Patrón de fragmentación propuesto para el epóxido 2



El análisis de RMN ^1H revela la presencia de dos compuestos, los cuales corresponden a los estereoisómeros formados en la reacción, ya que la epoxidación se puede dar, tanto el producto α , como el producto β , a pesar de que esta última está más impedida, en especial por el metilo en 19; la relación de estos isómeros es de aproximadamente 2:1 (Fig. 12), la cual fue posible obtener calculando las integrales para los protones 6-H de cada uno de los isómeros, utilizando como referencia el protón 16-H, el cual aparece solapado en 6.67 ppm para los dos epoxi-derivados.

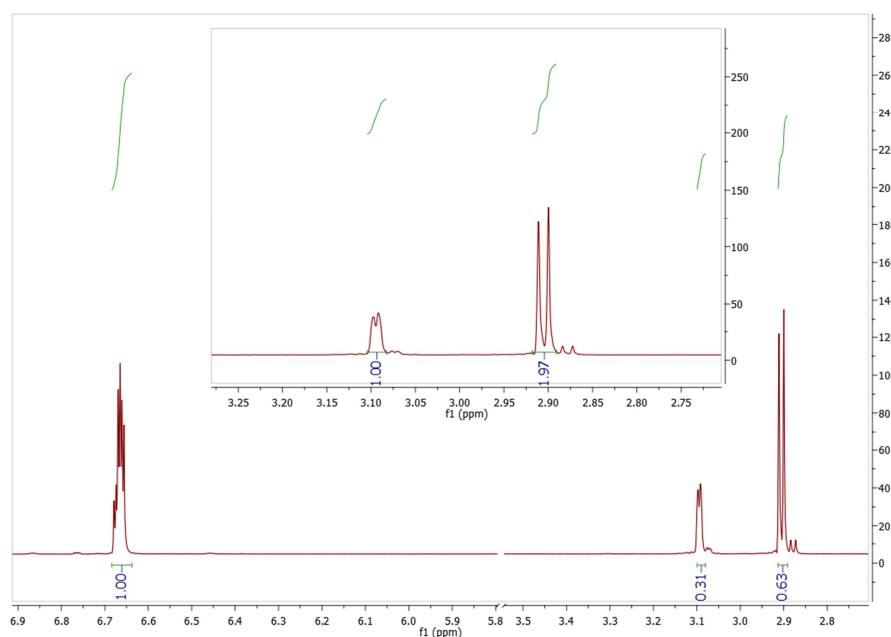


Figura 12. Integrales de las señales correspondientes a 16-H y 6-H para los dos estereoisómeros

Además, el desplazamiento de 6-H es una prueba concreta de que la epoxidación tuvo lugar en el doble enlace ubicado en las posiciones 5,6, ya que la señal correspondiente a este protón se desplaza de 5.38 ppm en el precursor **1** a 2.91 ppm (isómero α) y 3.09 ppm (isómero β) en el compuesto **2** (pág 18). De igual manera el análisis del espectro de RMN ^{13}C muestra la aparición de 4 señales correspondientes a los carbonos 5-C y 6-C base de oxígeno en 65.4 y 58.7 ppm para el isómero α y en 62.7 y 63.2 para el isómero β .

Las asignaciones de los protones más importantes y de los carbonos correspondientes para cada estereoisómero se realizó con ayuda de los experimentos bidimensionales ^1H , ^1H -COSY y HSQC, la asignación de los carbonos cuaternarios en las posiciones 5, 17, 20 y el carbono del sustituyente acetoxi en 3 se asignaron con ayuda del experimento HMBC, de esta forma se



logró diferenciar los protones y carbonos de los α y β epoxi-derivados. En la figura 13 se muestra una ampliación del experimento HMBC, donde se puede ver la interacción de los protones del metilo en 19 con el carbono 5 para los dos estereoisómeros.

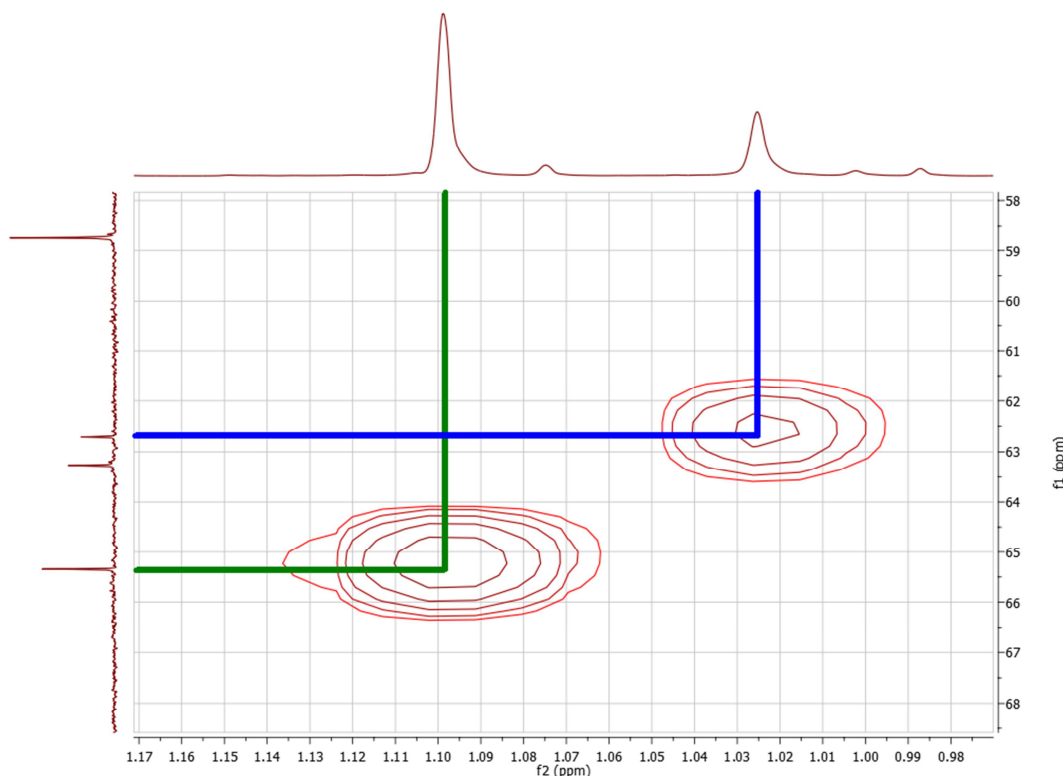
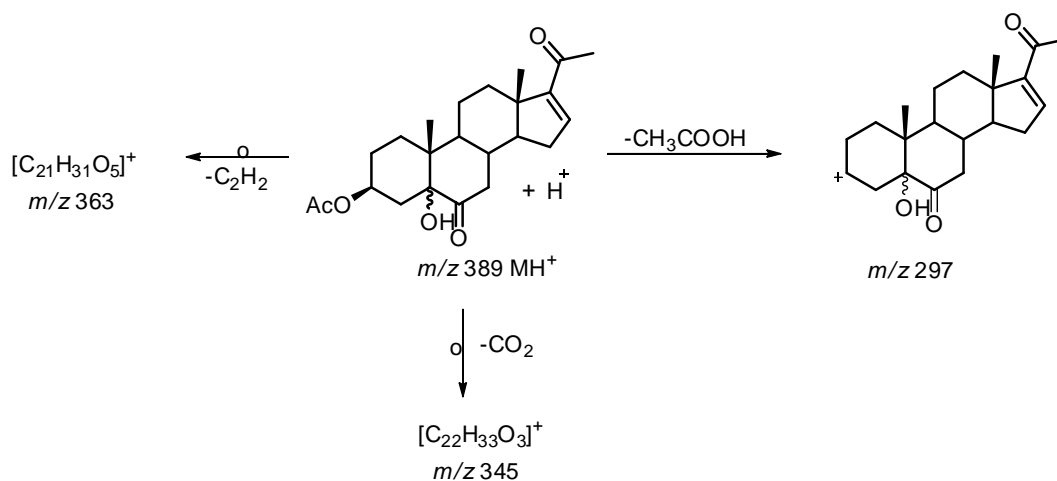


Figura 13. Ampliación del experimento HMBC mostrando la interacción entre 19-CH₃ y 5-C

La síntesis del compuesto **3** (pág. 19), se llevó a cabo haciendo reaccionar la 3 β -acetoxi-5 ξ ,6 ξ -epoxipregna-16-en-20-ona (**2**) con trióxido de cromo (VI) para así oxidar el epóxido y formar una α -hidroxicetona en 5,6. El análisis del espectro de IR revela la presencia de un grupo -OH ya que se puede apreciar la banda característica de este grupo en 3364 cm⁻¹, además, aparece una nueva señal correspondiente a la vibración de tensión del enlace C=O en la posición 6 a 1700 cm⁻¹, estas dos señales se toman como un primer indicio de que la transformación tuvo lugar. En el espectro de masas se evidencia la formación del 3 β -acetoxi-5-hidroxipregna-16-en-6,20-diona ya que se registra el catión que coincide con el peso de su fórmula condensada protonada, además se registra la pérdida de 60 unidades de masa correspondiente a la escisión de una molécula de ácido acético, también se observa la pérdida de 44 y 26 unidades de masa las cuales provienen de rearrreglos con pérdida de CO₂ y C₂H₂ respectivamente (Esquema 11).



Esquema 11. Propuesta de patrón de fragmentación de la 3β-acetoxi-5-hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3)

El análisis del espectro de RMN 1H muestra como primera prueba de la obtención del compuesto 3β-acetoxi-5-hidroxipregna-16-en-6,20-diona la desaparición de la señal correspondiente al protón 6-H, además aparece en 3.80 ppm una señal ancha característica de un grupo –OH, la cual fue asignada al alcohol en la posición 5. En el espectro de RMN ^{13}C se observa la aparición de una señal a 80.04 ppm, cuyo desplazamiento corresponde a un carbono base de oxígeno en posición α a un carbonilo, el cual fue asignado a 5-C, a su vez aparece a campo bajo en 212.1 ppm una señal, la cual corresponde al nuevo carbono carbonílico formado en 6-C. Cabe resaltar que en este espectro ya no se ve la diferencia en los isómeros α y β, la razón debe estar en que a pesar de que el alcohol en la posición 5 aún puede estar orientado en alguna de estas dos posiciones, la apertura del epóxido le quita rigidez a la molécula, lo cual permite que no se vean diferencias en los desplazamientos en los espectros de RMN.

El siguiente paso de la ruta consistió en la deshidratación de la α-hidroxicetona del compuesto **3** para formar así un sistema carbonílico α,β-insaturado en los anillos A y B del esteroide (3β-acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**4**)) usando $SOCl_2$ y piridina en diclorometano. La primera evidencia de la deshidratación de **3** aparece en el espectro de IR, ya que desaparece la banda del –OH en 3364 cm^{-1} , además se ve un corrimiento en la banda del 6-C=O, de 1700 a 1680 cm^{-1} , el cual es característico para un carbonilo α,β-insaturado. La señal del ión molecular en el espectro de masas coincide con el peso de su fórmula condensada protonada (m/z 371), también se observan las mismas pérdidas de 60 unidades de masa correspondiente a la pérdida de ácido acético y 44 unidades de masa proveniente de un rearrreglo con pérdida de CO_2 . El análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C confirma la obtención de **4**, ya que se observa la aparición de una señal a 6.10



Análisis de Resultados

ppm que integra para un protón y corresponde al nuevo hidrógeno vinílico formado en la posición 4, además desaparece la señal correspondiente al –OH en 3.80 ppm; mientras que en el espectro de carbono se evidencia la aparición de dos nuevas señales a campo bajo, en 129.1 y 147.9 ppm que corresponde a los nuevos carbonos vinílicos 4 y 5 respectivamente, es de agregar que no se observa la señal desplazada en 80.0 ppm, lo cual indica que el carbono 5-C que estaba enlazado al grupo –OH sufrió una transformación.

Una vez obtenido el compuesto 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona, se le sometió a una reacción de desacetilación utilizando una solución de NaOH al 2%, para así acceder al compuesto 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona **5**. En el espectro de IR aparece a 3383 cm⁻¹ la banda característica del grupo –OH. En el espectro de masas, además de aparecer el pico del ión molecular correspondiente al peso de su fórmula condensada protonada m/z 329, aparece una señal que proviene de la pérdida de 18 unidades de masa (H₂O) característica de un alcohol con una relación m/z 311. En el espectro de RMN ¹H se nota la desaparición del metilo correspondiente al grupo acetilo en 2.07 ppm, también, el análisis del espectro de RMN ¹³C evidencia la desaparición de los carbonos en 21.2 y 170.1 ppm correspondientes al metilo y carboxilato del grupo acetilo, confirmando así la hidrólisis de este sustituyente.

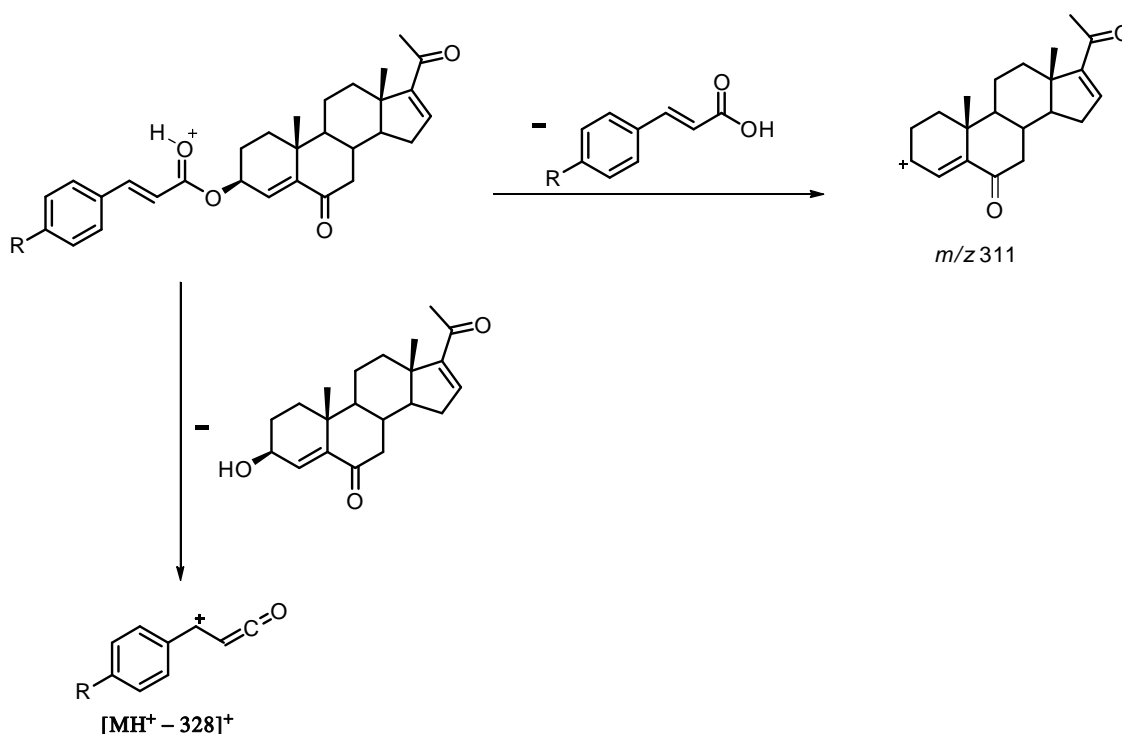
En la etapa final de la ruta sintética se efectuó la esterificación de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona **5** utilizando las condiciones de Steglich, con 8 diferentes derivados del ácido cinámico para así acceder a los productos de interés **6a-h**. En general la reacción transcurrió de forma limpia, generando sólo DCU como producto secundario, la cual fue eliminada recristalizando de acetato de etilo y luego lavando el compuesto con una solución de MeOH:Hexano 1:1 usando AcOEt como codisolvente, los compuestos de interés se obtuvieron como sólidos blancos con rendimientos entre el 58 – 88%.

El análisis de los espectros de UV-Vis se aprecia claramente las bandas de absorción de los cinamatos para cada uno de los 8 derivados entre 268 – 309 nm, siendo este el primer indicio de que las esterificaciones tuvieron lugar. En el espectro de IR, se puede observar la aparición de las bandas de vibración de baja intensidad a 3055 – 3023 cm⁻¹, la cuales son características de anillos aromáticos, también se pueden apreciar las señales de vibración de tensión del nuevo grupo éster entre 1698 – 1701 cm⁻¹; además, entre 1584 – 1602 cm⁻¹ aparece la banda correspondiente a la vibración de tensión de sistemas análogos al estireno (Ar-C=C-) y finalmente para los haloderivados **6b-d** y **6e**, se pudo encontrar la señal característica del enlace C-Hal entre 835 – 817 cm⁻¹.

Los espectros de masas evidencian la obtención de los productos deseados, no sólo por registrarse el ión correspondiente al peso de su fórmula condensada



protonada, sino además porque se observan dos picos característicos, uno, correspondiente a la pérdida del derivado de ácido cinámico como molécula neutra, el cual produce un catión con una relación m/z de 311, y el otro correspondiente a la pérdida de 328 unidades de masa, que corresponden a la pérdida del intermediario **5**, como molécula neutra, dejando así un pico característico para cada uno de los derivados **6a-h** (Esquema 12).



Esquema 12. Patrón de fragmentación propuesto para los derivados **6a-h**

Los espectros de RMN ^1H confirman la obtención de los ésteres **6a-h** al mostrar las señales características de los protones aromáticos por encima de 6 ppm, además aparecen dos nuevas señales a campo bajo correspondientes a los protones vinílicos 2'-H y 3'-H, acoplados entre sí con una constante de acoplamiento de aproximadamente 16 Hz característica para isómeros *trans*, es de notar que mientras el protón 2'-H tiene un desplazamiento no mayor a 6.5 ppm, el protón 3'-H aparece siempre por encima de 7.5 ppm, la razón está en que este protón además de estar en posición β a un carboxilato α,β insaturado, donde al observar la estructura de resonancia típica de estos sistemas se ve que esta posición se desprotege; está en una posición bencílica, por lo que se ve afectado por el efecto anisotrópico del anillo aromático (Fig. 14).

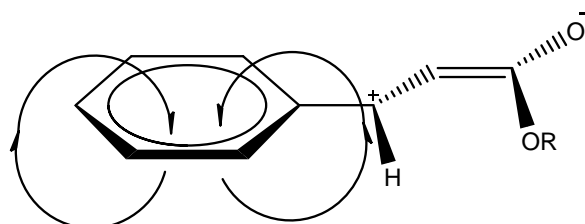


Figura 14. Efecto anisotrópico del anillo aromático y estructura resonante del éster

En los espectros de RMN ^{13}C , aparecen las señales de los carbonos aromáticos en la región comprendida entre 120 – 140 ppm, también se observan los desplazamientos de los nuevos dos carbonos vinílicos entre 115 – 121 ppm para 2'-C y 143 – 145 ppm para 3'-C; además aparece una nueva señal a campo bajo, por encima de 160 ppm, correspondiente al carboxilato del nuevo éster formado.

En los espectros de RMN ^1H aparecen dos señales centradas en 2.5 y 2.6 ppm aproximadamente y que integran para un protón cada una, las cuales en principio se pensaba que correspondían a los protones de la posición 7, ya que estos son vecinos al grupo carbonilo, sin embargo, al observar el experimento HSQC (Fig. 15), se puede notar que estos hidrógenos corresponden a carbonos diferentes.

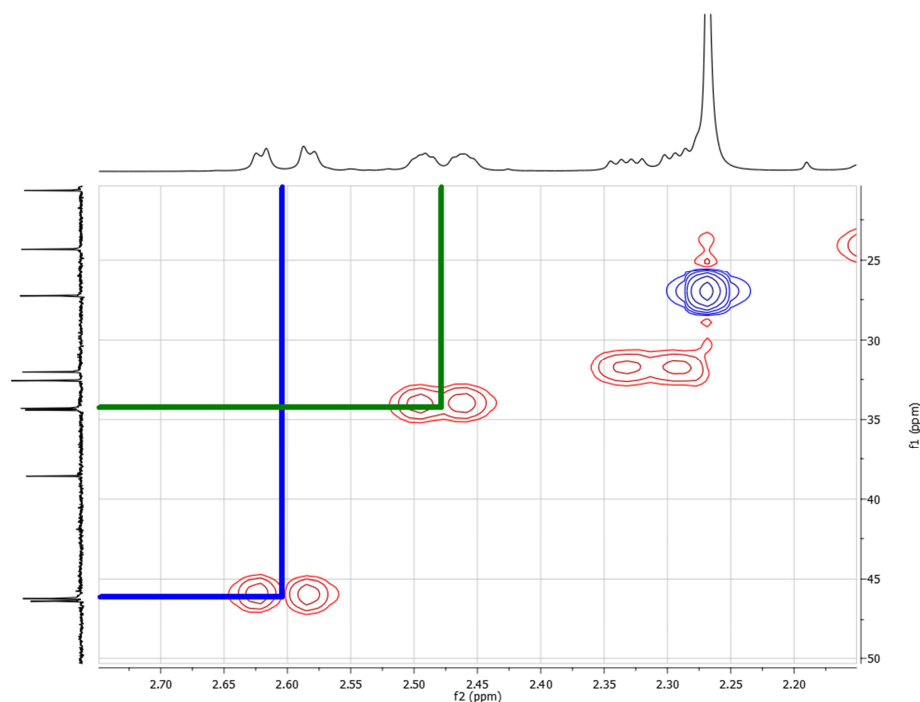


Figura 15. Ampliación del espectro HSQC para el compuesto 6b

La siguiente hipótesis sugirió que el protón en 2.5 ppm podría ser uno de los protones alílicos en la posición 15, ya que el desplazamiento corresponde a este tipo de protones, pero al observar el experimento ^1H , ^1H -COSY, no se ve



interacción entre este protón y el protón vinílico 16-H (Fig. 16), mientras que si se ve interacción para un protón centrado en 2.3 ppm aproximadamente, el cual aparece como un ddd, con constantes de acoplamiento de 17, 6 y 3 en general y también la señal 16-H ve un protón en la zona de 2.0 ppm pero el cual está solapado con otras señales, es así como se descartó que el protón en 2.5 ppm correspondiera a uno de los protones alílicos o a uno de los protones vecinales al carbono carbonílico en posición 6.

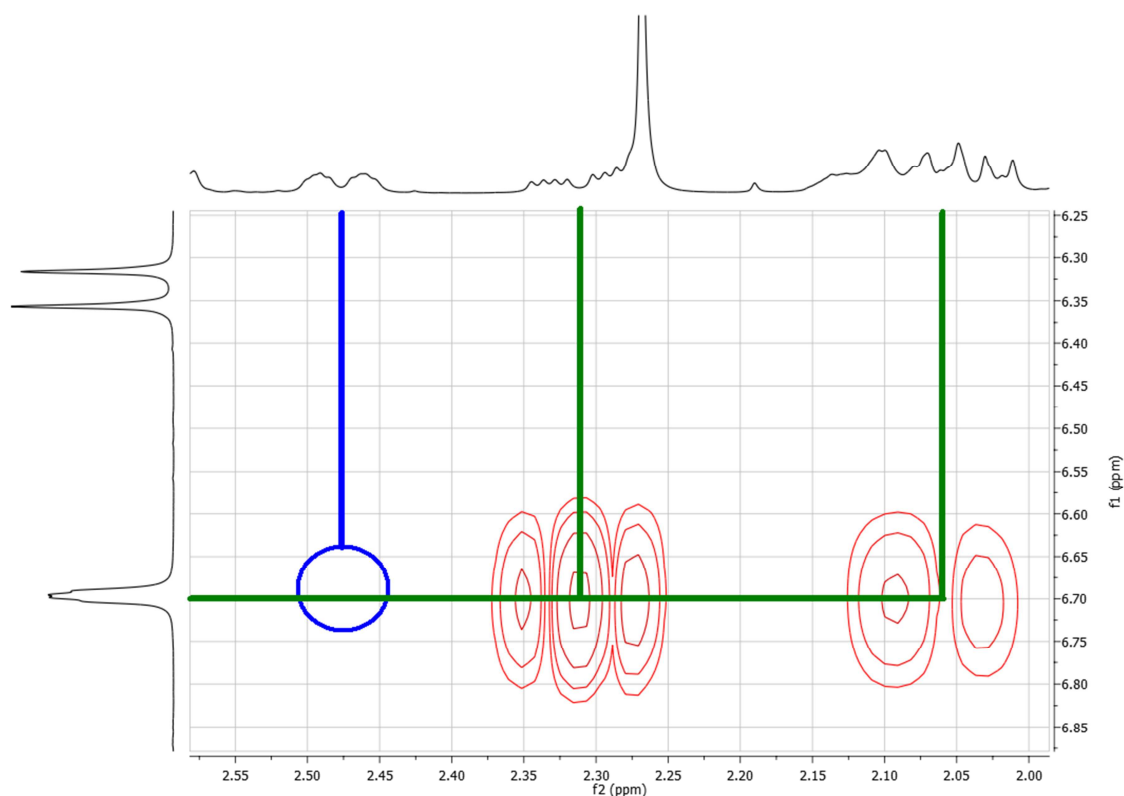


Figura 16. Ampliación del espectro ^1H , ^1H -COSY de 6b mostrando la interacción entre el protón 16-H y los protones 15-H

Al descartar los protones más probables para esta señal, se pensó entonces que el desplazamiento de este protón se debía a un efecto anisotrópico, y al analizar en detalle los experimentos bidimensionales se encontró en el NOESY un detalle importante, y es que el protón vinílico 16-H interactúa con los protones del 21- CH_3 (Fig. 17).

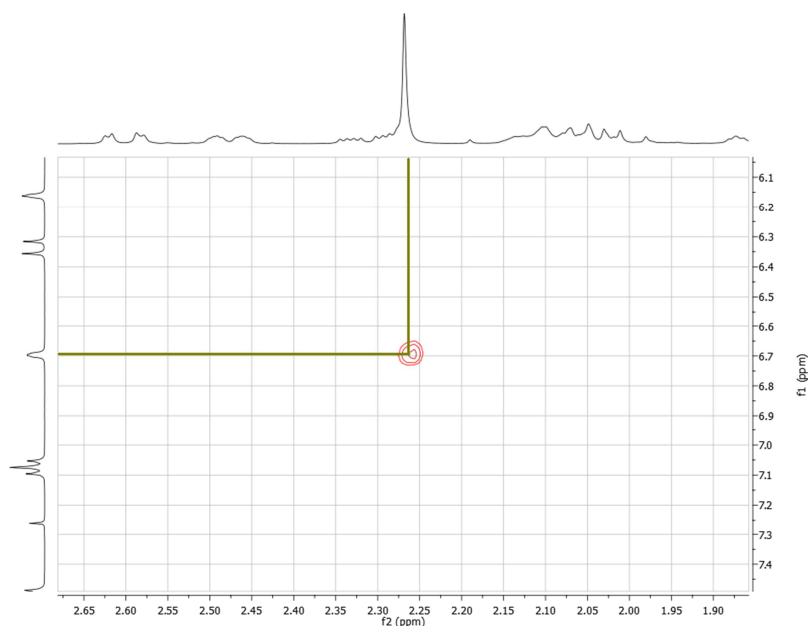


Figura 17. Ampliación del espectro NOESY del compuesto 6b, mostrando la interacción de 16-H con 21-CH₃

Lo cual indica que el grupo carbonilo en 20-C está orientado hacia el anillo C del esteroide, es decir, tiene una disposición transoide frente al enlace doble entre C-16 y C-17, lo cual provoca que uno de los protones en la posición 12, caiga en el cono de desprotección del carbonilo (Fig. 18), desplazándolo a campo bajo, es así como se determinó que el protón en aprox. 2.5 ppm correspondía a uno de los protones en la posición 12.

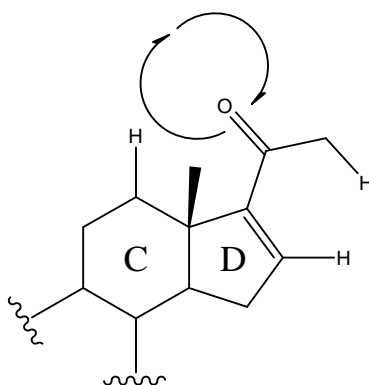


Figura 18. Orientación y efecto anisotrópico del grupo carbonilo en 20-C

Estos resultados hicieron surgir una inquietud, y era si esta disposición se debía a cambios conformacionales durante la ruta sintética o si esta orientación se presentaba desde el compuesto de partida.



Es así como al analizar los espectros de RMN ^1H y los espectros bidimensionales de correlación homonuclear y heteronuclear del acetato de 16-deshidropregnenolona, se pudo corroborar que el compuesto de partida presenta la misma conformación transoide, ya que en el espectro de RMN ^1H , aparece una señal centrada en 2.4 ppm, que integra para un protón y que no tiene correlación con ninguno de los protones vinílicos en las posiciones 6 y 16, ni con el protón base de oxígeno en la posición 4, por lo cual no corresponde a un protón alílico, además en el espectro NOESY, se ve la interacción entre el protón en la posición 16 y los protones del fragmento metilo en la posición 21 (Fig. 19).

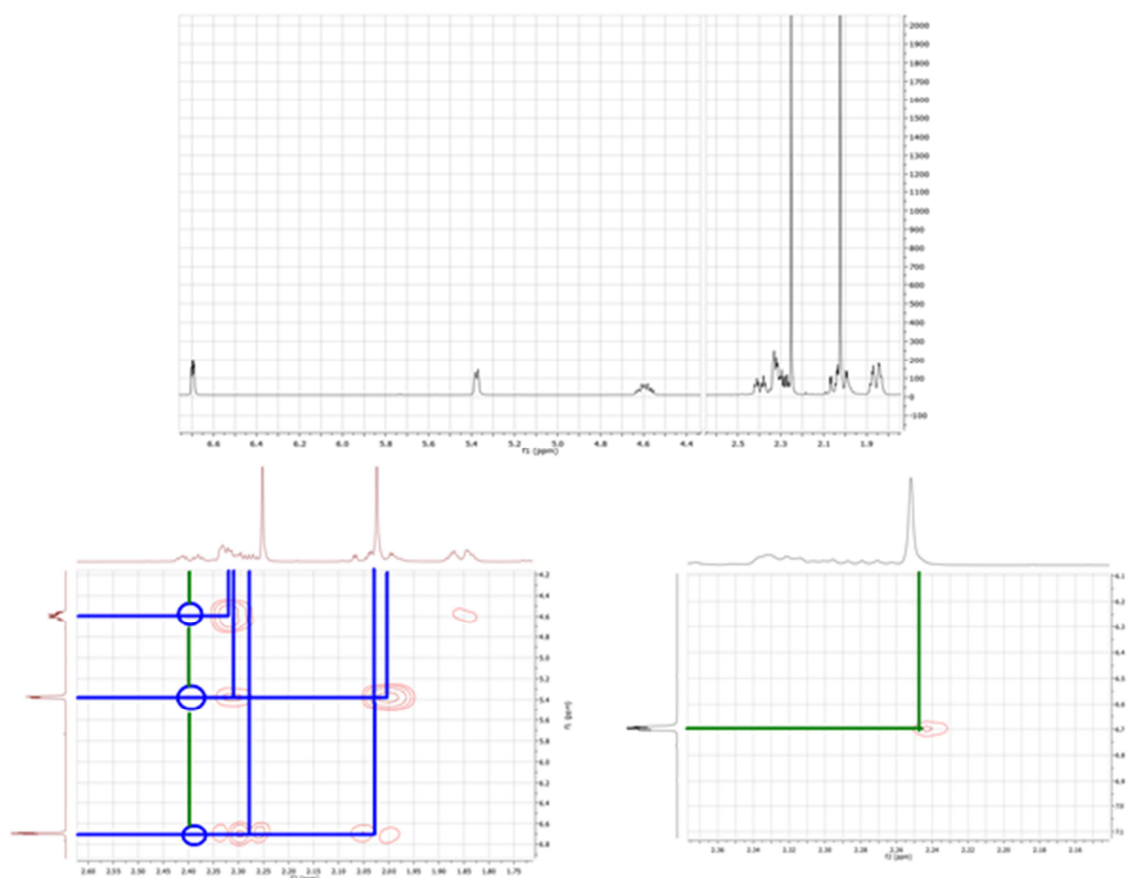


Figura 19. Espectros de RMN ^1H , ^1H , ^1H -COSY y NOESY del compuesto 1

El análisis de los espectros de RMN bidimensionales de los intermediarios corroboró la retención de la configuración transoide en cada uno de los pasos de la ruta sintética realizada, mostrando así que ésta es la orientación preferida; la razón puede residir en que el grupo metilo de la posición 21 presenta tensión estérica con los hidrógenos del metilo en 18 y quizá de los protones de la posición 12, por lo cual la orientación cisoides está desfavorecida, mientras que en la orientación transoide, esta repulsión no se presenta.



6.2. Parte biológica

En los ensayos *in vitro* realizados sobre la enzima 5 α -reductasa tipo II de humano sólo el compuesto **6a** mostró actividad significativa con un $IC_{50} = 4.7 \times 10^{-8}$ M, sin embargo, el efecto inhibitorio fue menor que la Finasterida, la cual tiene un $IC_{50} = 8.5 \times 10^{-9}$ M. Además, al comparar la actividad inhibitoria *in vitro* con el análogo derivado del ácido benzoico sintetizado en trabajos previos, se ve una drástica disminución del potencial inhibitorio, ya que este compuesto posee un $IC_{50} = 7.0 \times 10^{-11}$ M.⁴¹ Los derivados **6b-h** mostraron un valor de IC_{50} demasiado alto, por lo cual no se pueden considerar como posibles fármacos.

Con el fin de determinar el efecto antiandrogénico *in vivo* de la nueva serie de derivados esteroideos sintetizados **6a-h**, se usaron los ensayos sobre el tamaño del órgano del flanco, el peso de las vesículas seminales y el peso de la próstata en hámsteres castrados.

En el ensayo del tamaño del órgano del flanco sólo el compuesto **6a** mostró mayor actividad que el fármaco de referencia (Fig. 20) mientras que los demás derivados no mostraron actividad significativa. En los ensayos del peso de las vesículas seminales y peso de la próstata, ninguno de los compuestos mostró mayor actividad que la Finasterida, sólo en el peso de la próstata, el compuesto **6a** mostró una actividad similar al fármaco de referencia. Lo cual muestra que el alargamiento del sustituyente en C-3 no mejora la actividad antiandrogénica en este tipo de derivados del pregnano.

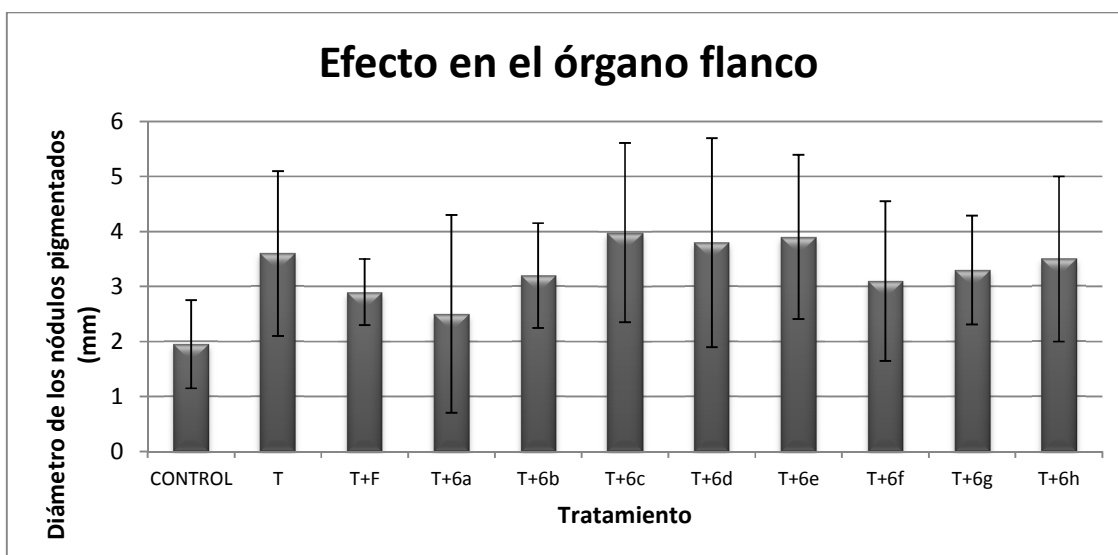


Figura 20. Efecto antiandrogénico sobre los nódulos pigmentados

Una posible explicación de la pérdida de la actividad puede residir en los requerimientos estéricos del sitio activo de la enzima, ya que una sustitución en la



posición *para* del anillo de cinamato, sin importar la naturaleza del sustituyente, llevó a la pérdida de la actividad inhibitoria in vitro. Mientras que el compuesto no sustituido, al presentar menor impedimento estérico, puede unirse de manera más fácil con el sitio activo de la enzima.

Otra posibilidad puede estar en el coeficiente de partición (Log P), ya que en trabajos anteriores se ha discutido ampliamente que un valor de Log P mayor al de la Finasterida (Log P = 3.15) favorece la actividad, pero no se ha discutido hasta qué punto es favorable que sea mayor, al comparar los valores de los compuestos sintetizados en este trabajo, se puede observar que se diferencian bastante del valor de la Finasterida (Tabla 3). En consecuencia, es posible que esta nueva serie sea tan hidrofóbica, que este hecho conlleve a la pérdida de la actividad por la imposibilidad de interactuar con la enzima. Además, el compuesto más activo reportado en el trabajo con ácidos benzoicos, presenta un Log P de 4.09 frente a 4.49 del derivado **6a**. Los compuestos **6g** y **6h** tienen un Log P menor, pero a su vez son los que tienen grupos más polares y a la vez voluminosos, lo cual podría explicar por qué no resultaron ser activos.

Tabla 3. Valores de Log P de los derivados 6a-h

Derivado	Log P	Derivado	Log P
	4.49		4.97
	4.65		5.41
	5.05		4.23
	5.32		4.36



CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación ratifican la validez y versatilidad de la ruta de síntesis diseñada en el laboratorio 125 del departamento de farmacia de la Universidad Nacional Autónoma de México para acceder a derivados no descritos del pregnano.
- Se corroboró por RMN ^1H que la reacción de epoxidación es estereoselectiva y que la relación de los isómeros α -epoxi y β -epoxi es de aproximadamente 2:1.
- En total se sintetizaron 8 nuevos derivados de la 3β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona, cuyas propiedades físicas y espectroscópicas se reportan por primera vez.
- En los nuevos derivados de la 3β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona se encontró un desplazamiento por encima de lo normal para uno de los protones en la posición 12 debido a la orientación y el efecto anisotrópico del grupo carbonilo en la posición 20.
- Se corroboró que la orientación de los compuestos finales e intermediarios sintetizados es transoide en el sistema α,β -insaturado en el anillo D.
- El derivado **6a** fue el único que mostró actividad tanto en las pruebas *in vitro*, como en la prueba *in vivo* del diámetro del órgano del flanco, los demás compuestos no mostraron actividad significativa.
- Se demostró que la sustitución en la posición *para* del anillo del cinamato no mejora la actividad biológica, por el contrario conlleva a la pérdida de la misma.
- Los valores de Log P sugieren que un incremento en la hidrofobicidad de los compuestos conlleva a un decaimiento en la actividad biológica.



REFERENCIAS

1. Nielsen M. & Miller S. *Atlas de Anatomía Humana*. (Ed. Panamericana, 2012).
2. Carvajal, E. HIPERTROFIA PROSTATICA. *Rev. PACEÑA Med. Fam.* **3**, 74–77 (2006).
3. En, I. & En, A. Y. Hiperplasia Prostática Benigna. *Ámbito Farm. Divulg. Sanit.* **25**, 102–108 (2006).
4. Bostwick, D. G. *et al.* Human prostate cancer risk factors. *Cancer* **101**, 2371–2490 (2004).
5. Meigs, J. B., Mohr, B., Barry, M. J., Collins, M. M. & McKinlay, J. B. Risk factors for clinical benign prostatic hyperplasia in a community-based population of healthy aging men. *J. Clin. Epidemiol.* **54**, 935–944 (2001).
6. Collins, M. M. *et al.* Diagnosis and treatment of benign prostatic hyperplasia. Practice patterns of primary care physicians. *J. Gen. Intern. Med.* **12**, 224–229 (1997).
7. Adn, E. Cáncer de próstata. *Am. Cancer Soc.* (2013). at <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeprostata/guiadetallada/>
8. Epperson, W. J. & Frank, W. L. Male genital cancers. *Cancer* **25**, 459–472 (1998).
9. Grönberg, H., Wiklund, F. & Damber, J. E. Age specific risks of familial prostate carcinoma: a basis for screening recommendations in high risk populations. *Cancer* **86**, 477–483 (1999).
10. Grönberg, H., Damber, J., Ph, D. & Emanuelsson, M. Cancer Risk in Families with Hereditary Prostate Carcinoma. *Cancer* **89**, 1315 –1321 (2000).
11. Walsh, P. C. & Partin, a W. Family history facilitates the early diagnosis of prostate carcinoma. *Cancer* **80**, 1871–1874 (1997).
12. Klotz, L. Hormone therapy for patients with prostate carcinoma. *Cancer* **88**, 3009–3014 (2000).
13. McLeod, D. G. Hormonal therapy in the treatment of carcinoma of the prostate. *Cancer* **75**, 1914–1919 (1995).



Referencias

14. Deftos, L. J. Prostate Carcinoma, Production of Bioactive Factors. *Cancer* **88**, 3002–3008 (2000).
15. Handratta, V. D. *et al.* Novel C-17-heteroaryl steroidal CYP17 inhibitors/antiandrogens: synthesis, in vitro biological activity, pharmacokinetics, and antitumor activity in the LAPC4 human prostate cancer xenograft model. *J. Med. Chem.* **48**, 2972–2984 (2005).
16. Grayhack, J., Keeler, T. & Kozlowski, J. Carcinoma of the Prostate, Hormonal Therapy. *Cancer* **60**, 589 – 601 (1987).
17. Posada, J. Síntesis de antiandrógenos esteroidales basados en el esqueleto de deshidroepiandrosterona con un heteroátomo en C-17. Tesis Maestría, Facultad de Química. UNAM. (2011).
18. Debes, J. D. & Tindall, D. J. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett.* **187**, 1–7 (2002).
19. Ferraldeschi, R., Sharifi, N., Auchus, R. J. & Attard, G. Molecular pathways: Inhibiting steroid biosynthesis in prostate cancer. *Clin. cancer Res.* **19**, 3353–3359 (2013).
20. Gao, W., Bohl, C. E. & Dalton, J. T. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem. Rev.* **105**, 3352–3370 (2005).
21. Cabeza, M. *et al.* Biological activity of novel progesterone derivatives having a bulky ester side chains at C-3. *Steroids* **73**, 838–843 (2008).
22. Brown, T. R. Nonsteroidal selective androgen receptors modulators (SARMs): designer androgens with flexible structures provide clinical promise. *Endocrinology* **145**, 5417–5419 (2004).
23. Silva, A. Síntesis y evaluación biológica de derivados de deshidroepiandrosterona con un carbazol y un triazol en C-17 como posibles antiandrógenos. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. (2013).
24. Arth, G. E., Patchett, A., Bugianesi, R. L., Kuehl, A. & Brink, K. G. Steroidal Androgen Biosynthesis Inhibitors. *J. Med. Chem.* **14**, 675–679 (1971).
25. Doostzadeh, J., Flinois, J. & Beaune, P. Pregnenolone-7 β -Hydroxylating Activity of Human Cytochrome P450-1A1. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **60**, 147–152 (1997).
26. El-Amm, J., Patel, N., Freeman, A. & Aragon-Ching, J. B. Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Critical Review of Enzalutamide. *Clin. Med. Insights Oncol.* **7**, 235–245 (2013).



Referencias

27. Limonta, P., Moretti, R. M., Marzagalli, M. & Marelli, M. M. Castration Resistant Prostate Cancer: From Emerging Molecular Pathways to Targeted Therapeutic Approaches. *Clin. Cancer Drugs* 11–27 (2014).
28. Peer, A. *et al.* Comparison of abiraterone acetate versus ketoconazole in patients with metastatic castration resistant prostate cancer refractory to docetaxel. *Prostate* **74**, 433–40 (2014).
29. Tombal, B. *et al.* Enzalutamide monotherapy in hormone-naive prostate cancer: primary analysis of an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **2015**, 1–9 (2014).
30. Russell, D. W. & Wilson, J. D. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 25–61 (1994).
31. Labrie, F., Sugimoto, Y., Luu-The, V., Simard, J. & Lachance, Y. Structure of human type II 5 α -reductase gene. *Endocrinology* **131**, 1571–1573 (1992).
32. Azzouni, F., Godoy, A., Li, Y. & Mohler, J. The 5 alpha-reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases. *Adv. Urol.* **2012**, 1 – 18 (2012).
33. Godoy, A. *et al.* 5A-Reductase Type 3 Expression in Human Benign and Malignant Tissues: a Comparative Analysis During Prostate Cancer Progression. *Prostate* **71**, 1033–46 (2011).
34. Titus, M. a *et al.* 5A-Reductase Type 3 Enzyme in Benign and Malignant Prostate. *Prostate* **74**, 235–49 (2014).
35. Cabeza, M. *et al.* Androgenic and anti-androgenic effects of progesterone derivatives with different halogens as substituents at the C-6 position. *Steroids* **64**, 413–421 (1999).
36. Pérez-Ornelas, V. *et al.* New 5alpha-reductase inhibitors: in vitro and in vivo effects. *Steroids* **70**, 217–224 (2005).
37. Arellano, Y. *et al.* New ester derivatives of dehydroepiandrosterone as 5 α -reductase inhibitors. *Steroids* **76**, 1241–1246 (2011).
38. Bratoeff, E. *et al.* 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 (2007).
39. Li, X. *et al.* Synthesis and in Vitro Evaluation of 4-Substituted N-(1,1-Dimethylethyl)-3-oxo-4-androstene-17 β -carboxamides as 5 α -Reductase Inhibitors and Antiandrogens. *J. Med. Chem.* **38**, 1456–1461 (1995).



Referencias

40. Imperato-McGinley, J., Sanchez, R., Spencer, J., Yee, B. & Vaughan, D. Comparison of effects of the 5 α -Reductase inhibitor Finasteride and the antiandrogen Flutamide on prostate and genital differentiation: Dose-response studies. *Endocrinology* **131**, 1149–1156 (1992).
41. McConnell, J. *et al.* Finasteride, an inhibitor of 5 α -Reductase, suppresses prostatic dihydrotestosterone in men with Bening Prostatic Hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**, 505–508 (1992).
42. Gormley, G., Stoner, E., Bruskewitz, R. & Imperato-McGinley, J. The effect of Finasteride in men with Bening Prostatic Hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1185–1191 (1992).
43. Mohareb, R. M., El-Sayed, N. N. E. & Abdelaziz, M. a. The Knoevenagel reactions of pregnenolone with cyanomethylene reagents: Synthesis of thiophene, thieno[2,3-b]pyridine, thieno[3,2-d]isoxazole derivatives of pregnenolone and their in vitro cytotoxicity towards tumor and normal cell lines. *Steroids* **78**, 1209–1219 (2013).
44. Shervington, L. a *et al.* To determine the cytotoxicity of chlorambucil and one of its nitro-derivatives, conjugated to prasterone and pregnenolone, towards eight human cancer cell-lines. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 2944–2951 (2009).
45. Iqbal Choudhary, M. *et al.* Pregnenolone derivatives as potential anticancer agents. *Steroids* **76**, 1554–1559 (2011).
46. Mohareb, R. M., Wardakhan, W. W., Elmegeed, G. a. & Ashour, R. M. S. Heterocyclizations of pregnenolone: Novel synthesis of thiosemicarbazone, thiophene, thiazole, thieno[2,3-b]pyridine derivatives and their cytotoxicity evaluations. *Steroids* **77**, 1560–1569 (2012).
47. Bratoeff, E., Cabeza, M., Pérez-Ornelas, V., Recillas, S. & Heuze, I. In vivo and in vitro effect of novel 4,16-pregnadiene-6,20-dione derivatives, as 5 α -reductase inhibitors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **111**, 275–281 (2008).
48. Cabeza, M. *et al.* Novel C-6 substituted and unsubstituted pregnane derivatives as 5 α -reductase inhibitors and their effect on hamster flank organs diameter size. *Steroids* **74**, 793–802 (2008).
49. Chavez, A. Síntesis y evaluación biológica de nuevos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa basados en el esqueleto del pregnano con un grupo éster en C-3. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. (2012).
50. Patrick, G. *Medicinal Chemistry*. (Oxford, University Press, 2009).



Referencias

51. Hedvati, L. *et al.* Cinnamic acid derived oxazolinium ions as novel cytotoxic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **37**, 607–616 (2002).
52. Qian, Y. *et al.* Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of cinnamic acid metronidazole ester derivatives as novel anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 4991–4996 (2010).
53. Yang, X.-H. *et al.* Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of cinnamic acyl 1,3,4-thiadiazole amide derivatives as novel antitubulin agents. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 1181–1187 (2012).
54. Lin, H.-Y. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of cinnamic acyl shikonin derivatives. *Chem. Biol. Drug Des.* **81**, 275–283 (2013).
55. Mendoza, M. Obtención de nuevos 16-haloderivados de la pregnenolona con potencial actividad biológica. Tesis de licenciatura. UNAM. (2012).
56. Reyes, A. Síntesis de ésteres del grupo cinamoilo por radiación de microondas con potencial actividad citotóxica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. (2012).
57. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).



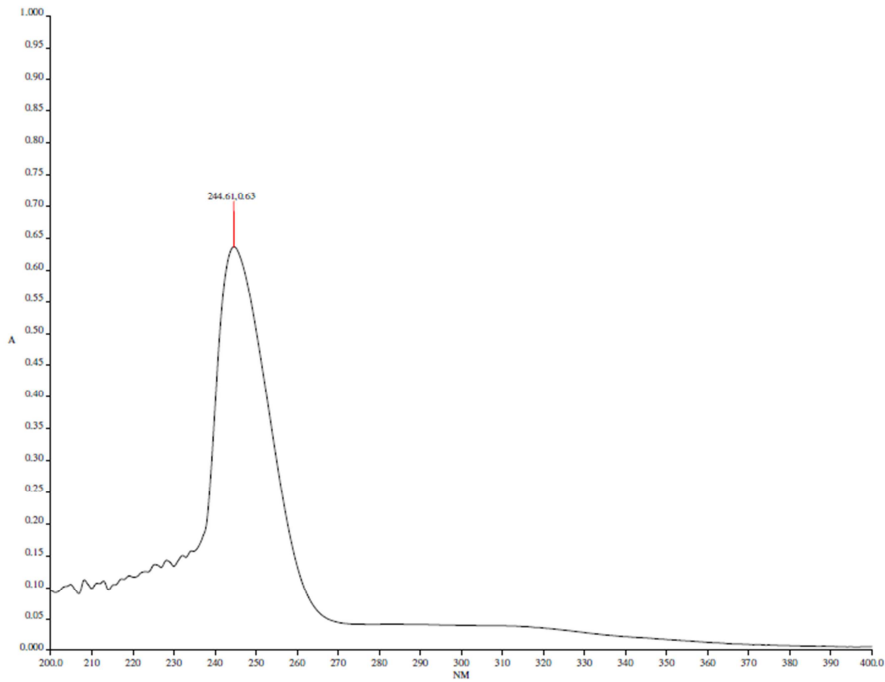
ANEXOS

**ESPECTROS DE UV-Vis, IR, EM-FAB, RMN ^1H Y RMN ^{13}C ,
OBTENIDOS EN EL PRESENTE TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN**

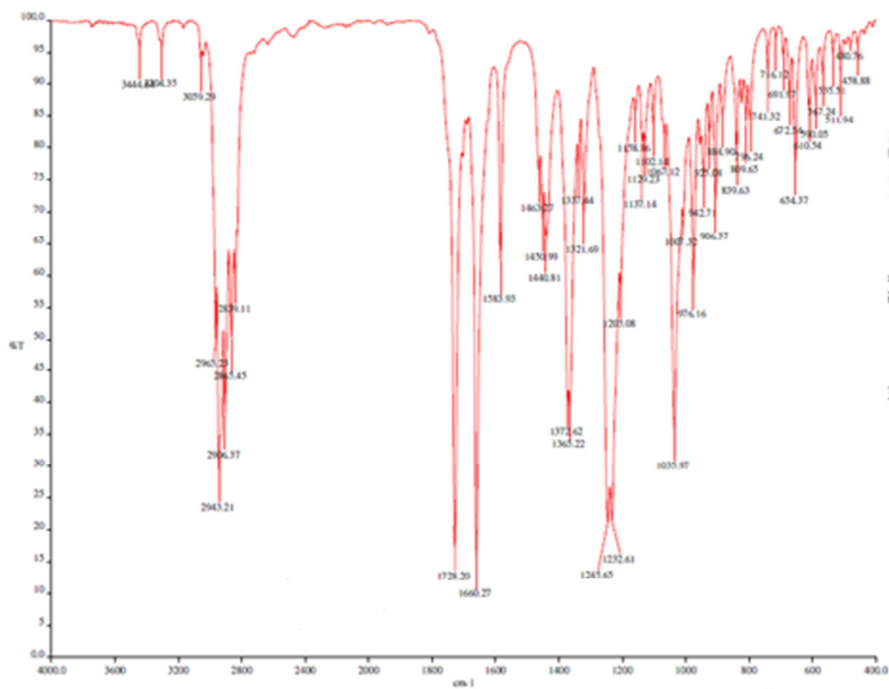


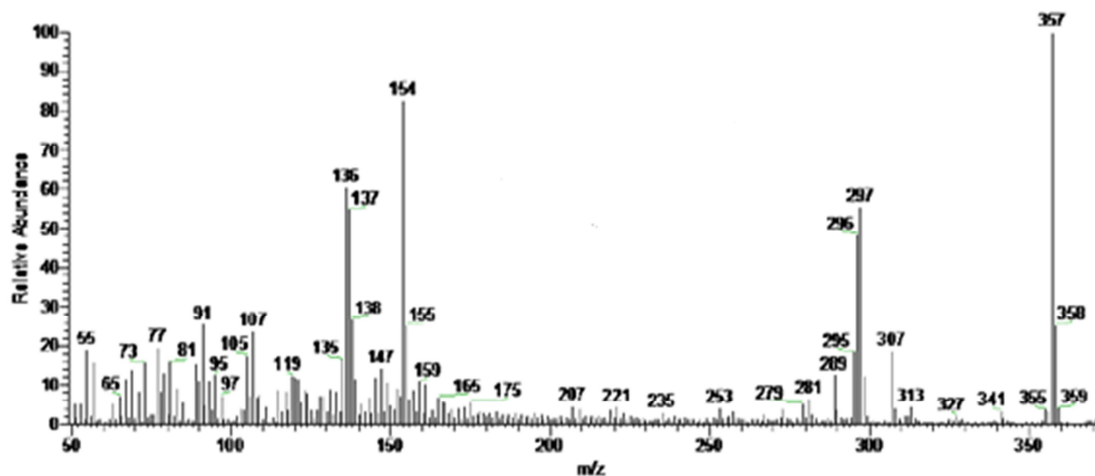
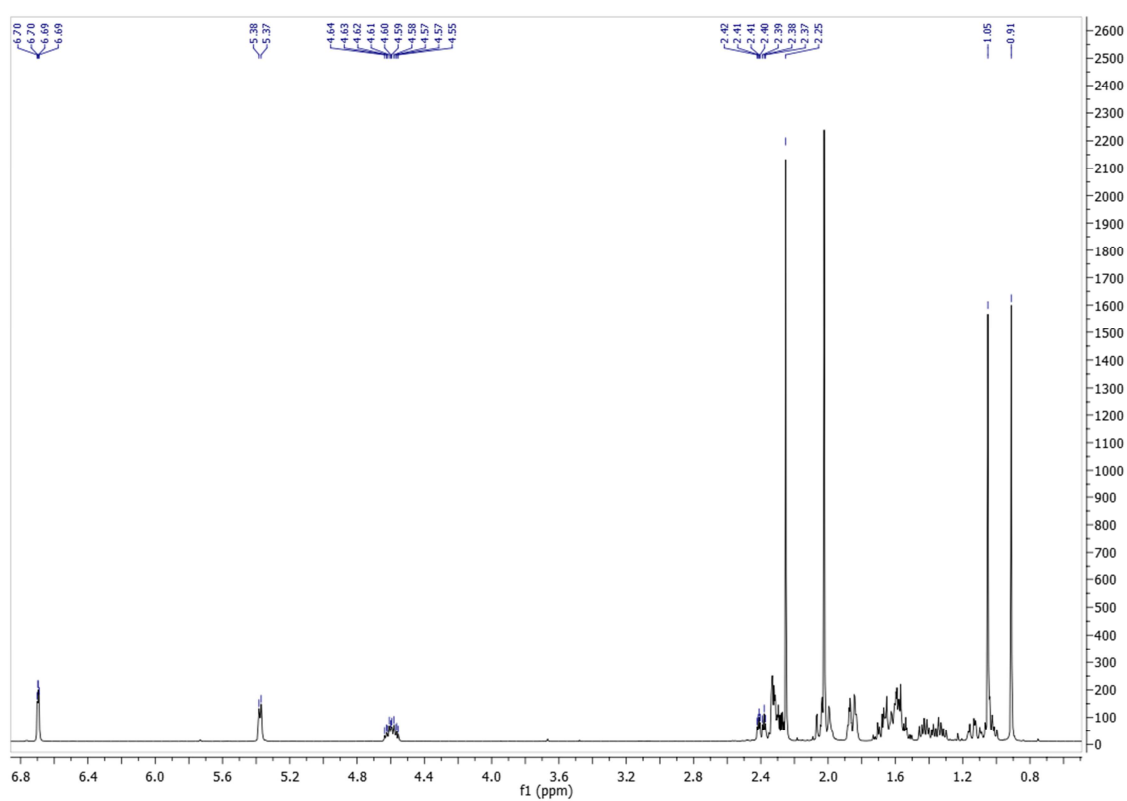
ANEXOS 1. ESPECTROS DE UV-Vis, IR, EM-FAB, RMN ¹H Y RMN ¹³C DE EL ACETATO DE 16-DESHIDROPREGNENOLONA (1)

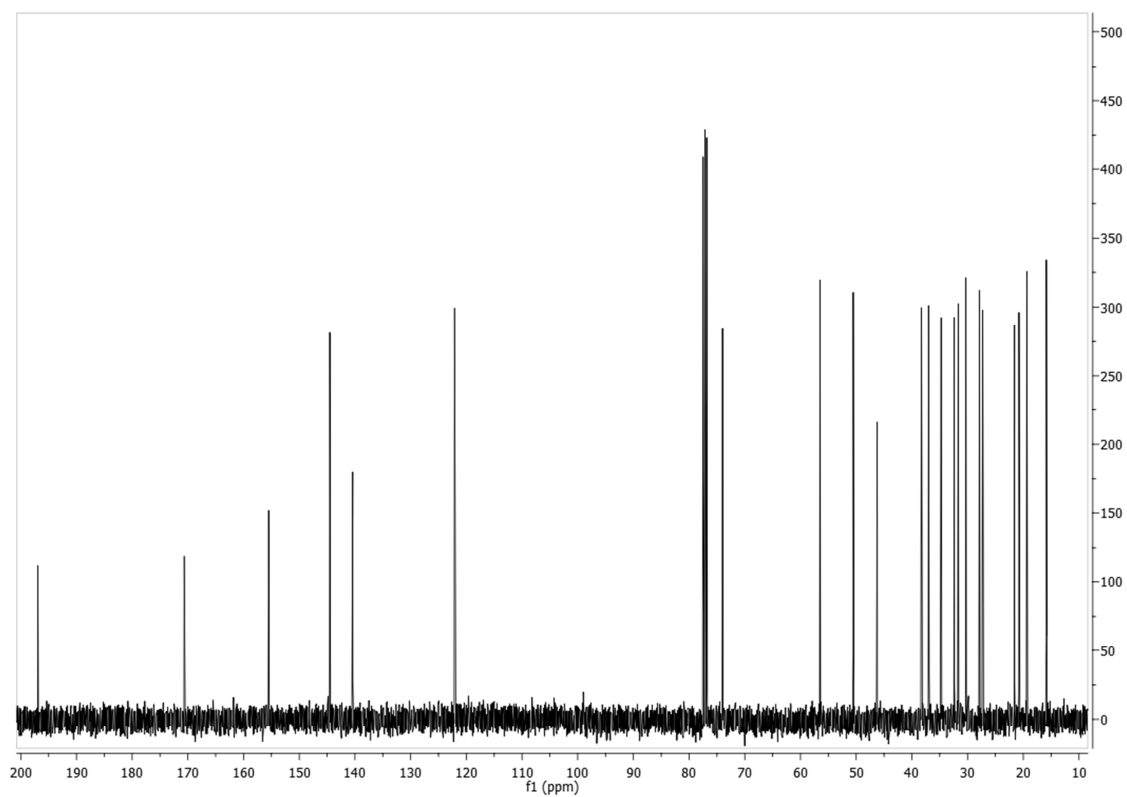
Anexo 1.1. Espectro de UV-Vis del acetato de 16-deshidropregnenolona (1)



Anexo 1.2. Espectro de IR del acetato de 16-deshidropregnenolona (1)



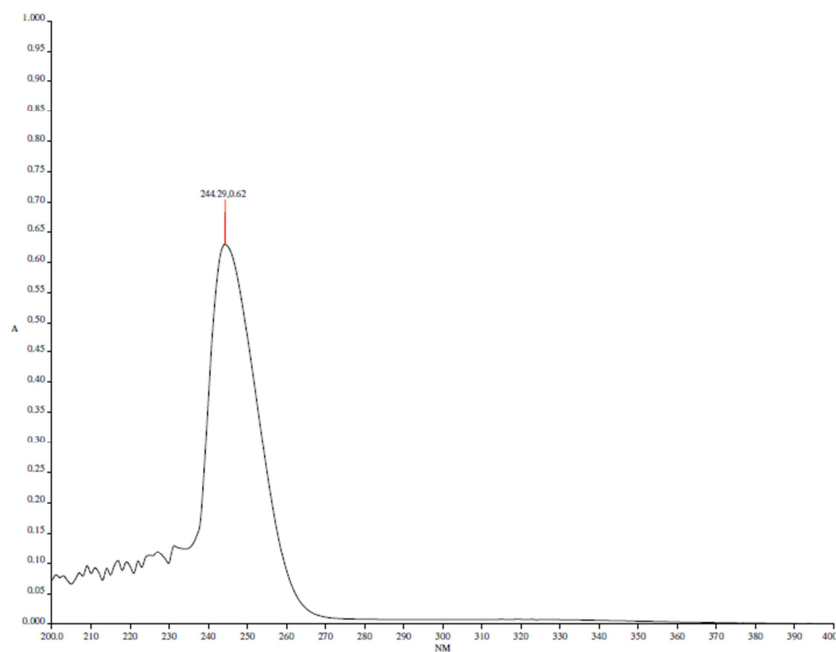
**Anexo 1.3. Espectro de EM-FAB del acetato de 16-deshidropregnenolona (1)****Anexo 1.4. Espectro de RMN ^1H del acetato de 16-deshidropregnenolona (1)**

**Anexo 1.4.** Espectro de RMN ^{13}C del acetato de 16-deshidropregnenolona (1)

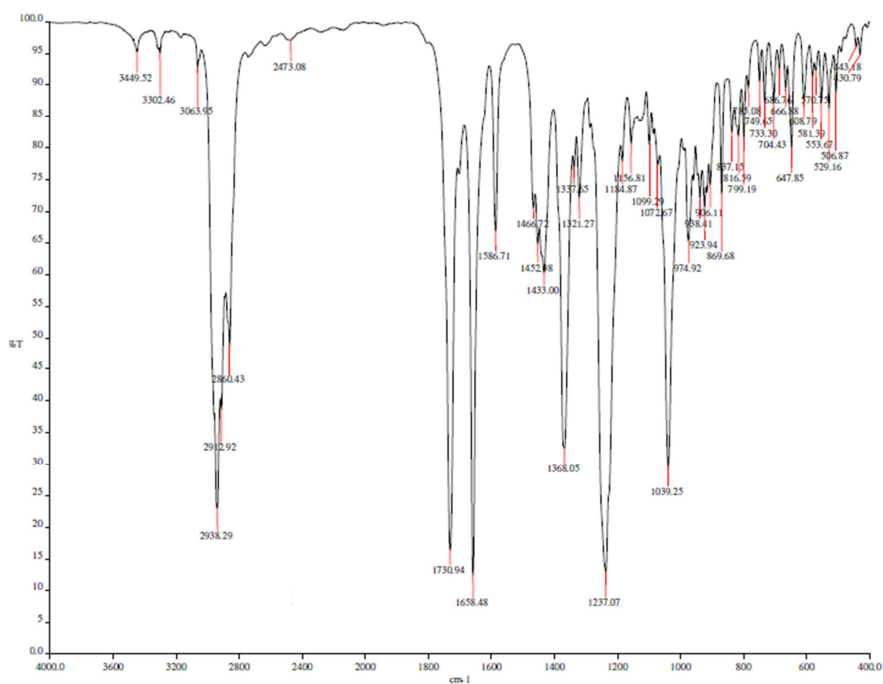


ANEXOS 2. ESPECTROS DE UV-Vis, IR, EM-FAB, RMN ¹H Y RMN ¹³C DE LA 3β-ACETOXI-5,6-EPOXIPREGNA-16-EN-20-ONA (2)

Anexo 2.1. Espectro UV-Vis de la 3β-acetoxi-5ξ,6ξ-epoxipregna-16-en-20-ona (2)

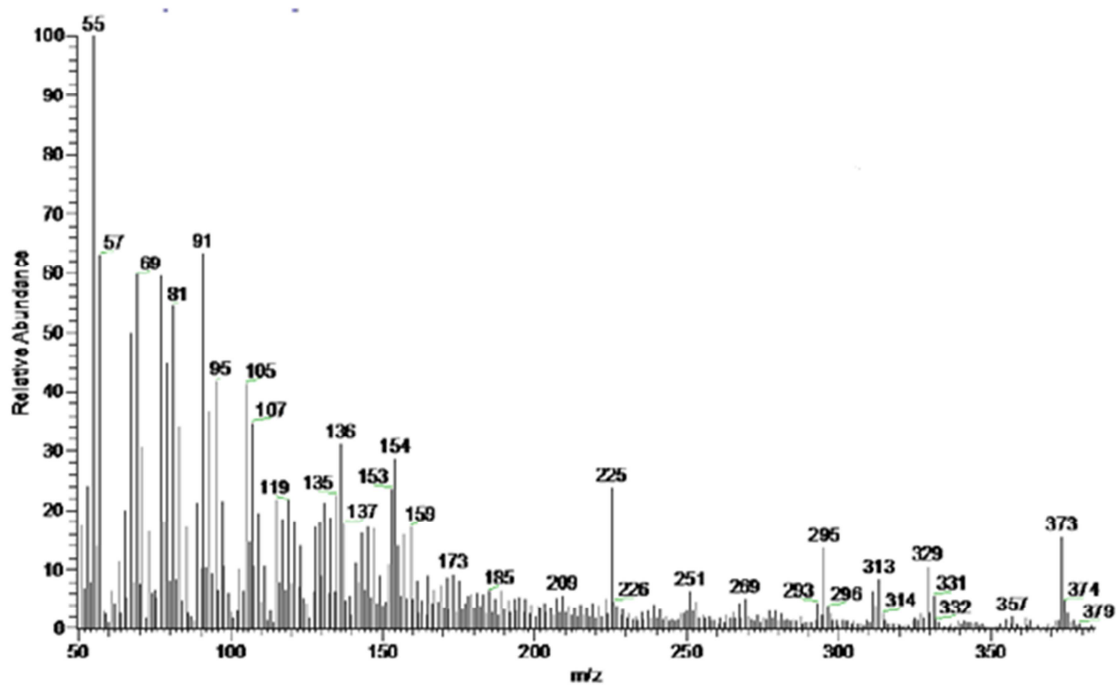


Anexo 2.2. Espectro de IR de la 3β-acetoxi-5ξ,6ξ-epoxipregna-16-en-20-ona (2)

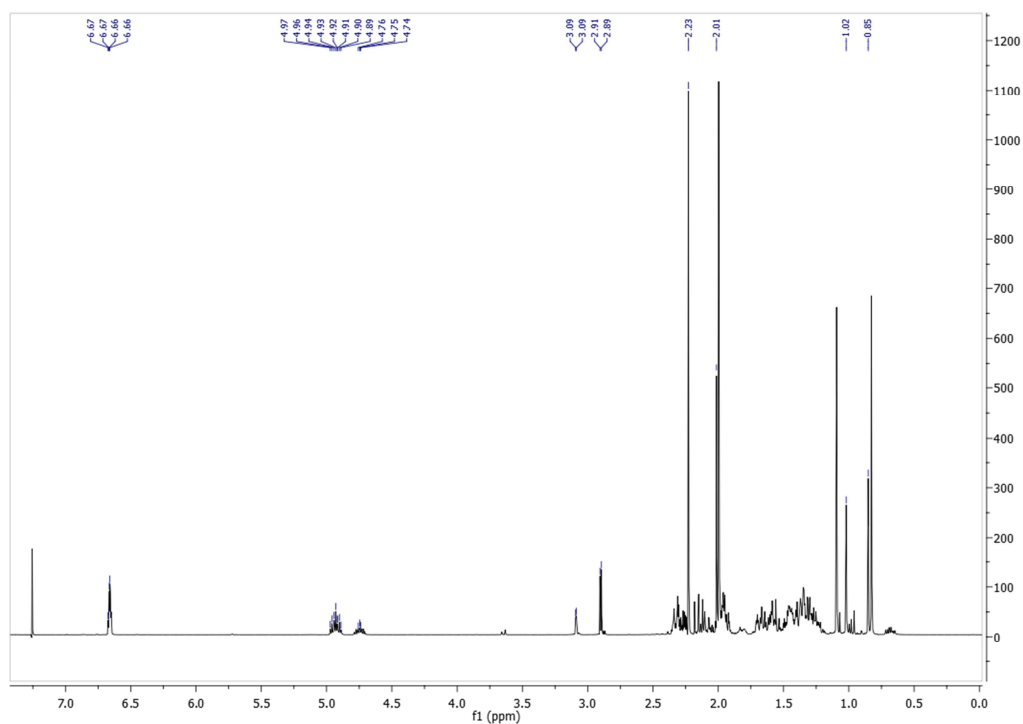




Anexo 2.3. Espectro EM-FAB de la 3 β -acetoxi-5 ξ ,6 ξ -epoxipregna-16-en-20-ona
(2)

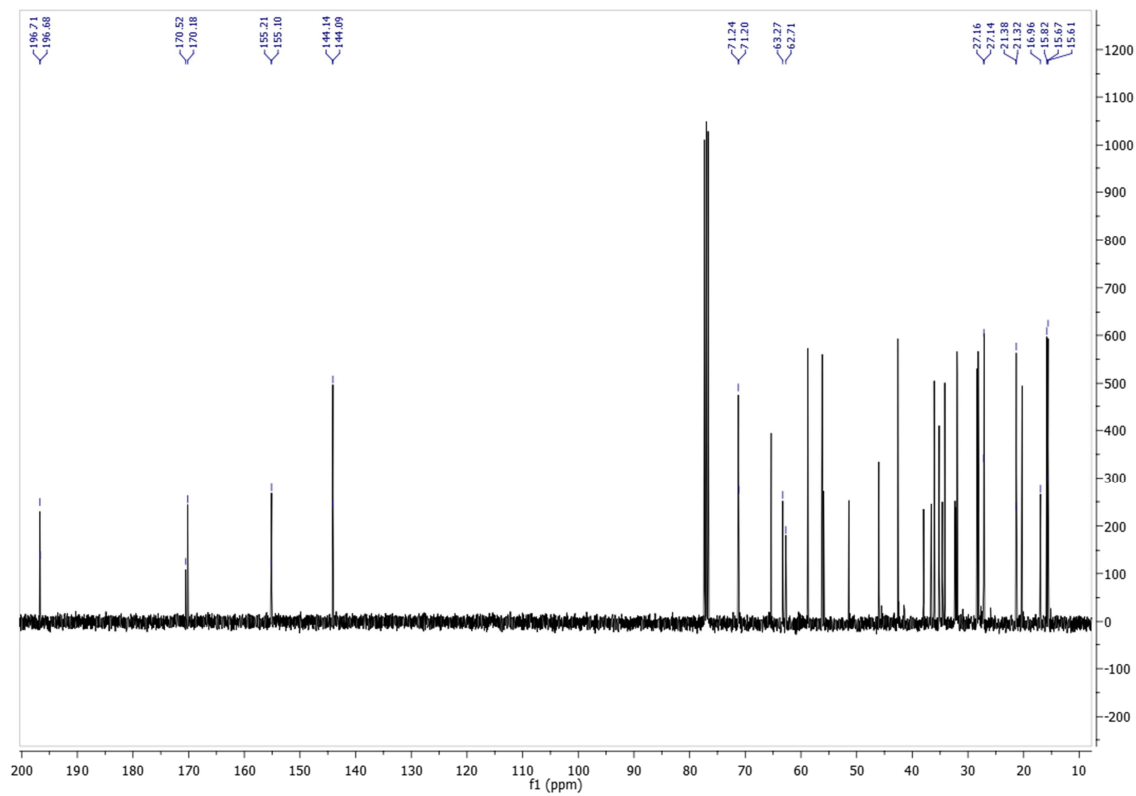


Anexo 2.4. Espectro RMN ^1H de la 3 β -acetoxi-5 ξ ,6 ξ -epoxipregna-16-en-20-ona
(2)





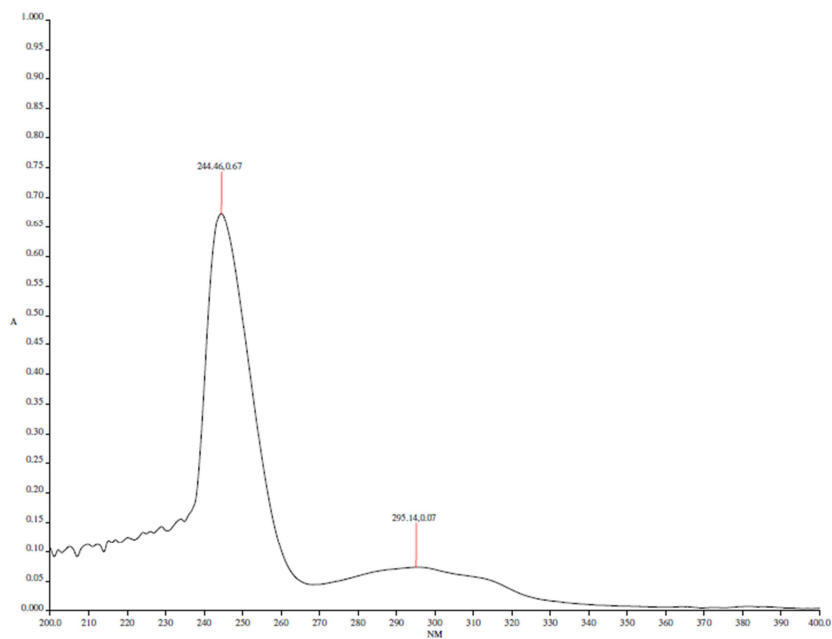
Anexo 2.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3 β -acetoxi-5 ξ ,6 ξ -epoxipregna-16-en-20-ona (2)



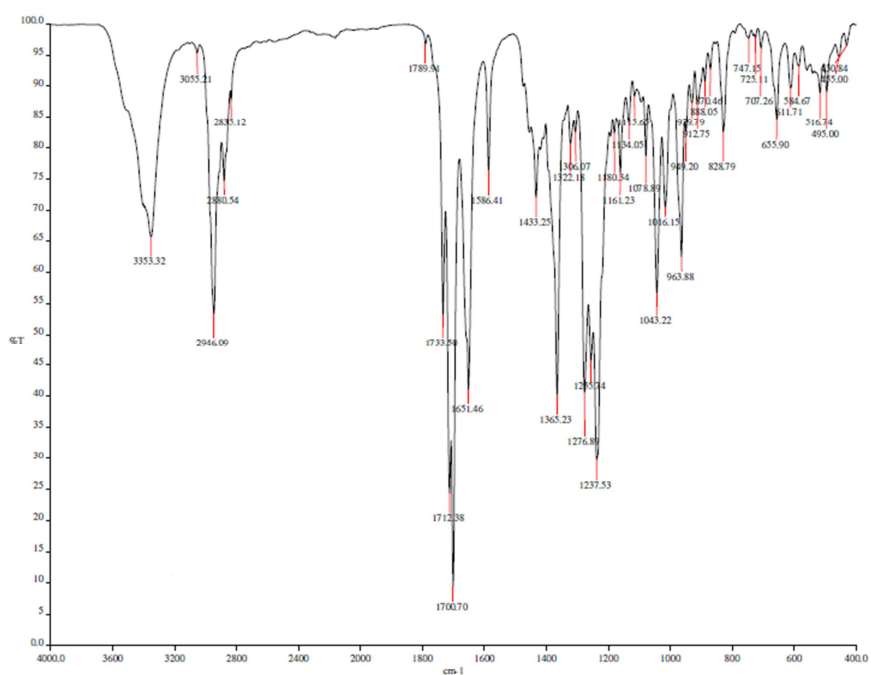


ANEXOS 3. ESPECTROS DE UV-Vis, IR, EM-FAB, RMN ¹H Y RMN ¹³C DE LA 3β-ACETOXI-5-HIDROXIPREGNA-16-EN-6,20-DIONA (3)

Anexo 3.1. Espectro de UV-Vis de la 3β-acetoxi-5ξ-hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3)

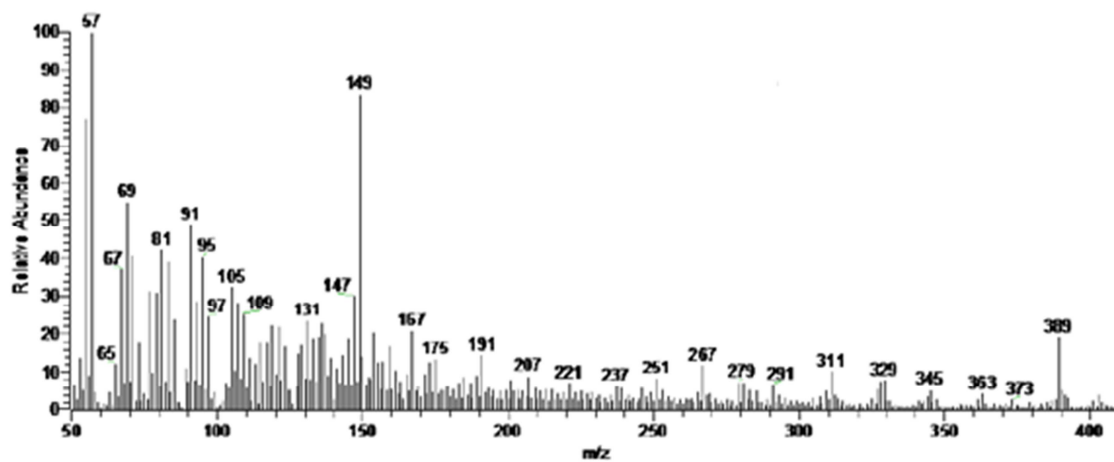


Anexo 3.2. Espectro de IR de la 3β-acetoxi-5ξ-hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3)

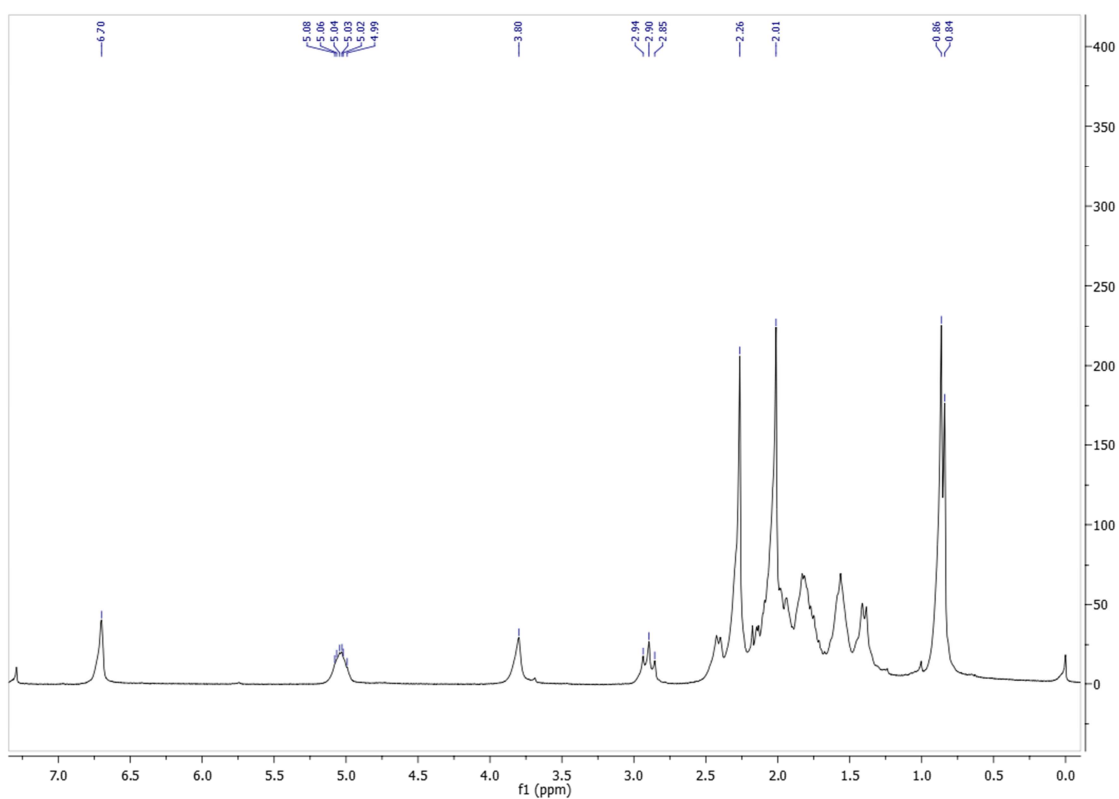




Anexo 3.3. Espectro de EM-FAB de la 3β -acetoxi- 5ξ -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (**3**)

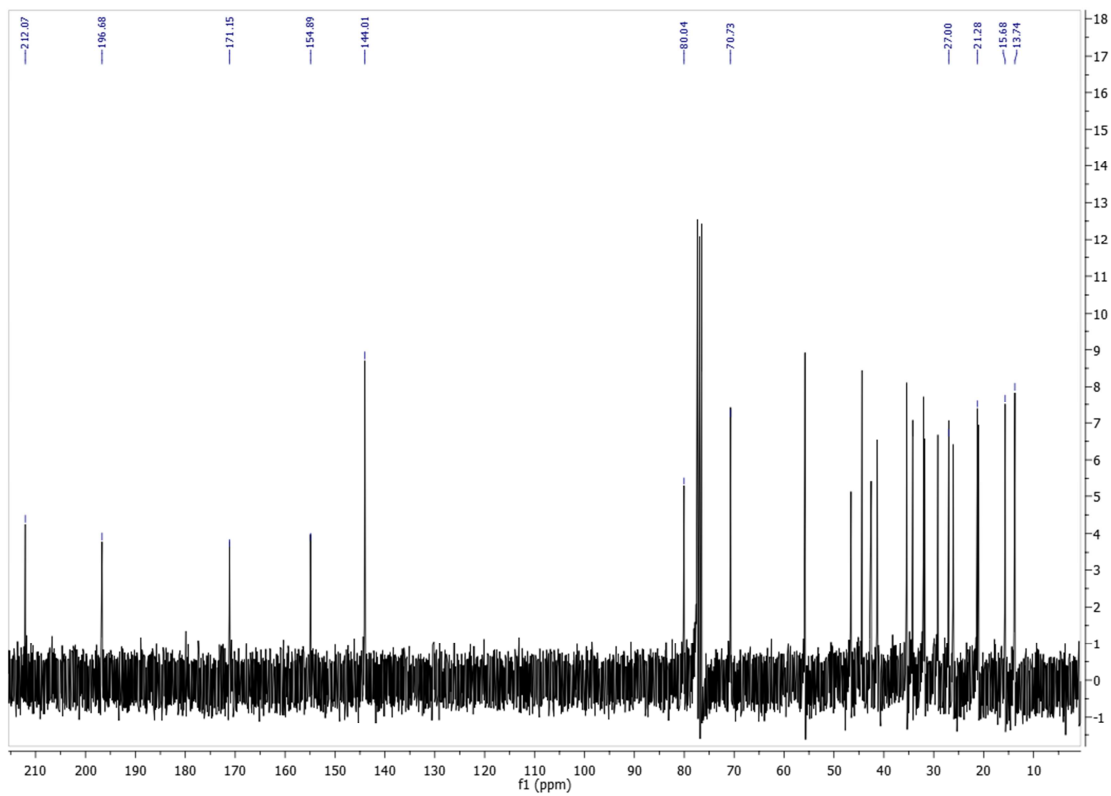


Anexo 3.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -acetoxi- 5ξ -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (**3**)





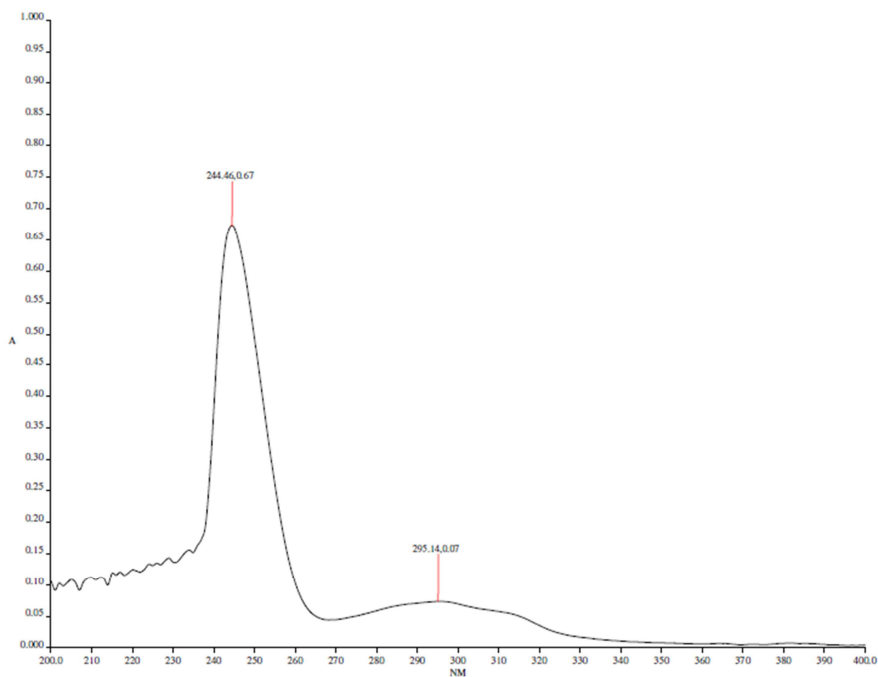
Anexo 3.5. Espectro de RMN ^1H de la 3β -acetoxi- 5ξ -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (**3**)



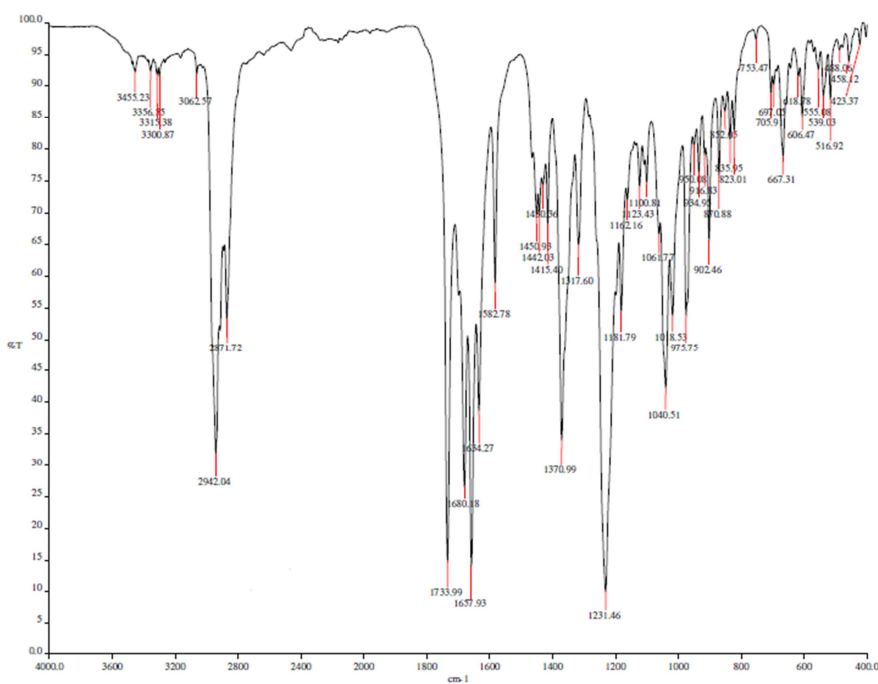


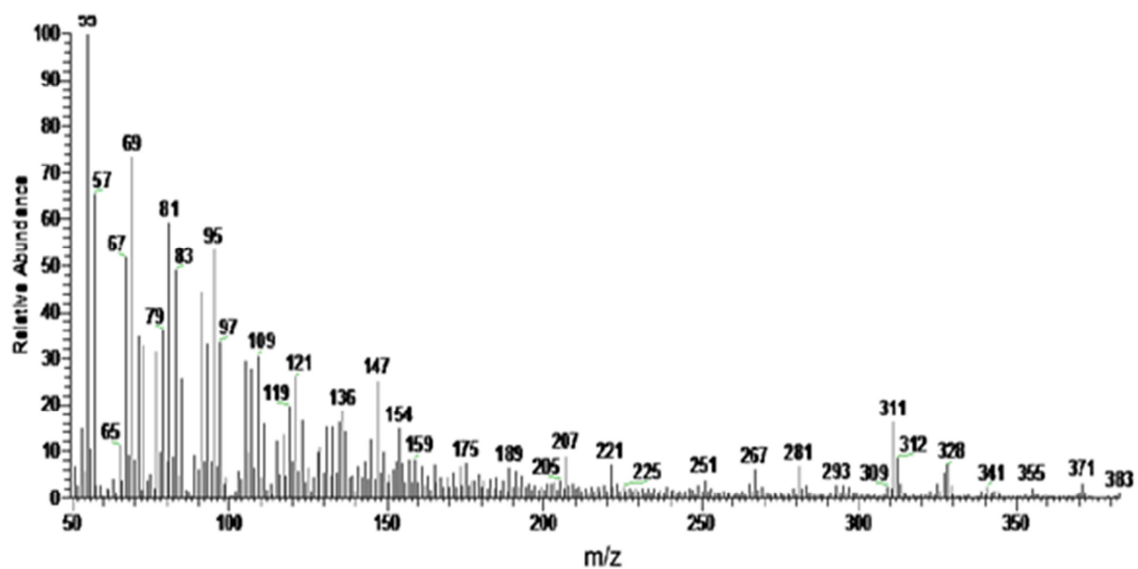
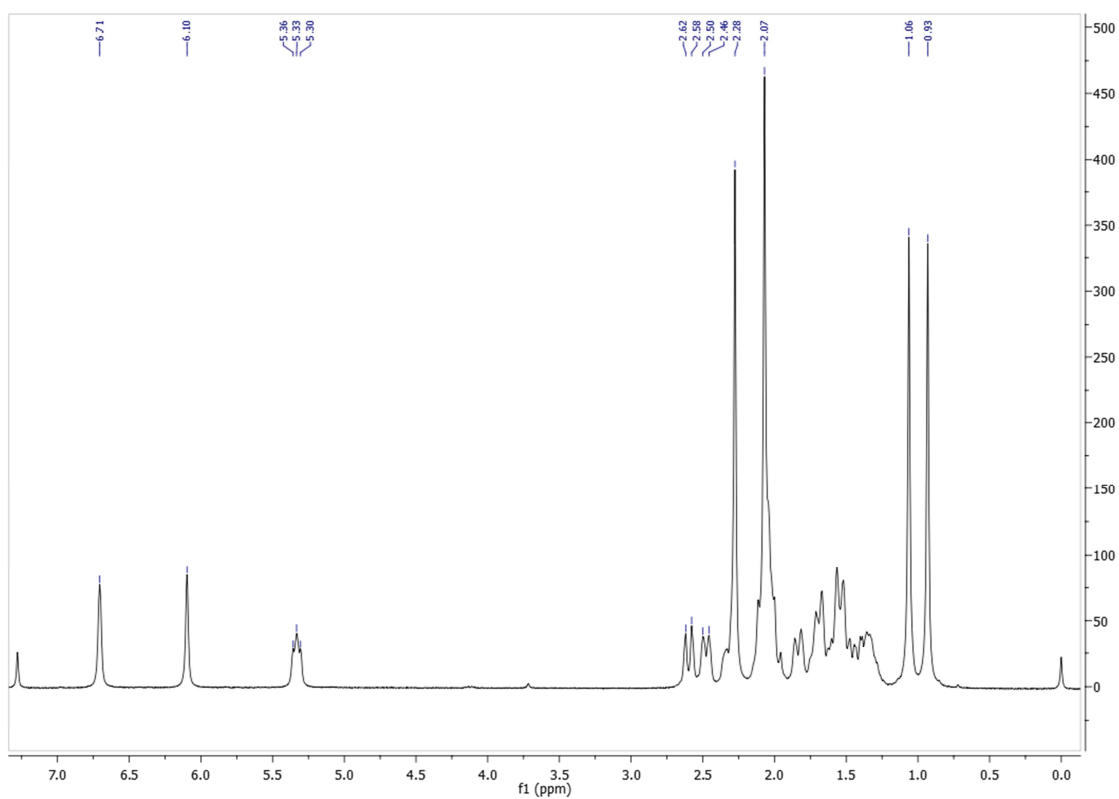
ANEXOS 4. ESPECTROS DE UV-Vis, IR, EM-FAB, RMN ¹H Y RMN ¹³C DE LA 3β-ACETOXIPREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (4)

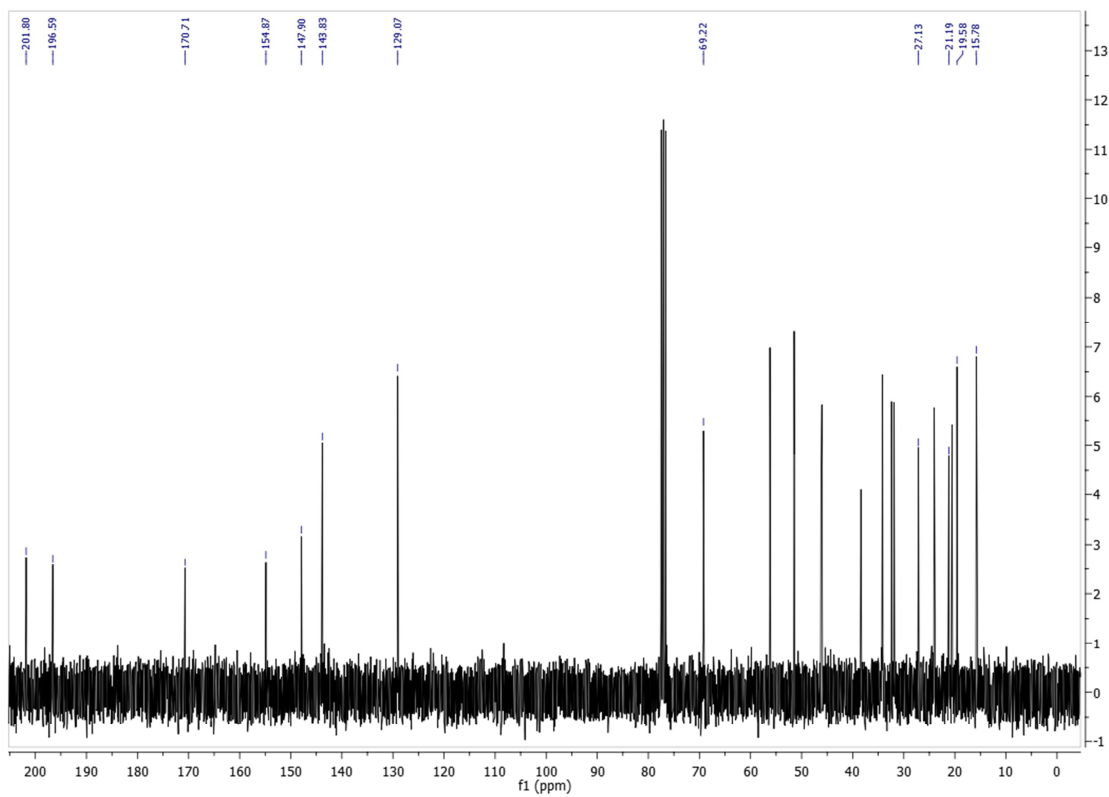
Anexo 4.1. Espectro de UV-Vis de la 3β-acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4)



Anexo 4.2. Espectro de IR de la 3β-acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4)



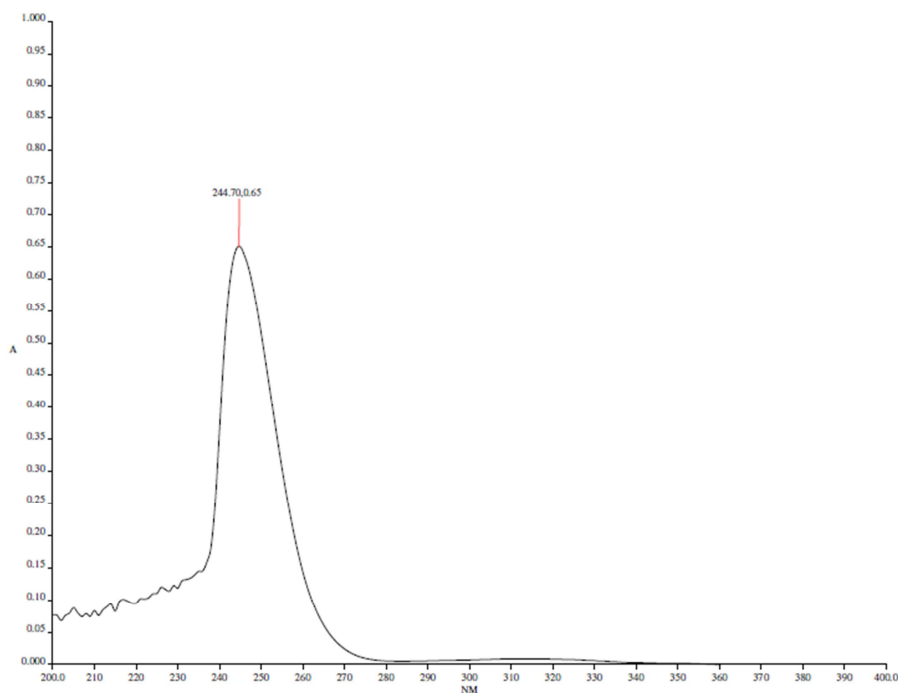
**Anexo 4.3.** Espectro de EM-FAB de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4)**Anexo 4.4.** Espectro de RMN ^1H de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4)

**Anexo 4.5.** Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4)

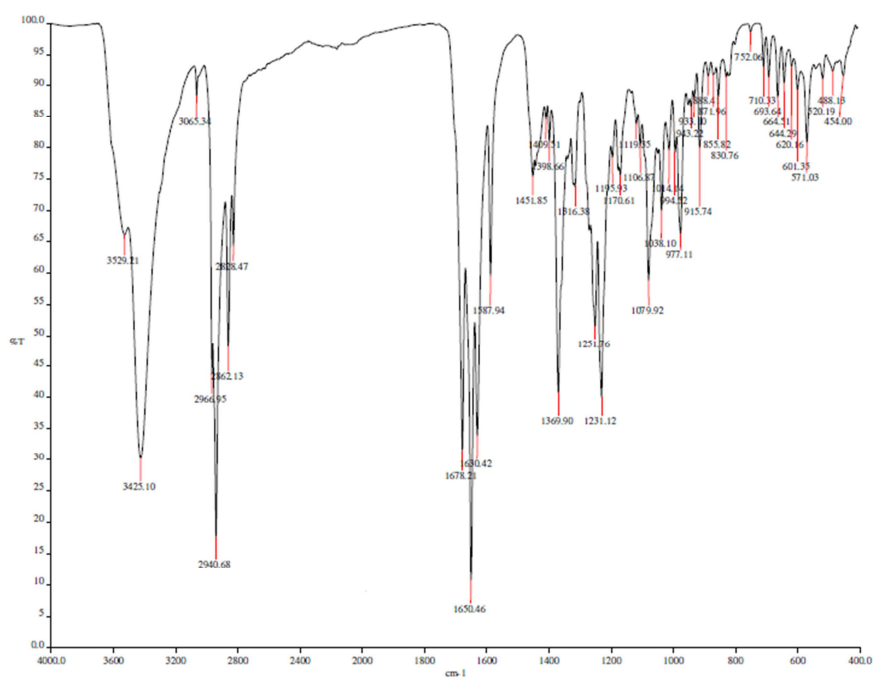


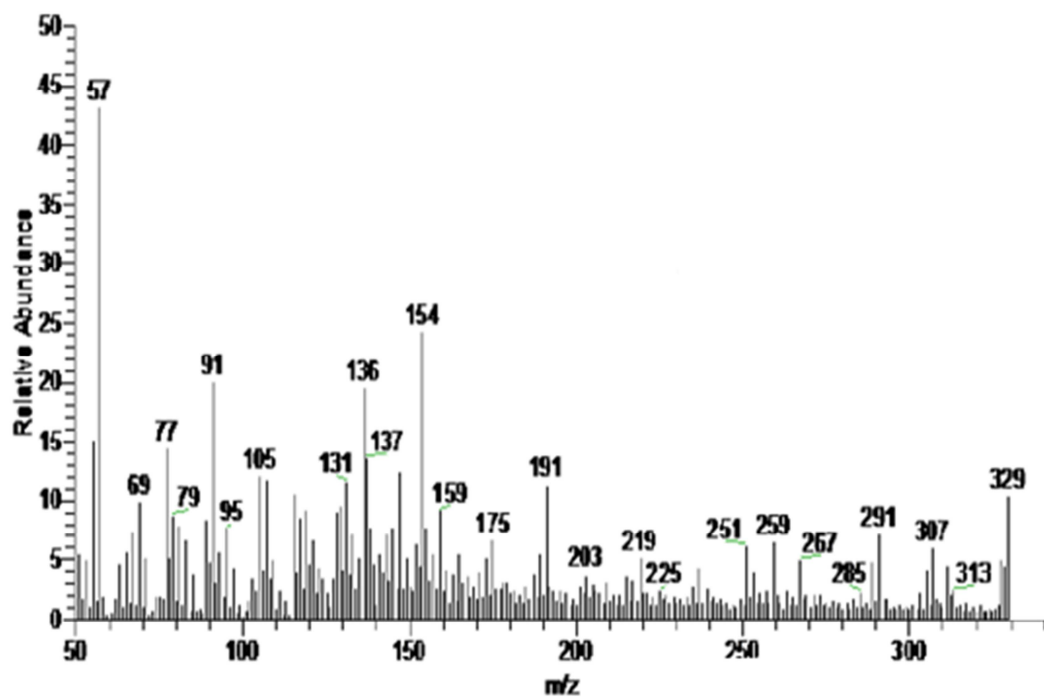
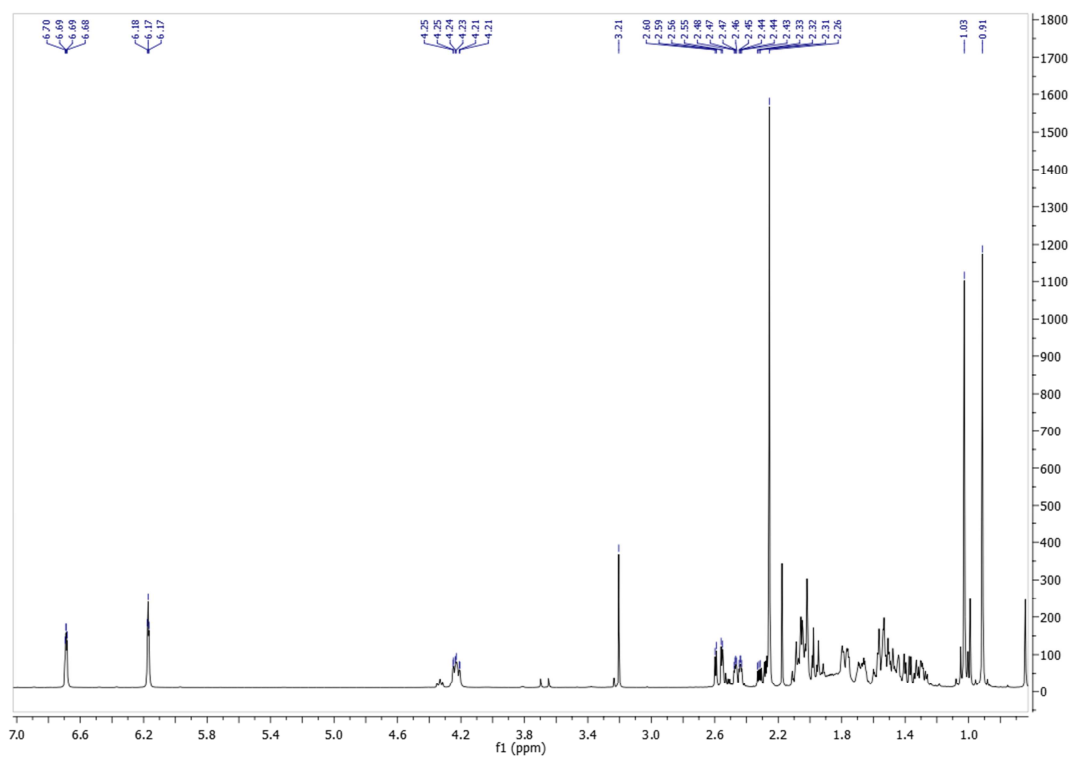
ANEXOS 5. ESPECTROS DE UV-Vis, IR, EM-FAB, RMN ¹H Y RMN ¹³C DE LA 3β-HIDROXIPREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (5)

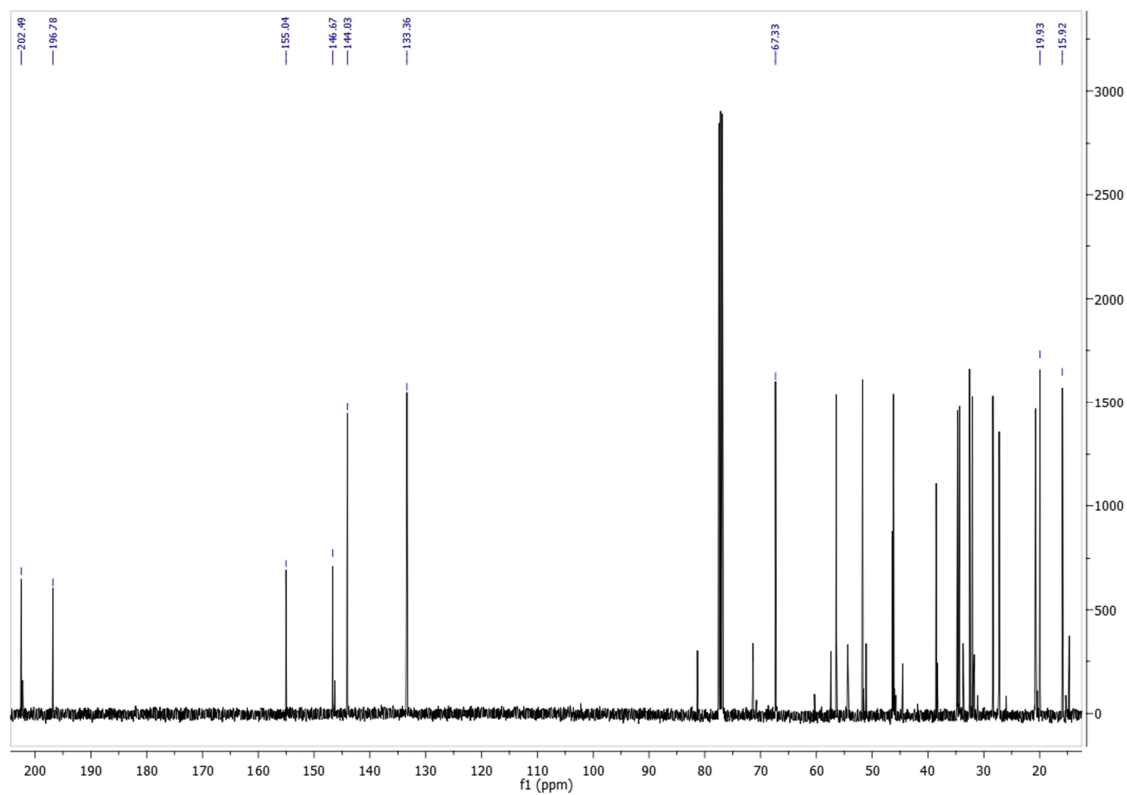
Anexo 5.1. Espectro de UV-Vis de la 3β-hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)



Anexo 5.2. Espectro de IR de la 3β-hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)



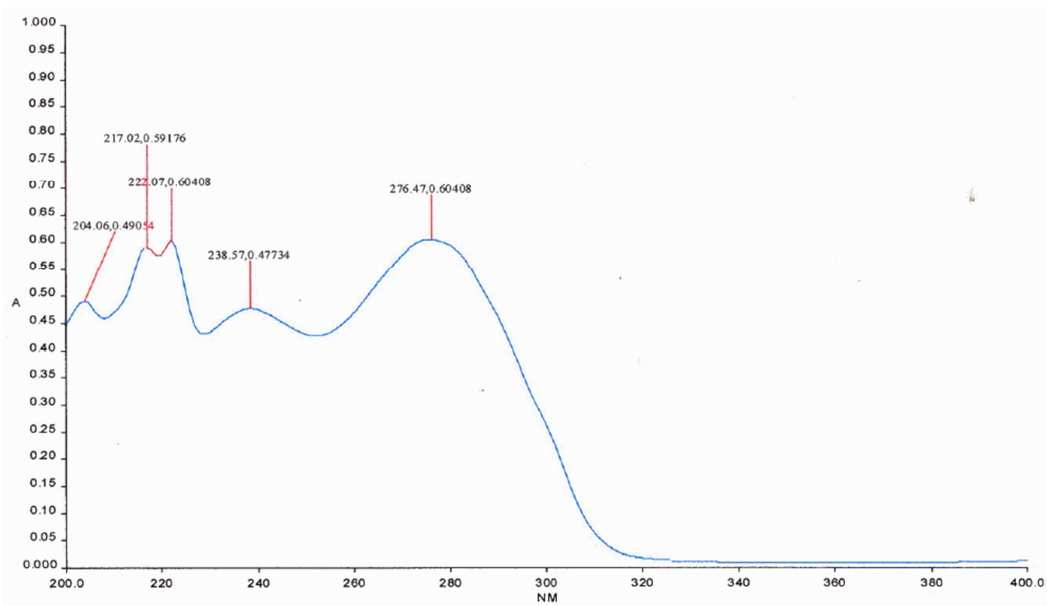
**Anexo 5.3.** Espectro de EM-FAB de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)**Anexo 5.4.** Espectro de RMN ^1H de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)

**Anexo 5.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)**

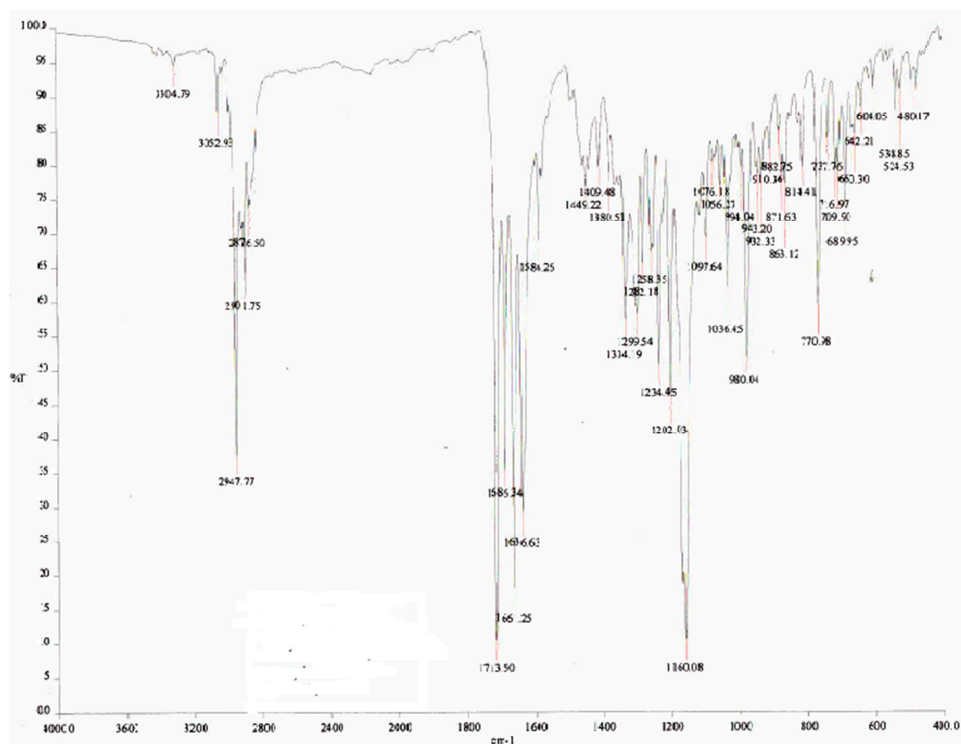


ANEXOS 6. ESPECTROS DE UV-Vis, IR, EM-FAB, RMN ^1H Y RMN ^{13}C DE LAS 3β -CINAMOILOXIPREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONAS 6a-h

Anexo 6a.1. Espectro de UV-Vis de la 3β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6a)

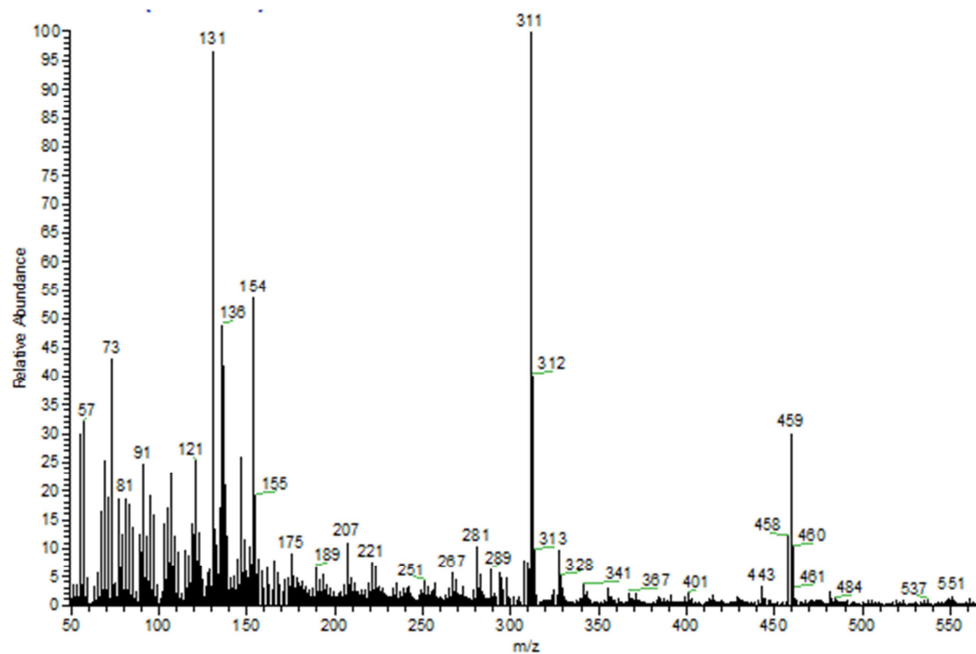


Anexo 6a.2. Espectro de IR de la 3β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6a)

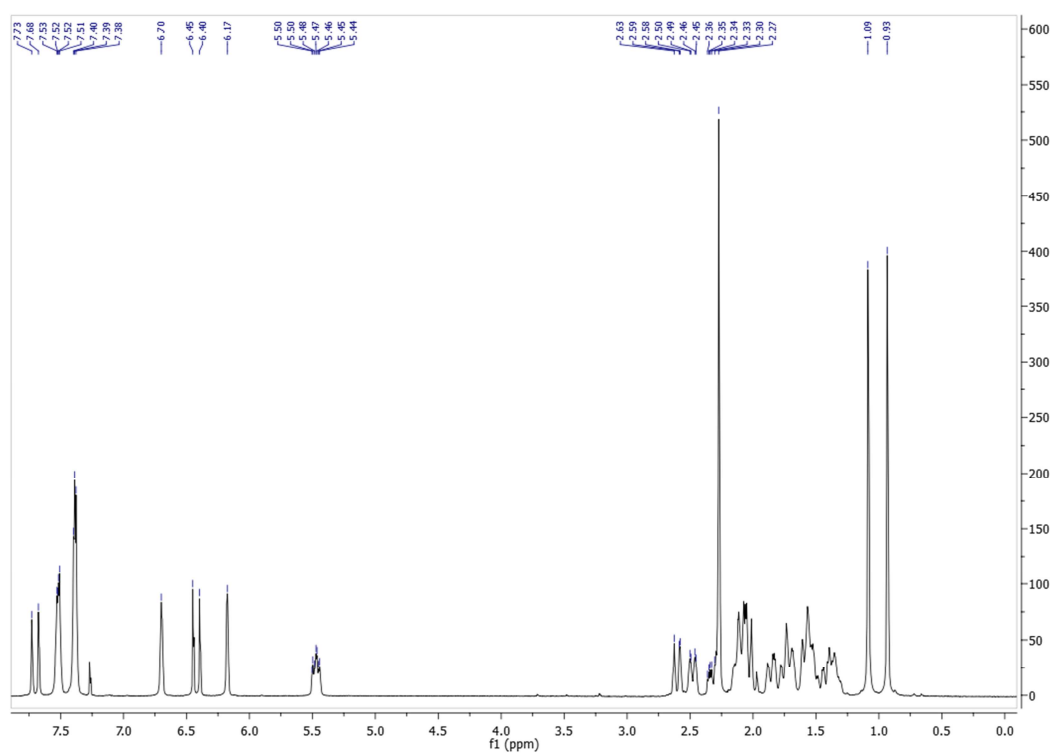




Anexo 6a.3. Espectro de EM-FAB de la 3 β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6a**)

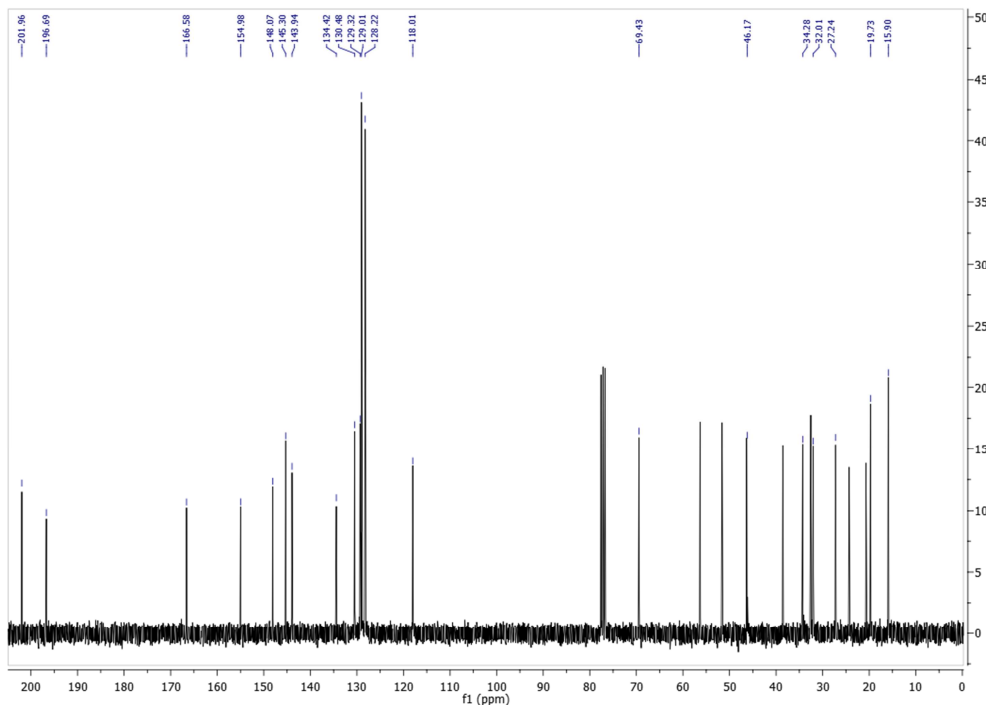


Anexo 6a.4. Espectro de RMN ^1H de la 3 β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6a**)

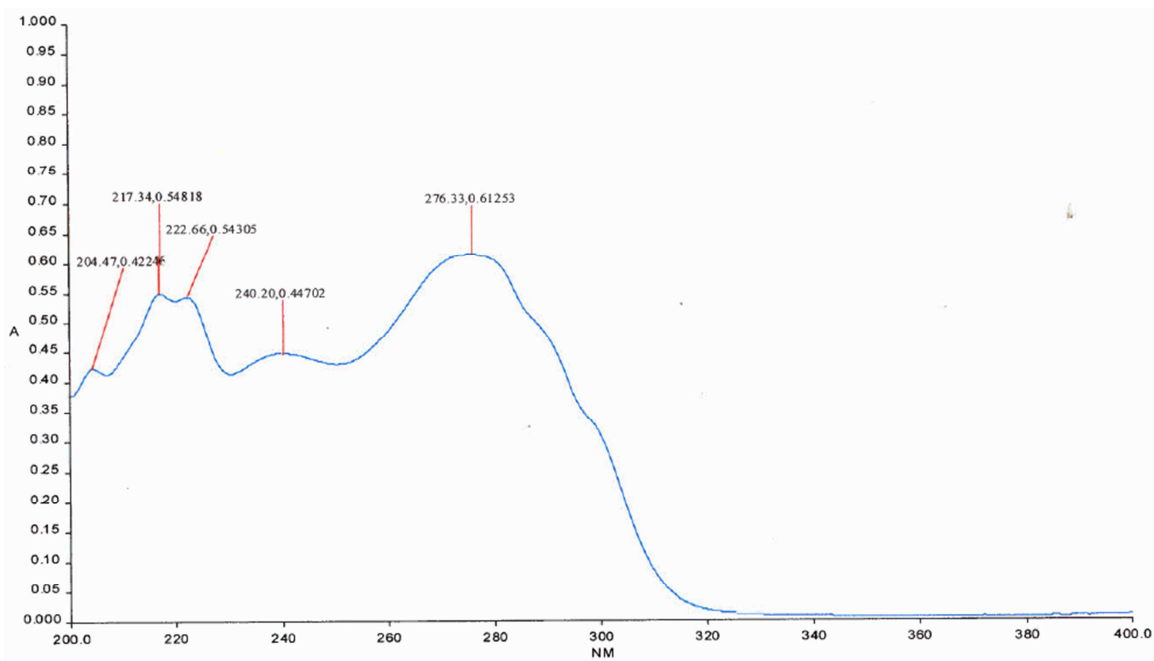




Anexo 6a.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6a**)

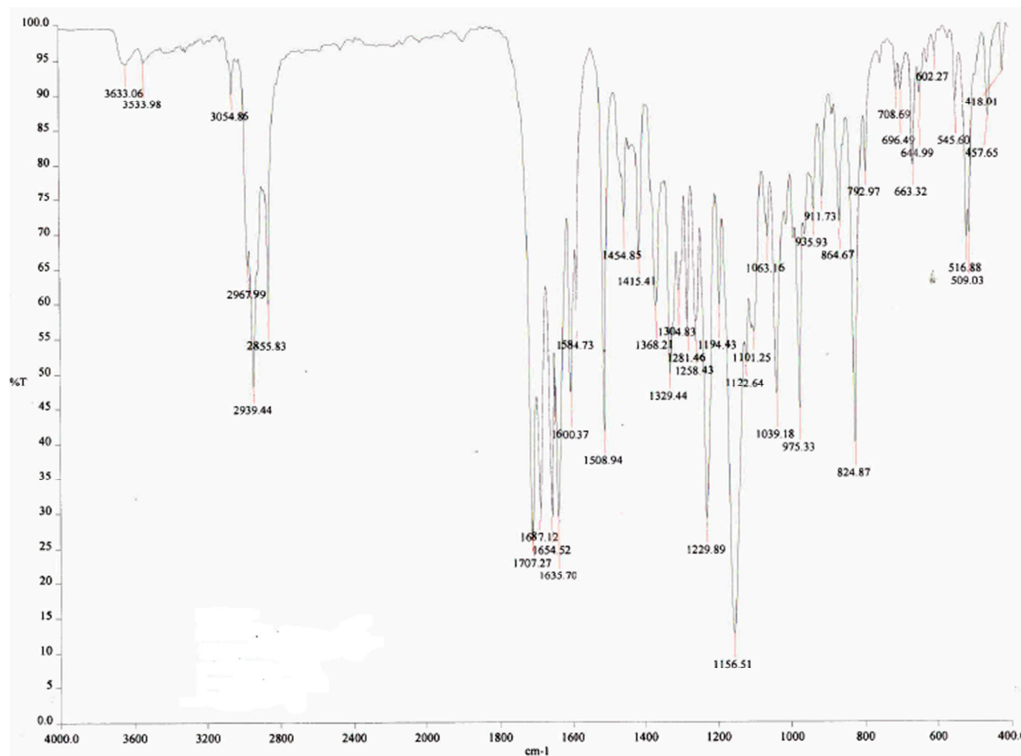


Anexo 6b.1. Espectro de UV-Vis de la 3β -(*p*-fluoro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6b**)

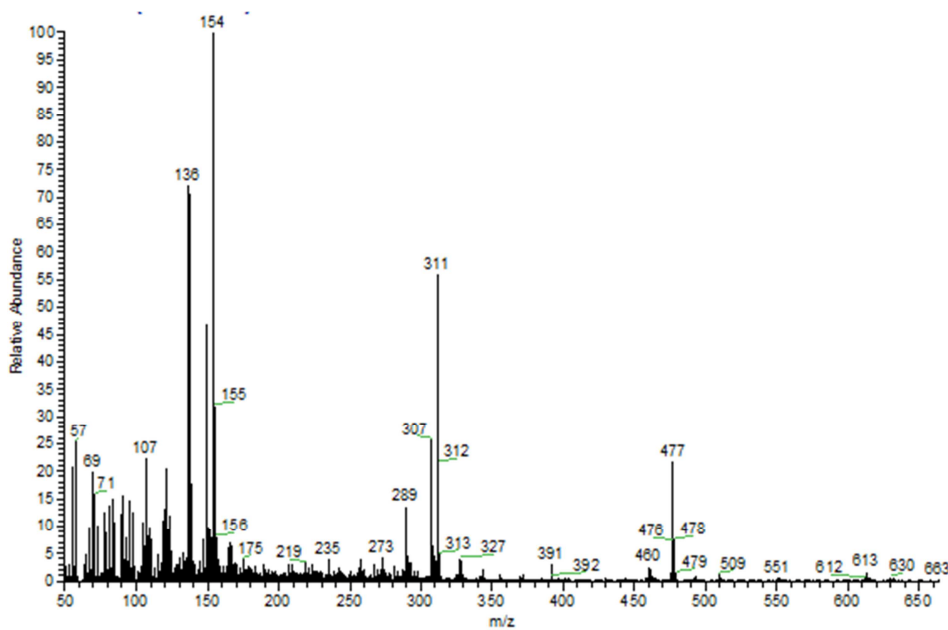




Anexo 6b.2. Espectro de IR de la 3 β -(*p*-fluoro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6b**)

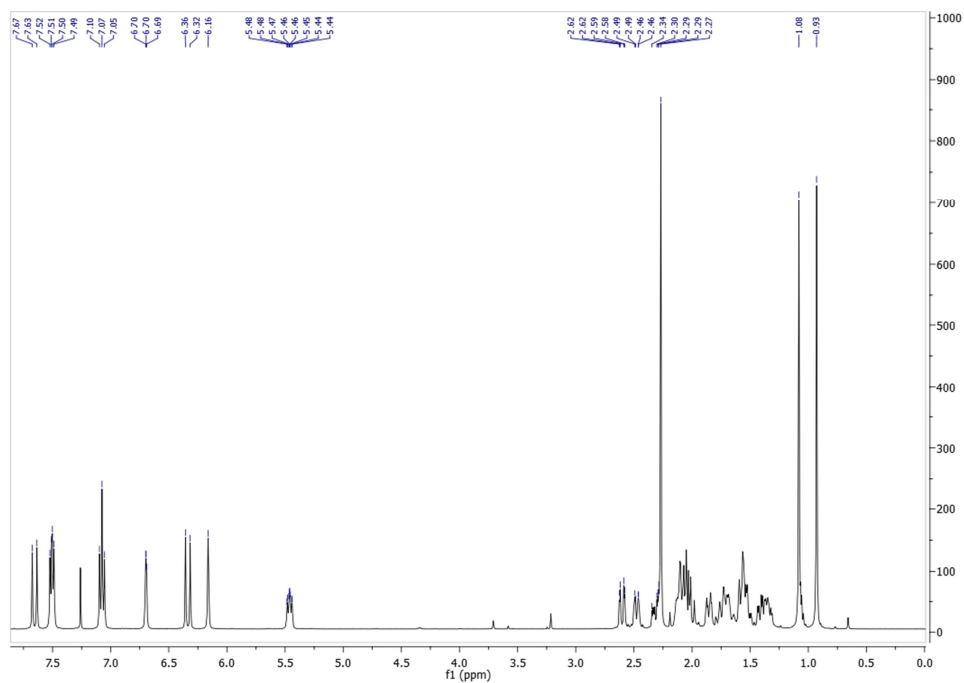


Anexo 6b.3. Espectro de EM-FAB de la 3 β -(*p*-fluoro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6b**)

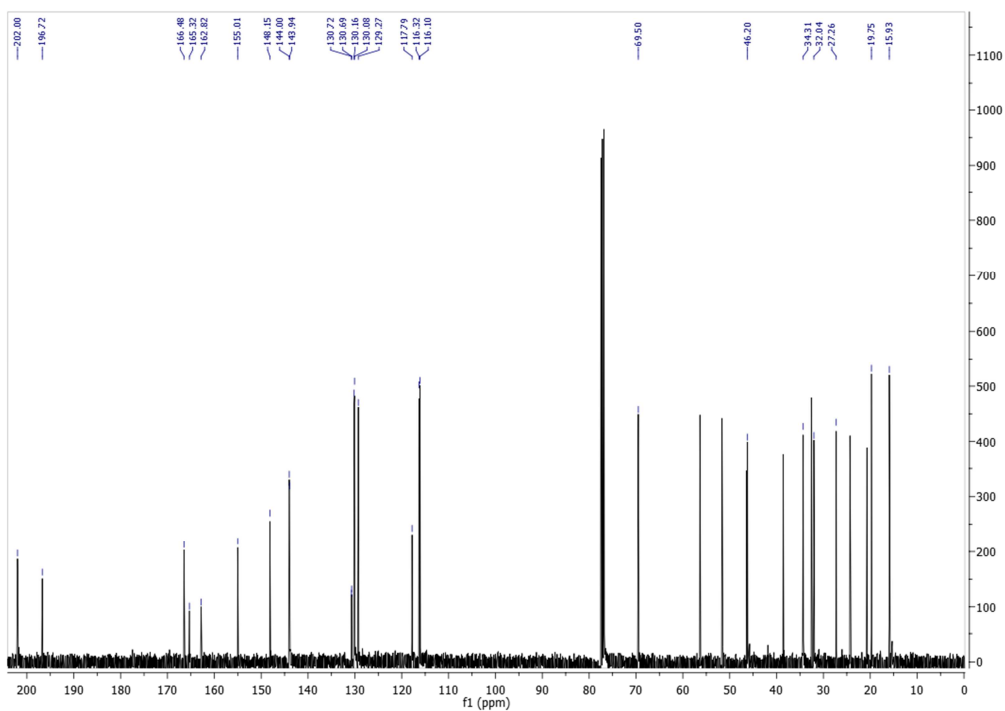




Anexo 6b.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -(*p*-fluoro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6b**)

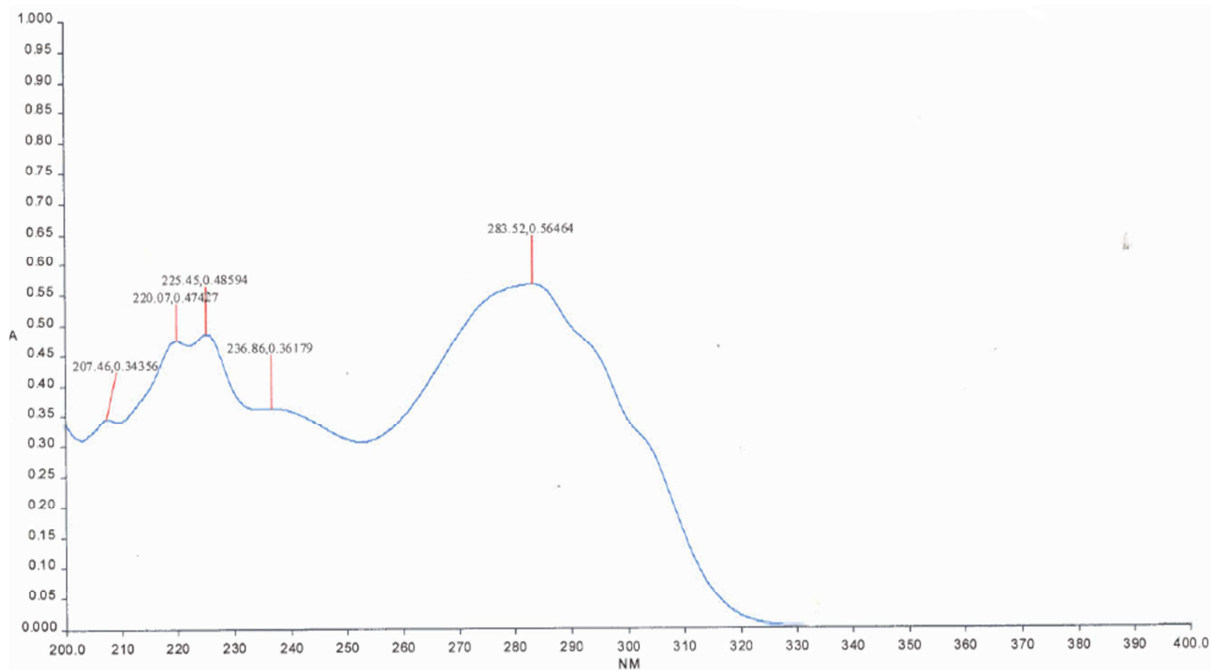


Anexo 6b.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -(*p*-fluoro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6b**)

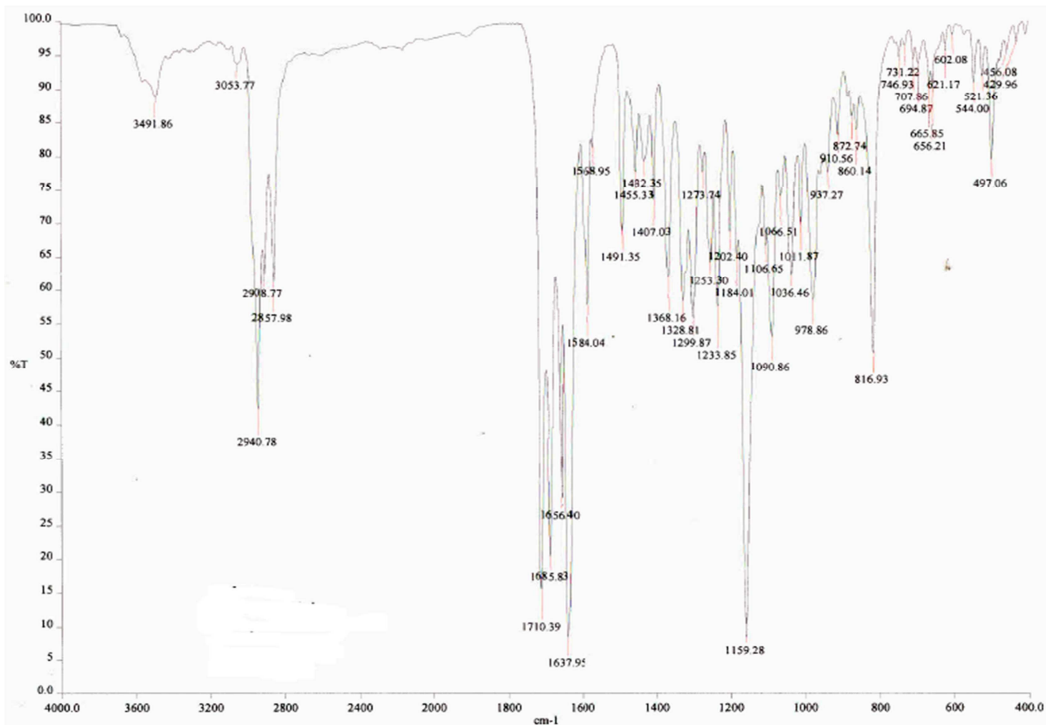




Anexo 6c.1. Espectro de UV-Vis de la 3 β -(*p*-cloro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6c**)

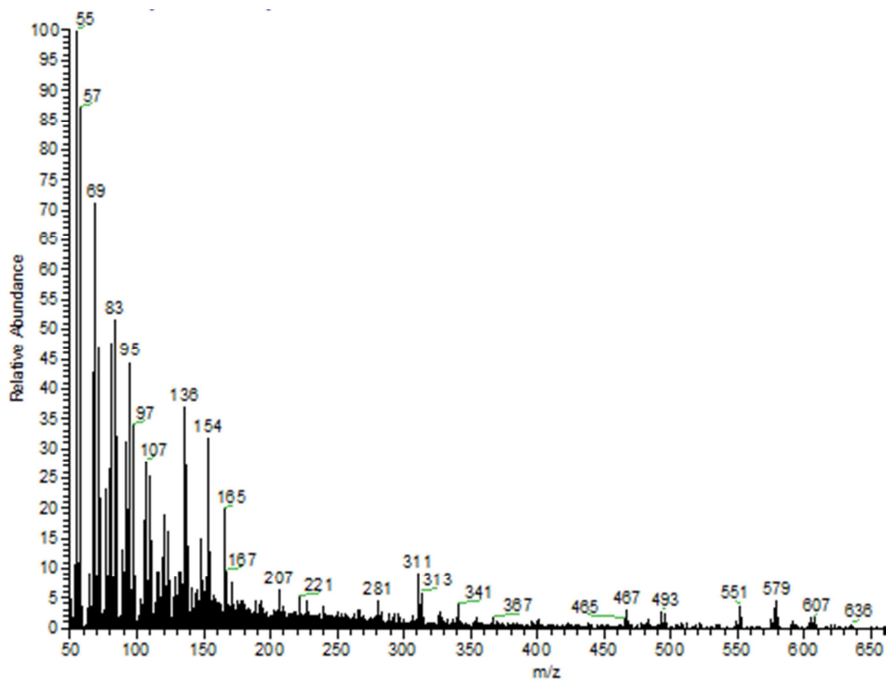


Anexo 6c.2. Espectro de IR de la 3 β -(*p*-cloro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6c**)

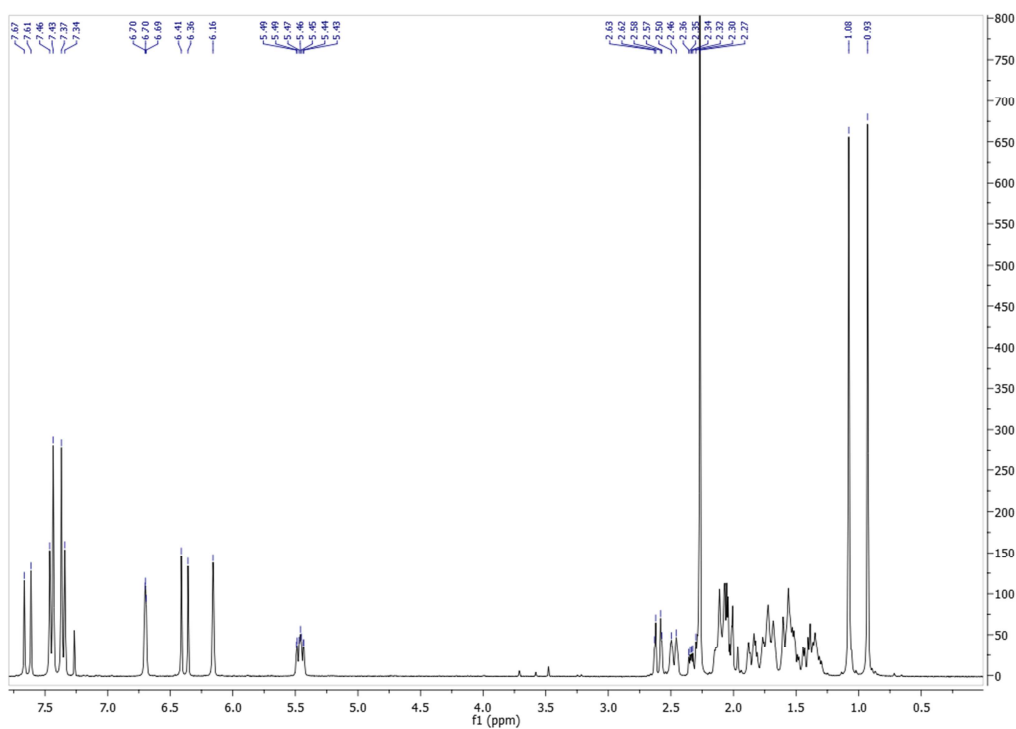




Anexo 6c.3. Espectro de EM-FAB de la 3 β -(*p*-cloro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6c**)

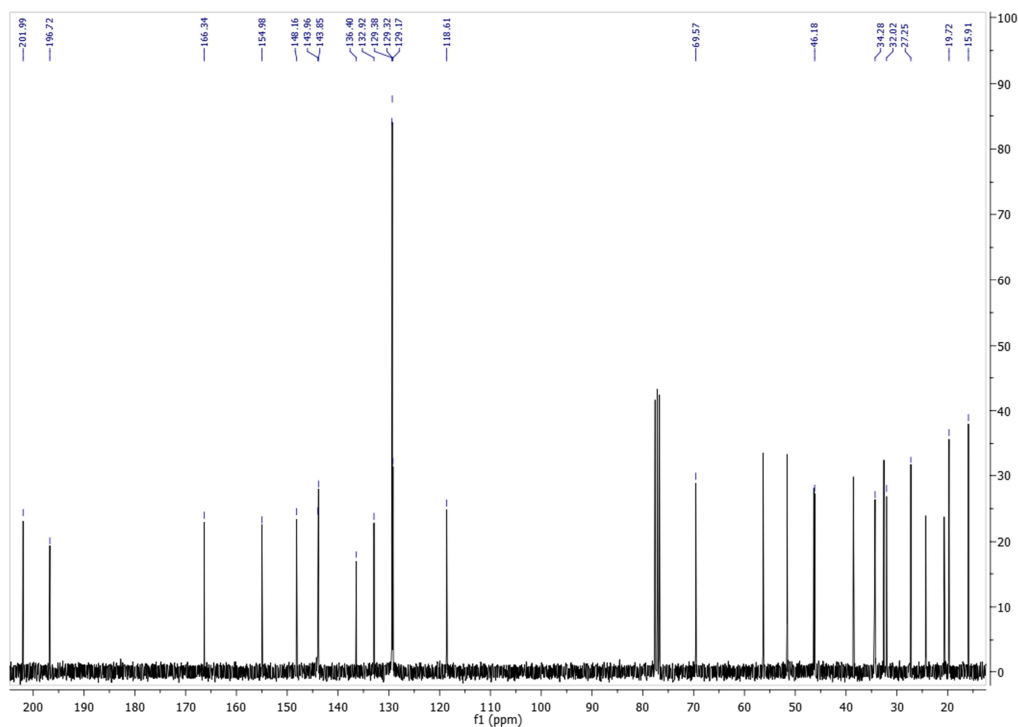


Anexo 6c.4. Espectro de RMN ^1H de la 3 β -(*p*-cloro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6c**)

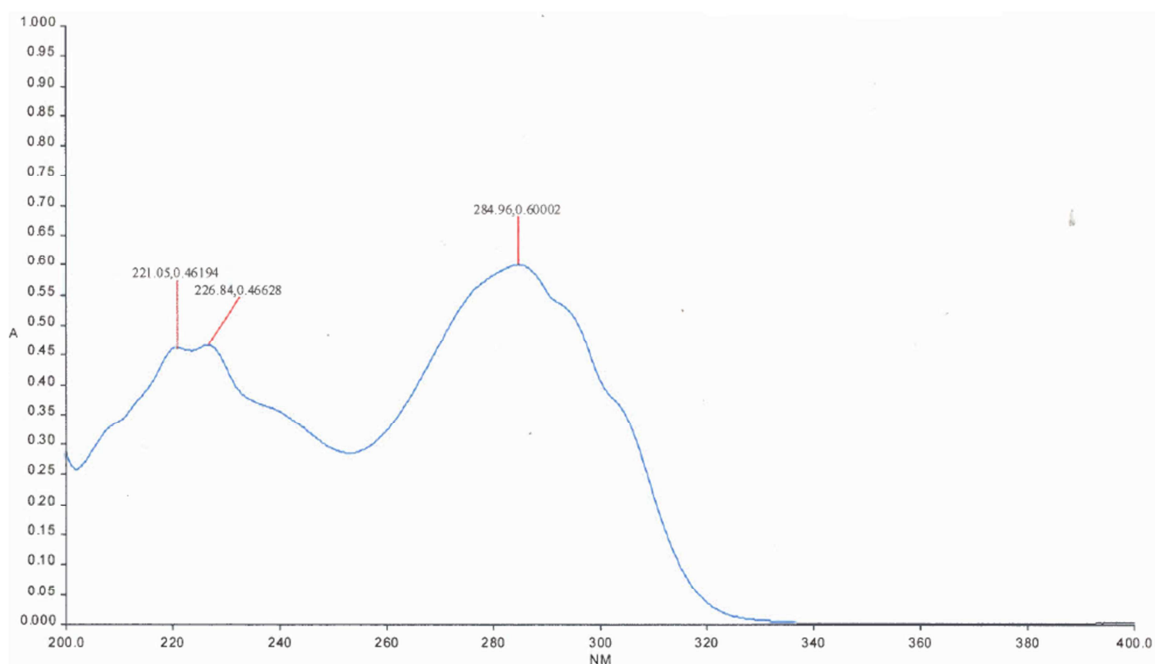




Anexo 6c.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3 β -(*p*-cloro)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6c**)

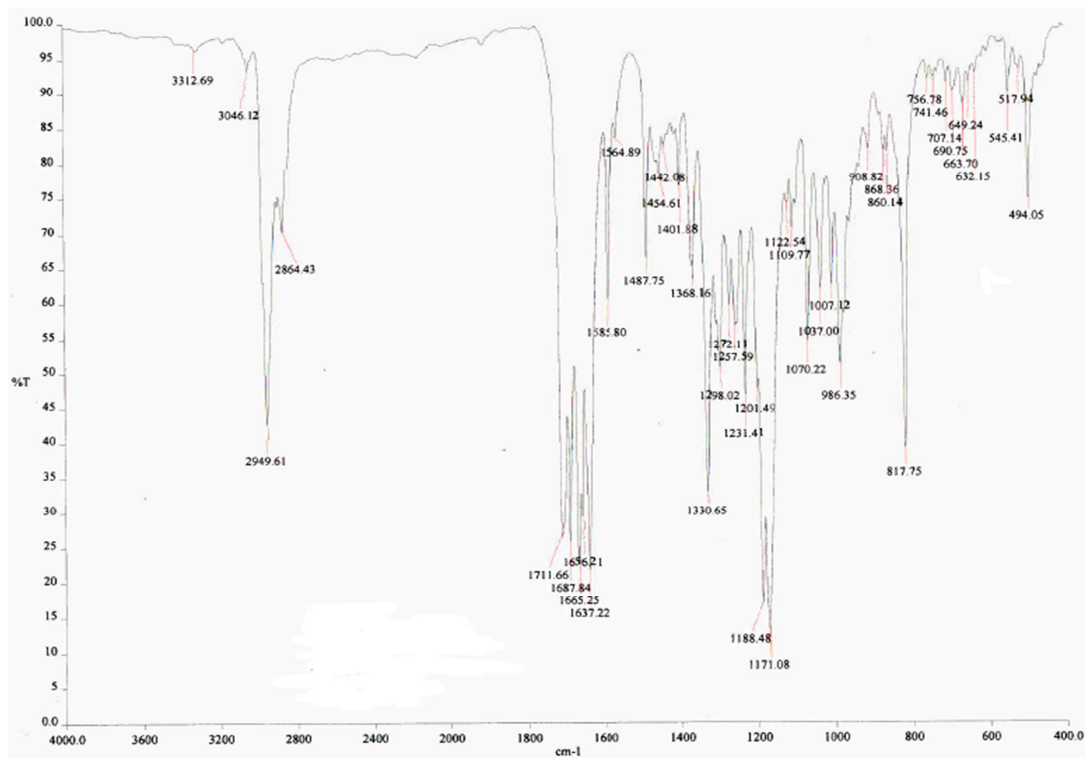


Anexo 6d.1. Espectro de UV-Vis de la 3 β -(*p*-bromo)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6d**)

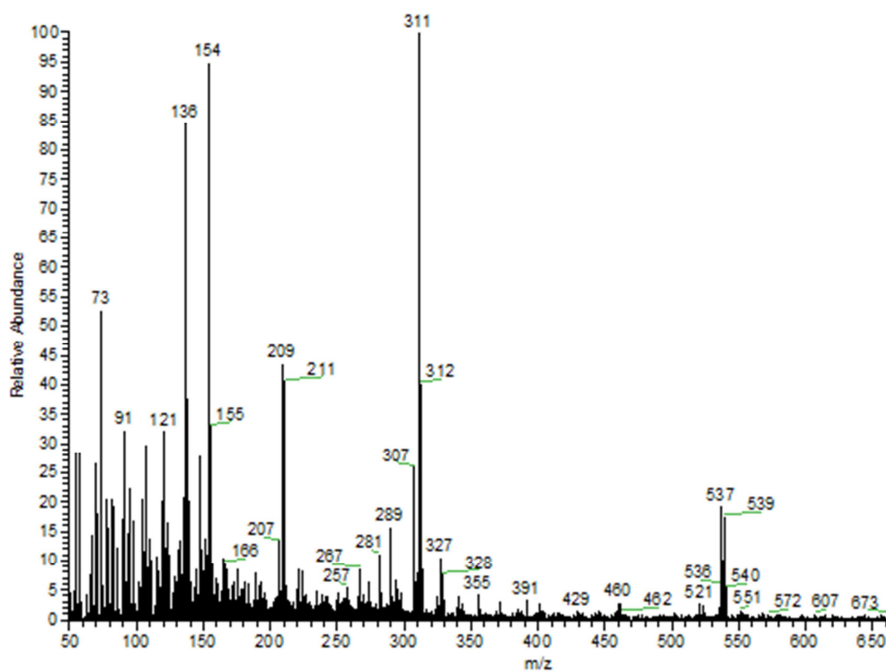




Anexo 6d.2. Espectro de IR de la 3 β -(*p*-bromo)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6d**)

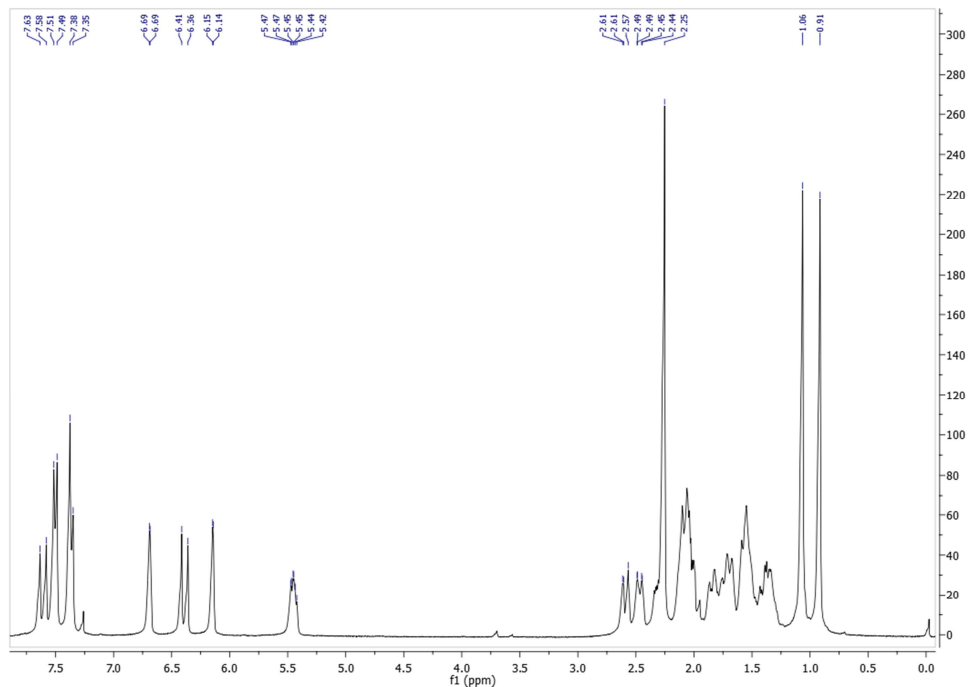


Anexo 6d.3. Espectro de EM-FAB de la 3 β -(*p*-bromo)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6d**)

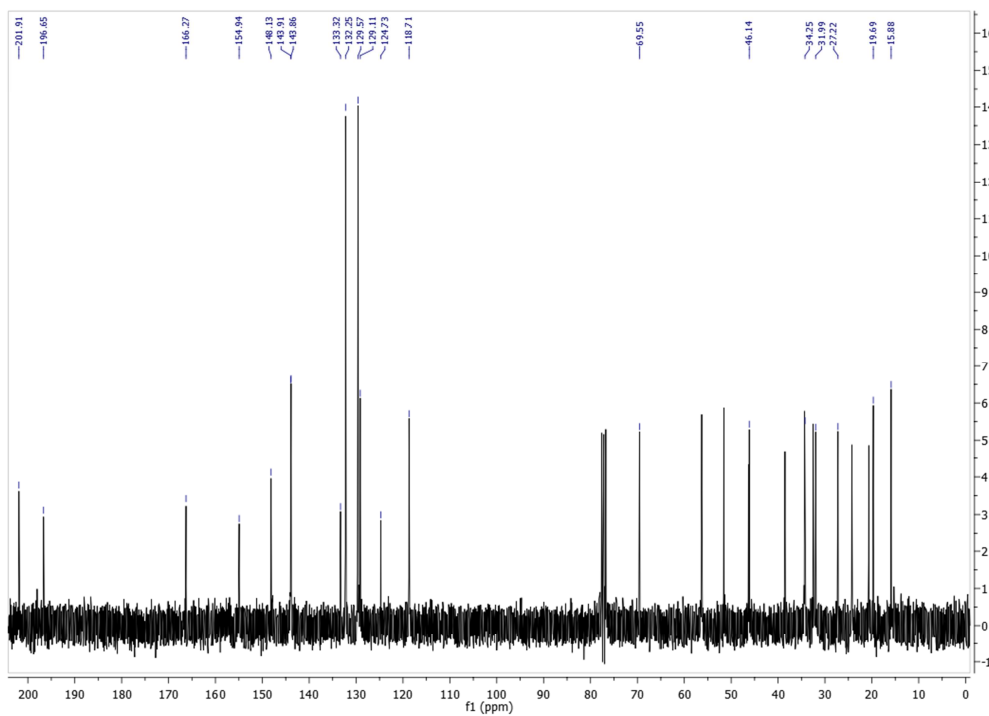




Anexo 6d.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -(*p*-bromo)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6d**)

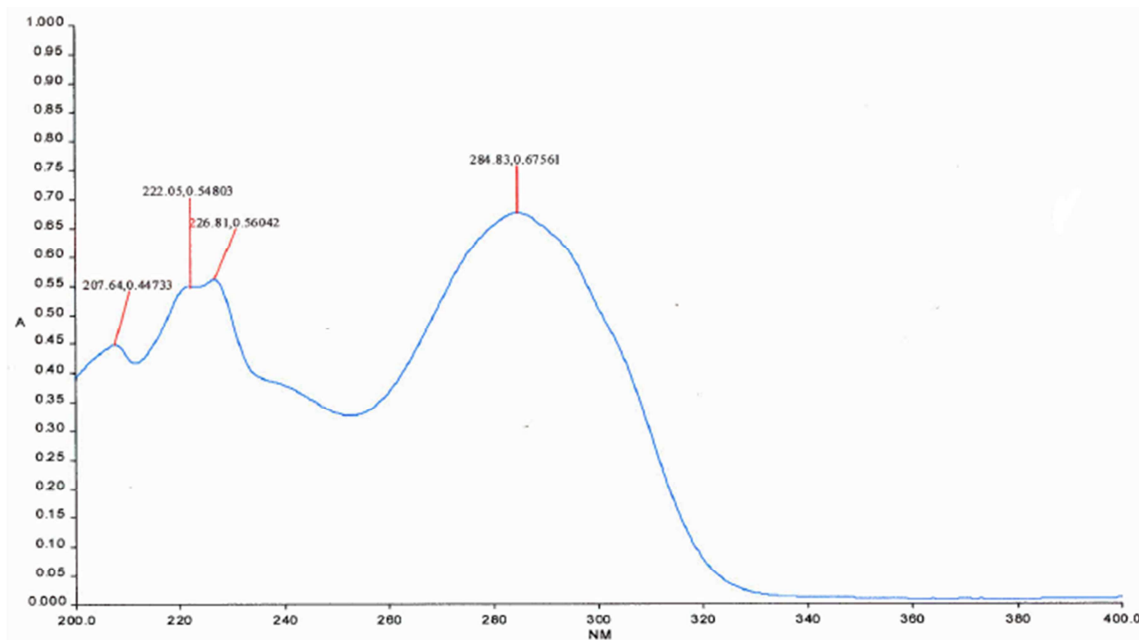


Anexo 6d.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -(*p*-bromo)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6d**)

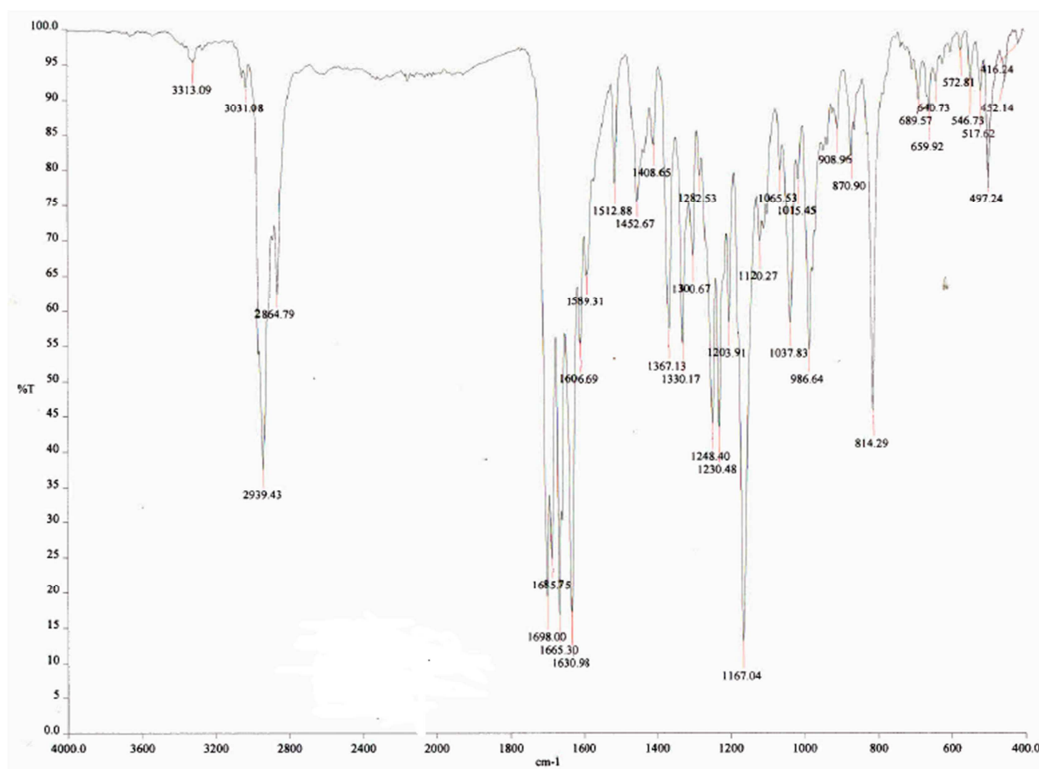




Anexo 6e.1. Espectro de UV-Vis de la 3 β -(*p*-metil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6e)

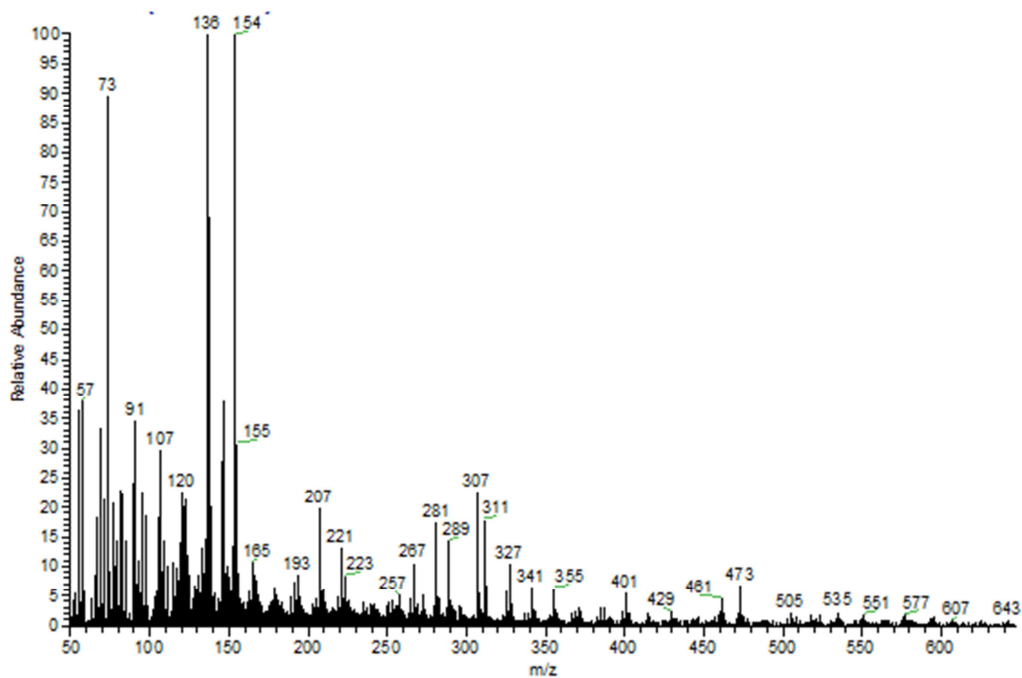


Anexo 6e.2. Espectro de IR de la 3 β -(*p*-metil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6e)

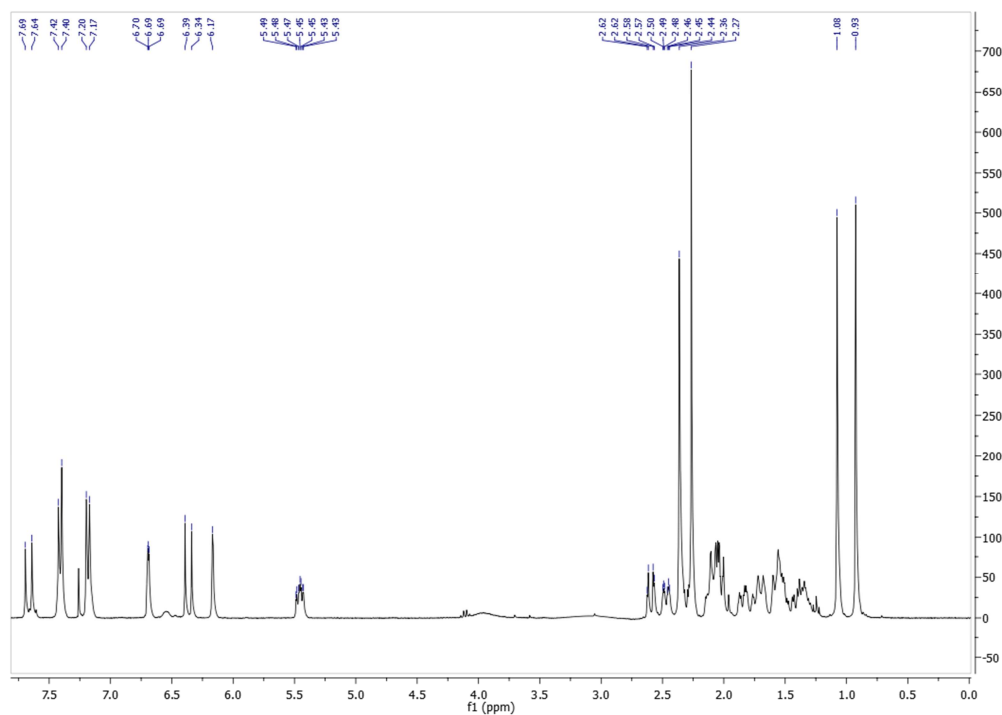




Anexo 6e.3. Espectro de EM-FAB de la 3 β -(*p*-metil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6e**)

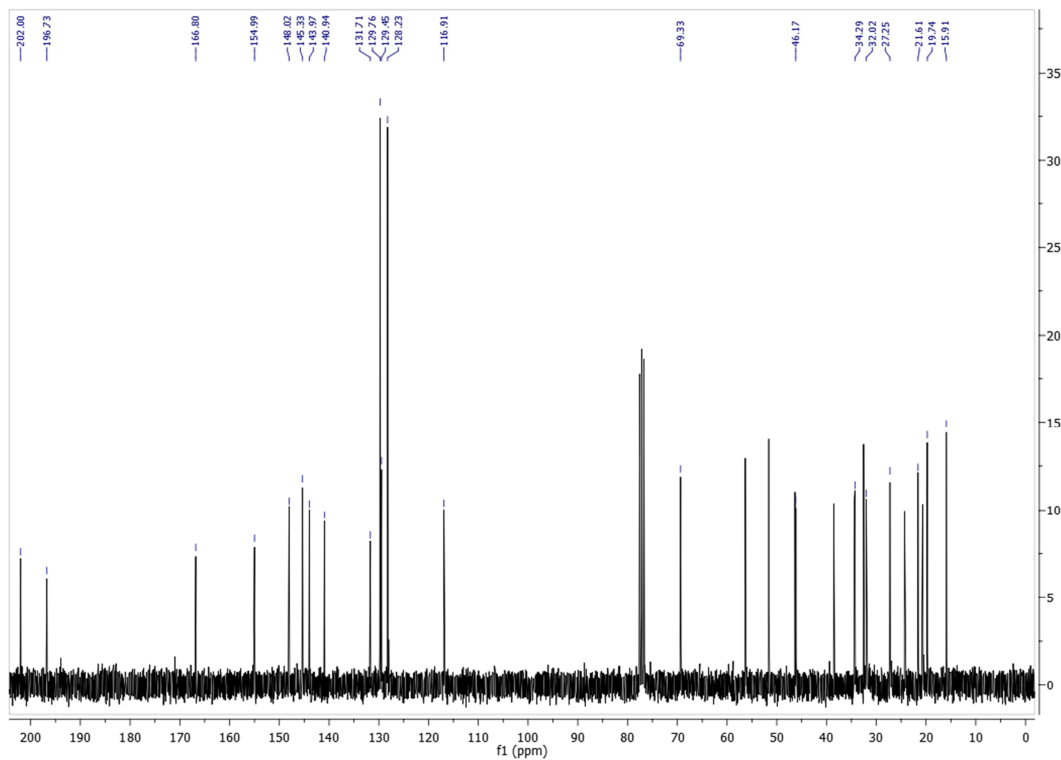


Anexo 6e.4. Espectro de RMN ^1H de la 3 β -(*p*-metil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6e**)

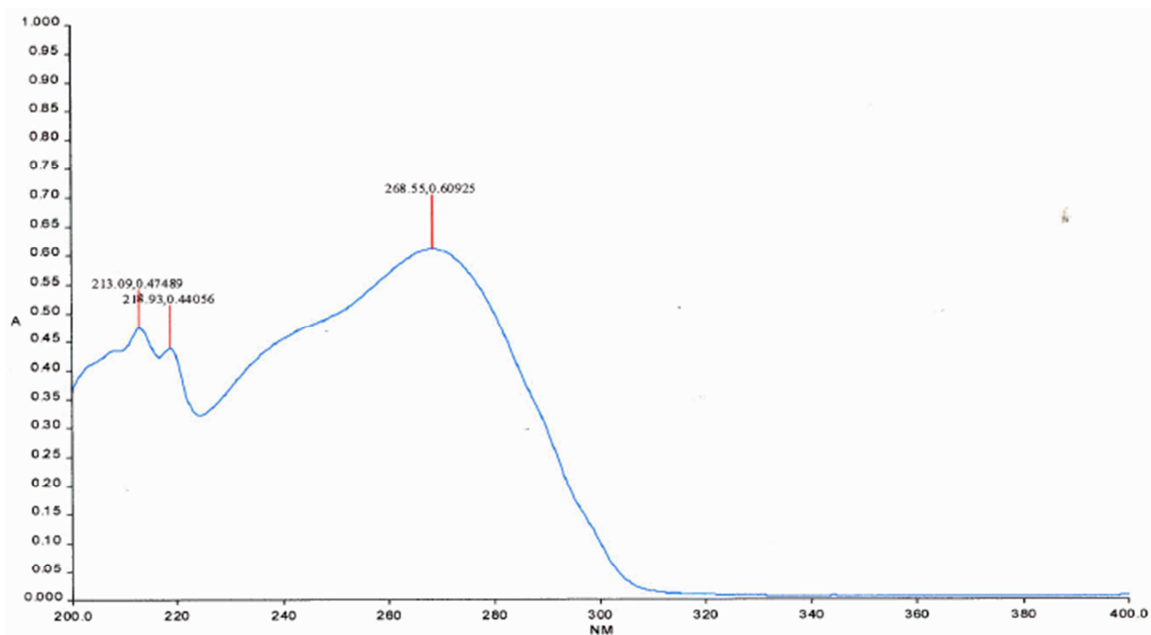




Anexo 6e.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -(*p*-metil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6e**)

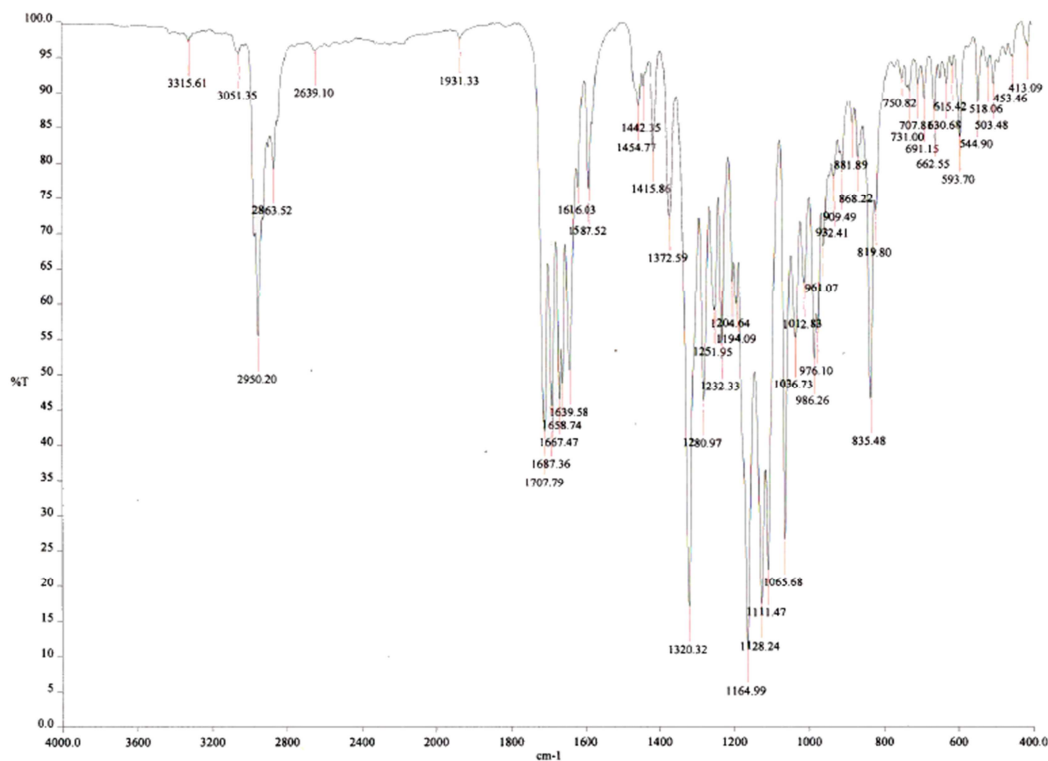


Anexo 6f.1. Espectro de UV-Vis de la 3β -(*p*-trifluorometil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6f**)

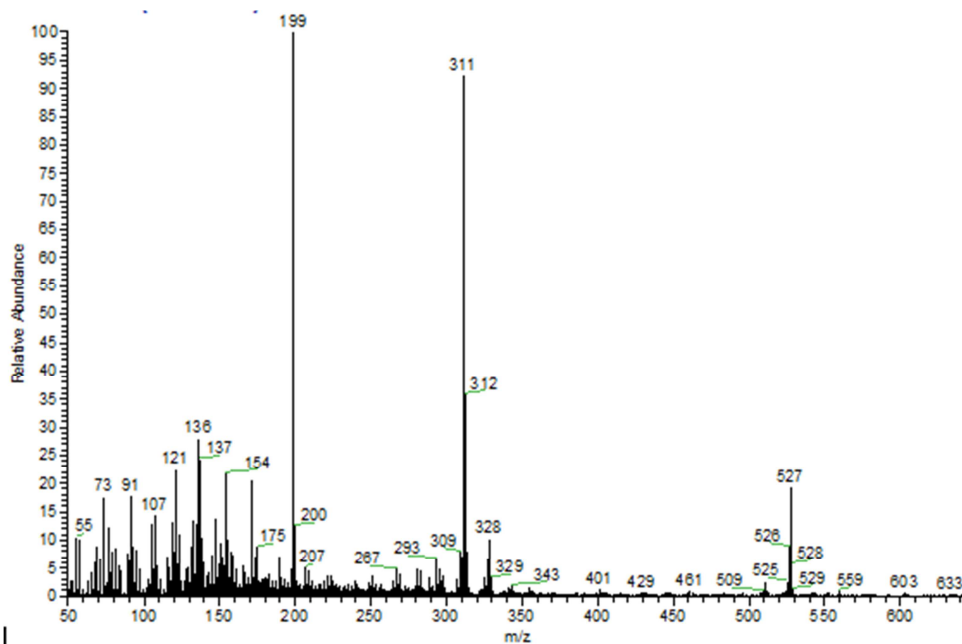




Anexo 6f.2. Espectro de IR de la 3 β -(*p*-trifluorometil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6f**)

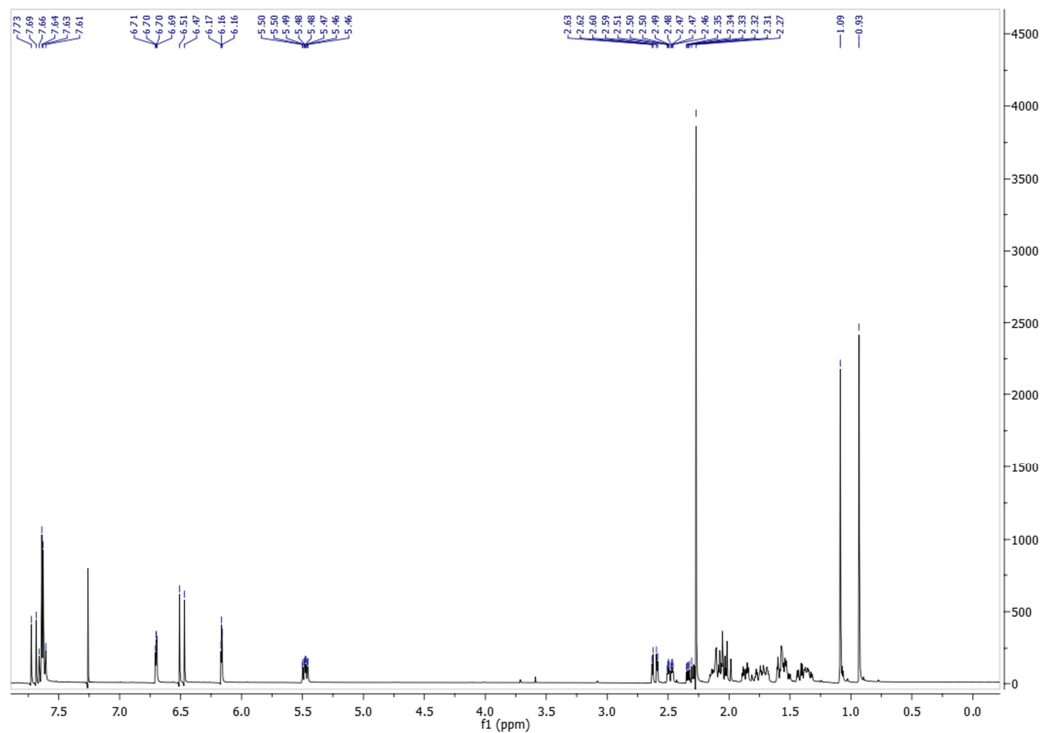


Anexo 6f.3. Espectro de EM-FAB de la 3 β -(*p*-trifluorometil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6f**)

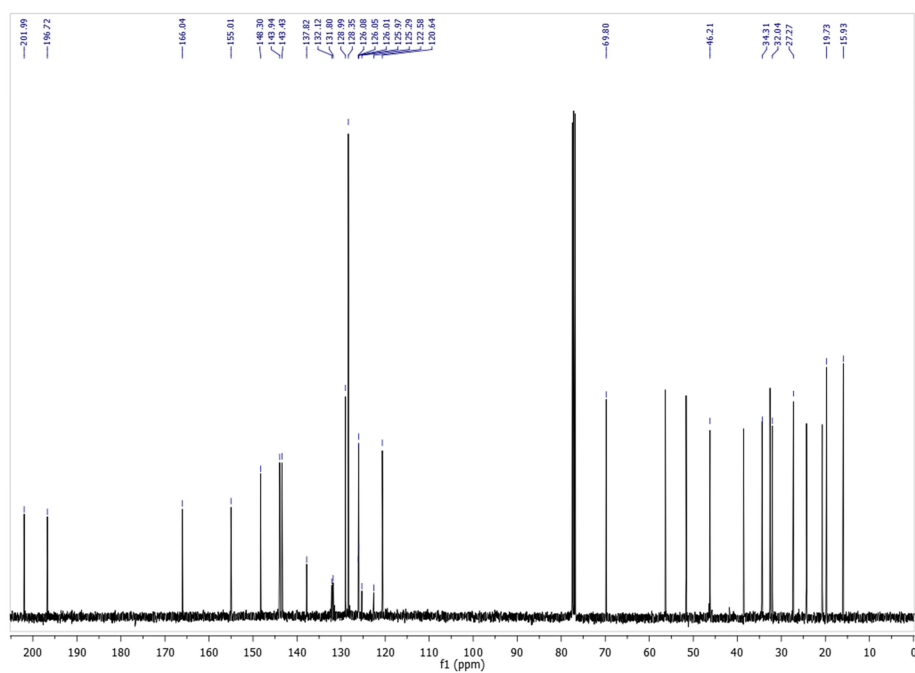




Anexo 6f.4. Espectro de RMN ^1H de la 3 β -(*p*-trifluorometil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6f**)

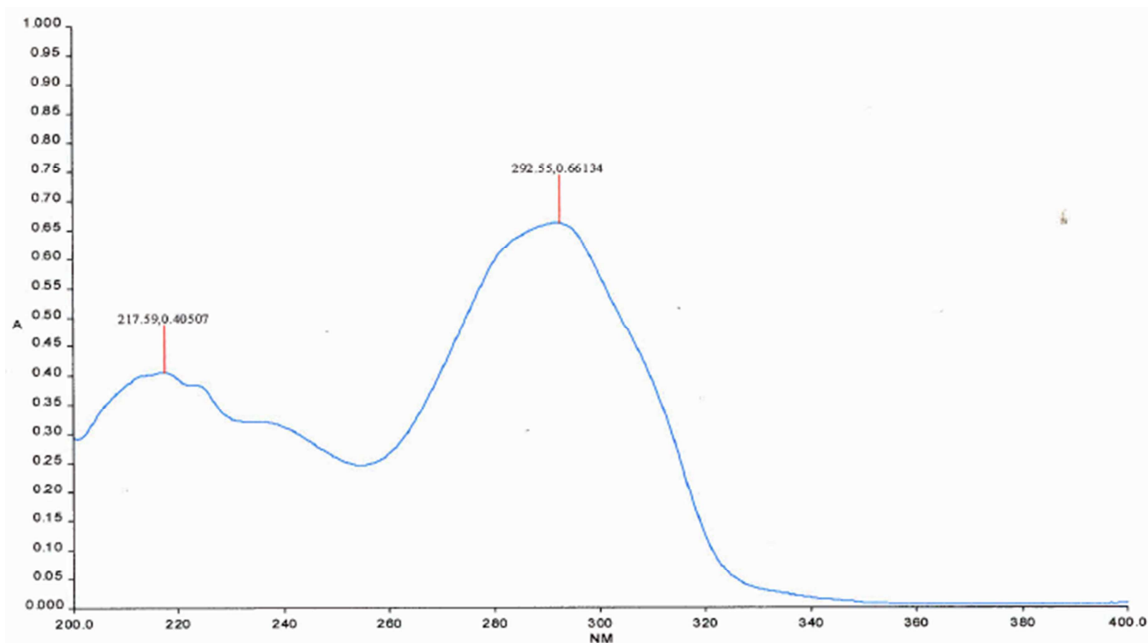


Anexo 6f.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3 β -(*p*-trifluorometil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6f**)

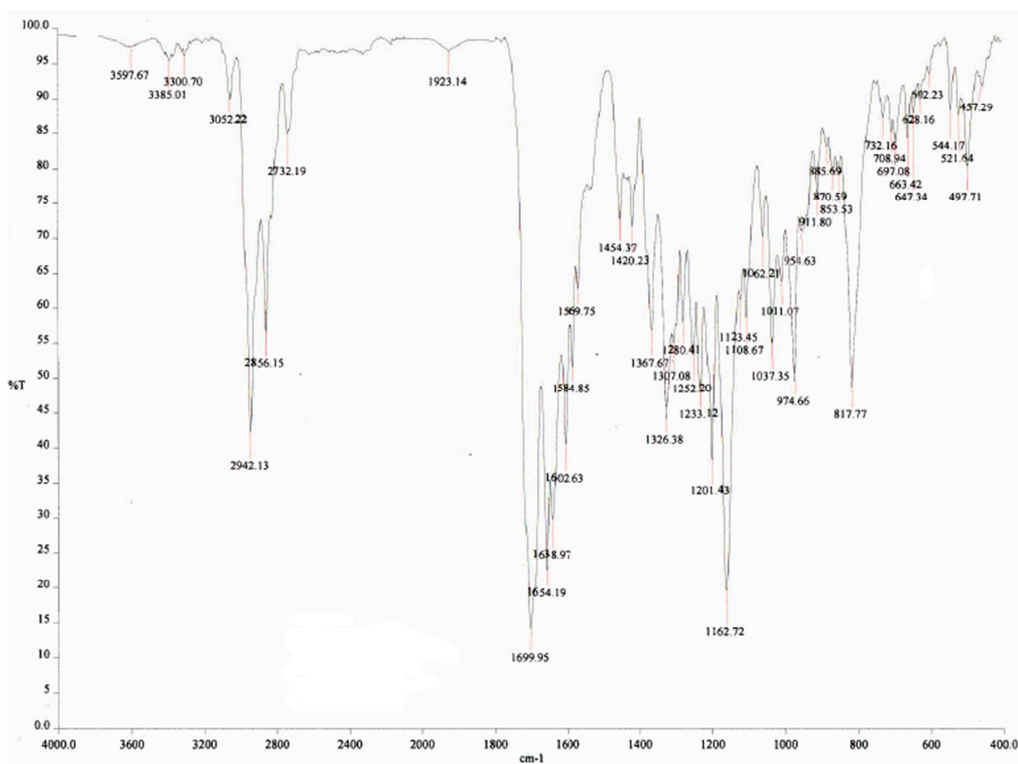




Anexo 6g.1. Espectro de UV-Vis de la 3 β -(*p*-formil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6g**)

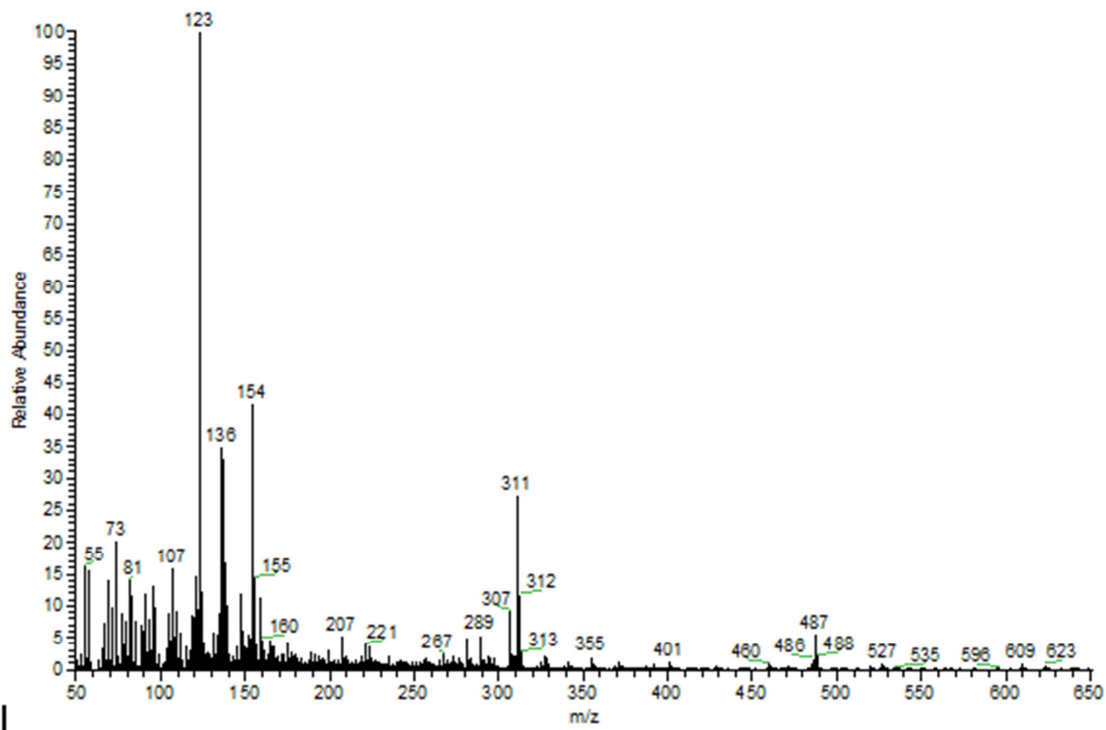


Anexo 6g.2. Espectro de IR de la 3 β -(*p*-formil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6g**)

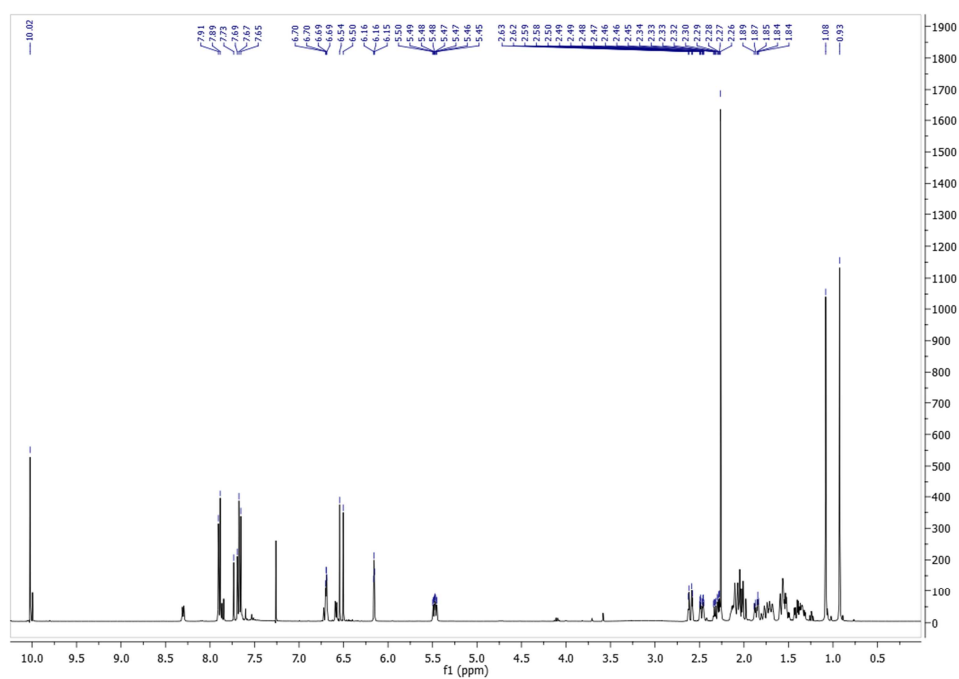




Anexo 6g.3. Espectro de EM-FAB de la 3β -(*p*-formil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6g**)

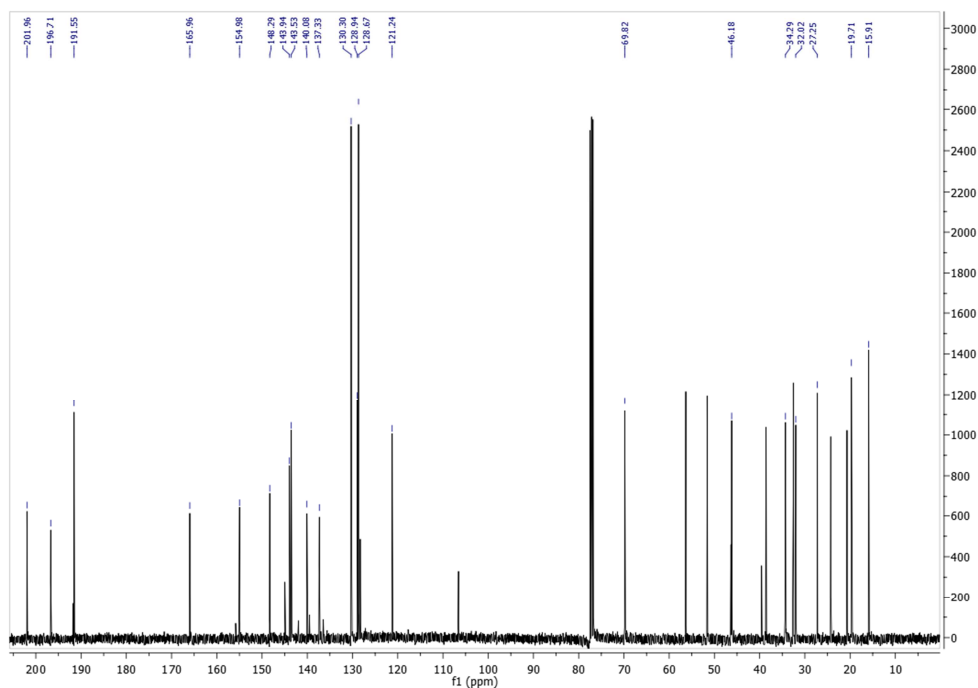


Anexo 6g.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -(*p*-formil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6g**)

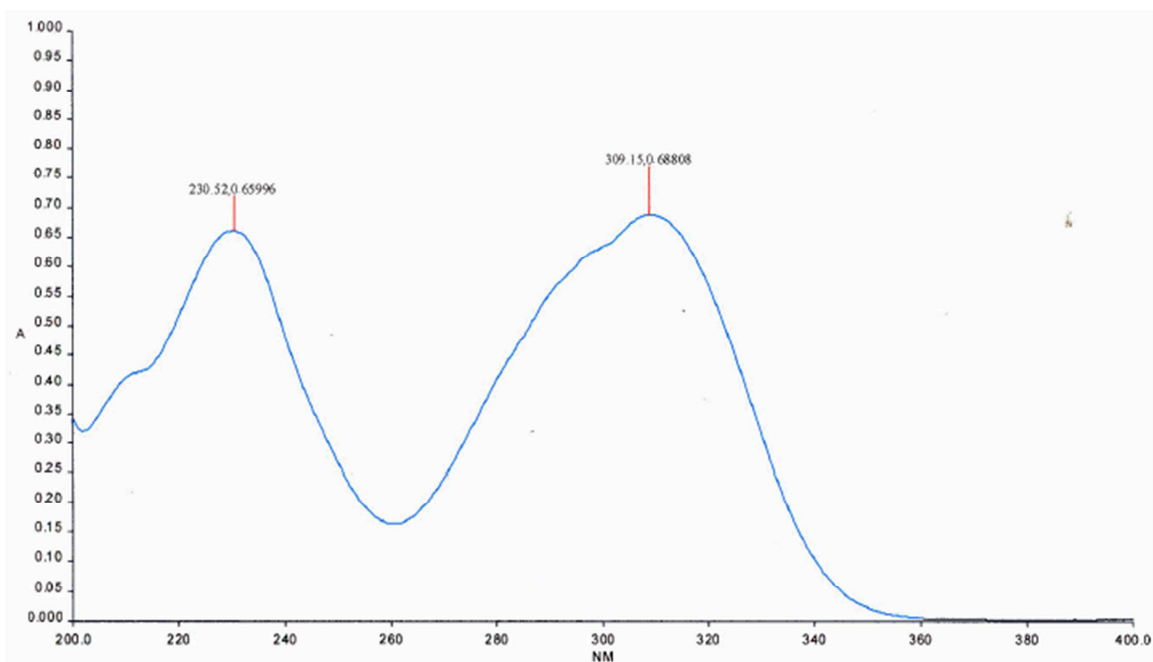




Anexo 6g.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -(*p*-formil)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6g**)

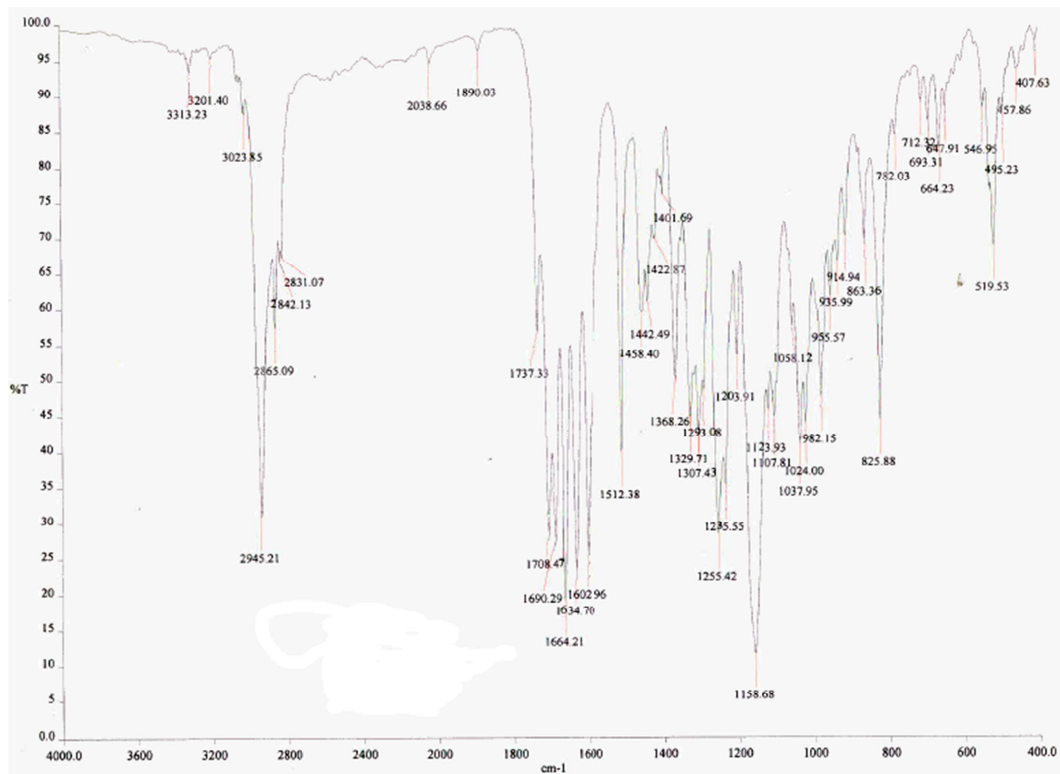


Anexo 6h.1. Espectro de UV-Vis de la 3β -(*p*-metoxi)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6h**)

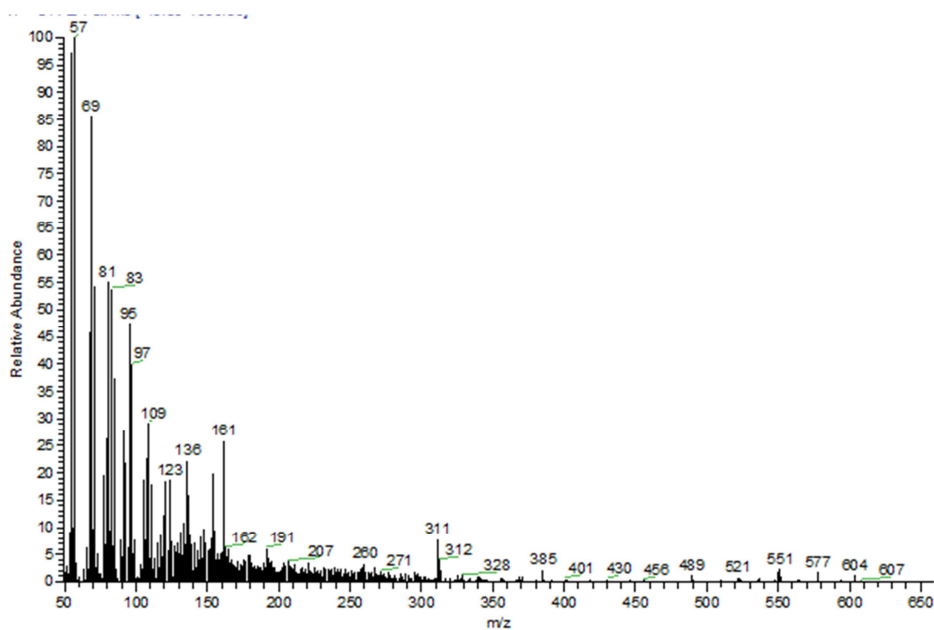




Anexo 6h.2. Espectro de IR de la 3β -(*p*-metoxi)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6h)

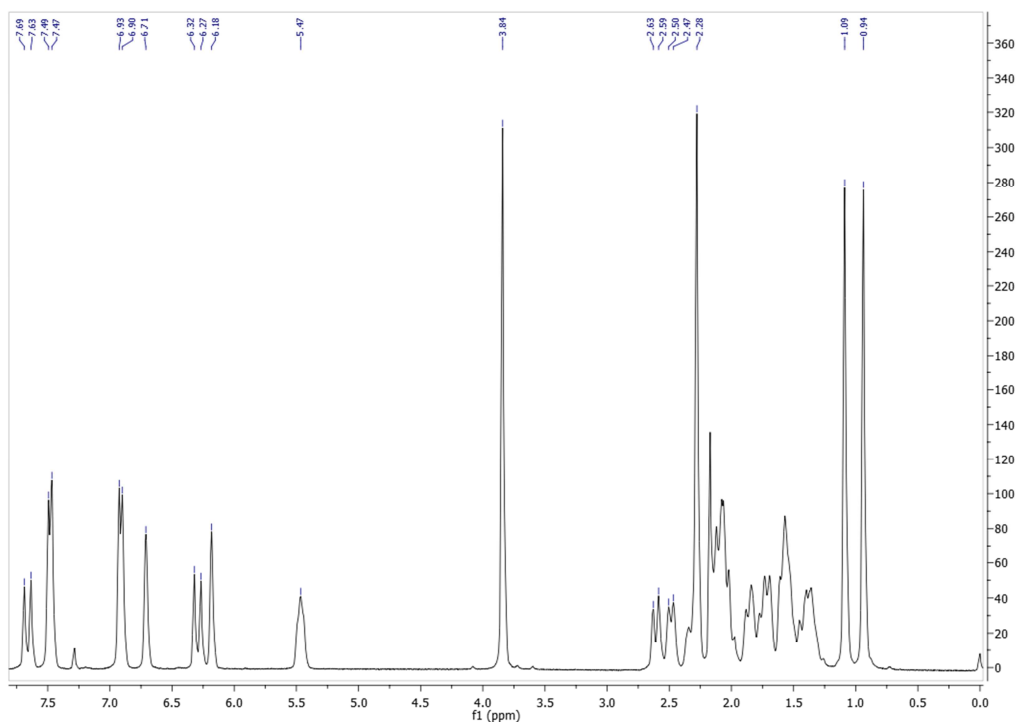


Anexo 6h.3. Espectro de EM-FAB de la 3β -(*p*-metoxi)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6h)





Anexo 6h.4. Espectro de RMN ^1H de la 3β -(*p*-metoxi)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6h**)



Anexo 6h.5. Espectro de RMN ^{13}C de la 3β -(*p*-metoxi)cinamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6h**)

