



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**SÍNTESIS DE NUEVOS D-HOMO DERIVADOS DE LA PREGNENOLONA Y SU EVALUACIÓN
COMO AGENTES ANTIPROLIFERATIVOS**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

**PRESENTA
Q. SEBASTIÁN FLOREZ RUEDA**

**TUTOR: EUGENE A. BRATOEFF T. †
Facultad de Química, UNAM**

MÉXICO D.F.

Junio 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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. Rafael Castillo Bocanegra	Facultad de Química, UNAM
VOCAL:	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet	Facultad de Química, UNAM
VOCAL:	Dr. Jesús Sandoval Ramírez	BUAP
VOCAL:	Dr. René Miranda Ruvalcaba	FES-C, UNAM
SECRETARIO:	Dr. Alejandro Cordero Vargas	Instituto de Química, UNAM

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO

- Laboratorio 125, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección del Dr. Eugene A. Bratoeff[†] y posterior supervisión del Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Supervisor: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sustentante: Q. Sebastián Florez Rueda

AGRADECIMIENTOS

De un modo muy sincero agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas, por permitirme estudiar en tan prestigiosa y hermosa universidad, que espero mejore cada día más y permita del mismo modo que muchos más alumnos puedan egresar de ella.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero brindado durante mis estudios de Posgrado en la UNAM (CVU/Becario: 555245/295823), además del apoyo económico al grupo de investigación a través del proyecto CONACyT código 165049.

Agradezco a la DGAPA PAPIT por el apoyo financiero brindado al grupo de investigación mediante el proyecto con código IN211312.

Agradezco de un modo especial al Dr. Eugene Athanas Bratoeff Titeff por su ejemplo de vida, por permitirme trabajar con él en su laboratorio, por la convivencia diaria que teníamos todos en el laboratorio, por todas sus enseñanzas tanto en el aula como en el laboratorio, por su confianza y consejos oportunos. Lamento mucho que no pueda ser él quien lea estas líneas.

Al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar por su amistad e igualmente por la amena convivencia en el laboratorio, además de todo su apoyo como supervisor del proyecto, por la ayuda brindada para la toma de espectros de masas y por tantos consejos.

Agradezco a todos los profesores y doctores que tuve el gusto de conocer en la UNAM, simplemente son demasiadas personas pero sé que no olvidaré a ninguna, tengo muchos buenos recuerdos de todas las cosas que aprendí, deseo sinceramente que todos puedan seguir construyendo cada día con más fuerza bases en torno a la educación para lograr una sociedad más verdadera y justa.

A la M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apan por su apoyo en la realización de las pruebas sobre líneas celulares, PC-3.

A todo el personal de la USAI, por la realización de los espectros de IR, UV, RMN ^1H y ^{13}C , y EM presentados en este trabajo de investigación.

Agradezco a todos los que han compartido su vida conmigo en todos estos años y que sé que están pendientes de que pueda acontecerme acá, no los nombraré porque sé que ellos saben quiénes son; por último, agradezco a mi Madre, a mi Padre y a mi Hermana, mi familia, espero poder abrazarlos muy pronto.

Tabla de contenido

Pág.

Índice de figuras.....	vii
Índice de esquemas	x
Índice de tablas	xi
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1. Aspectos generales de los esteroides	2
2.1.1. Nomenclatura de los esteroides y estereoquímica	2
2.1.1.1. Biosíntesis del colesterol	6
2.2. Andrógenos y su acción molecular	9
2.2.1. Biosíntesis de la testosterona.....	9
2.2.2. Metabolismo de la testosterona	12
2.2.3. La disposición de la testosterona en los tejidos y su función	14
2.3. El receptor androgénico.....	14
2.4. Regulación del crecimiento de la próstata por los andrógenos.....	15
2.5. La enzima 5α-reductasa.....	16
2.5.1. Las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5α-reductasa y su relación con desórdenes endócrinos.....	16
2.5.2. Mecanismo de la inhibición de la enzima 5α-reductasa, modificación covalente por la finasterida	17
2.6. Antiandrógenos.....	20
3. Hipótesis.....	23
4. Objetivos	23
4.1. Objetivo general	23
4.2. Objetivos específicos	23
5. Metodología.....	24
5.1. Parte experimental	25
5.1.1. Etapa 1. Síntesis de 16α,17α-epoxi-3β-hidroxi-pregna-5-en-20-ona (II)	25
5.1.2. Etapa 2. Síntesis del acetato de 16α,17α-epoxi-20-oxopregna-5-en-3β-ilo (III).....	26
5.1.3. Etapa 3. Síntesis del acetato de 16α,17α-epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3β-ilo (IV)	26
5.1.4. Etapa 4. Síntesis de 20,20-(etilendioxi)-16β-fenilpregna-5-en-3β,17α-diol (V).....	27
5.1.5. Etapa 5. Síntesis de 16β-fenil-17β-metil-17α-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VI).....	28
5.1.6. Etapa 6. Síntesis del acetato de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-17α-oxa-D-homopregna-5-en-3β-ilo (VII).....	29

5.1.7.	Etapa 7. Síntesis del acetato de 16-fenil-17-metil-17 α -oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (VIII)	29
5.1.8.	Etapa 8. Síntesis de 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17 α -ona (IX)	30
5.1.9.	Etapa 9. Síntesis de los derivados de 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17 α -ona (Xa, Xb)	31
6.	Discusión de resultados	33
6.1.	Epoxidación del acetato de 16,17-dedihidropregnenolona	33
6.2.	Acetilación de la función hidroxílica en C3	34
6.3.	Protección del grupo carbonilo en C20, formación del anillo de dioxolano	35
6.4.	Apertura del epóxido a través de una reacción de Grignard	36
6.5.	Expansión del anillo D, generación de D-homo derivados	38
6.6.	Acetilación del hidroxilo en C3	39
6.7.	Deshidratación del OH-C17 para generar el sistema carbonílico α,β -insaturado en el anillo D	40
6.8.	Hidrólisis del éster acético en C3	44
6.9.	Productos secundarios en la reacción de deshidratación del acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17 α -oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo (VII)	48
6.10.	Derivatización en el hidroxilo de la posición C3, generación de ésteres lineales	53
6.11.	Determinación de la actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de próstata PC3	54
6.12.	Ruta inicial propuesta	55
7.	Conclusiones	59
8.	Referencias	60
9.	Anexos	67

Índice de figuras

Figura 1. Estructura general de los esteroides: sistema del fenantreno.....	3
Figura 2. 5 α -colestano, nomenclatura del sistema esteroidal.	3
Figura 3. Representación conformacional del 5 α -colestano.....	4
Figura 4. Estructura del colesterol.....	5
Figura 5. Estructura del ácido cólico.....	5
Figura 6. Principales 5 α -androstanos, 5 α -estranos, y 5 α -pregnanos.....	6
Figura 7. N-(1,1-dimetiletil)-3-oxo-4-aza-5a-androst-1-en-17 β -carboxamida.	17
Figura 8. Intermediario propuesto como inhibidor de la enzima 5 α -reductasa por parte de la finasterida.	19
Figura 9. Principales antiandrógenos esteroidales utilizados en el tratamiento de enfermedades andrógeno dependientes.....	21
Figura 10. Principales antiandrógenos no esteroidales utilizados en el tratamiento de enfermedades andrógeno dependientes.....	22
Figura 11. Espectro RMN ^1H del acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (VIII).....	41
Figura 12. Espectro RMN ^{13}C del acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo(VIII).	42
Figura 13. Espectro de UV del acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo(VII).	43
Figura 14. Espectro UV de acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (VIII).	43
Figura 15. Espectro RMN ^1H de la 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).	45
Figura 16. Espectro RMN ^{13}C de la 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).....	45
Figura 17. Espectro COSY de 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).....	46
Figura 18. Espectro HSQC de 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).....	47
Figura 19. Espectro NOESY de 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).	47
Figura 20. Espectro de RMN ^1H del derivado clorosulfínico del 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).....	49
Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C del derivado clorosulfínico del 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).....	50
Figura 22. Espectro de COSY del derivado clorosulfínico 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).....	50
Figura 23. Espectro de HSQC del derivado clorosulfínico 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).....	51
Figura 24. Espectro de NOESY del derivado clorosulfínico 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).....	51
Figura 25. Espectro de IR del derivado clorosulfínico del 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).....	52
Figura 26. Espectro de masas de derivado clorosulfínico 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).....	52
Figura 27. Seguimiento de una purificación por columna de la 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX) donde se evidencia la presencia del derivado clorosulfínico 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).	53
Figura 28. Espectro RMN ^1H de la del acetato de 16-fenil-17-metil-6,17a-dioxopregna-4,16-dien-3 β -ilo (VIIc).	57
Figura 29. Espectro RMN ^{13}C del acetato de 16-fenil-17-metil-6,17a-dioxopregna-4,16-dien-3 β -ilo (VIIc).	58

Figura 30. Espectro HSQC 16-fenil-17-metil-6,17a-dioxopregna-4,16-dien-3β-ilo (VIIc).....	58
Figura A1. Espectro RMN ¹ H del acetato de 16,17-dedihidropregnenlonona (I).....	67
Figura A2. Espectro RMN ¹³ C del acetato de 16,17-dedihidropregnenlonona (I).....	67
Figura A3. Espectro IR de acetato de 16,17-dedihidropregnenlonona (I).....	68
Figura A4. Espectro de masas del acetato de 16,17-dedihidropregnenlonona (I).....	68
Figura A5. Espectro RMN ¹ H de 16α,17α-epoxi-3β-hidroxi-pregna-5-en-20-ona (II).....	69
Figura A6. Espectro RMN ¹³ C de 16α,17α-epoxi-3β-hidroxi-pregna-5-en-20-ona (II).....	69
Figura A7. Espectro IR de 16α,17α-epoxi-3β-hidroxi-pregna-5-en-20-ona (II).....	70
Figura A8. Espectro de masas de 16α,17α-epoxi-3β-hidroxi-pregna-5-en-20-ona (II).....	70
Figura A9. Espectro RMN ¹ H del acetato de 16α,17α-epoxi-20-oxopregna-5-en-3β-ilo(III).....	71
Figura A10. Espectro RMN ¹³ C de acetato de 16α,17α-epoxi-20-oxopregna-5-en-3β-ilo (III).....	71
Figura A11. Espectro IR del acetato de 16α,17α-epoxi-20-oxopregna-5-en-3β-ilo (III).....	72
Figura A12. Espectro de masas del acetato de 16α,17α-epoxi-20-oxopregna-5-en-3β-ilo(III).....	72
Figura A13. Espectro RMN ¹ H del acetato de 16α,17α-epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3β-ilo (IV).....	73
Figura A14. Espectro RMN ¹³ C del acetato de 16α,17α-epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3β-ilo (IV).....	73
Figura A15. Espectro IR de acetato de 16α,17α-epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3β-ilo (IV).....	74
Figura A16. Espectro de masas del acetato de 16α,17α-epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3β-ilo (IV).....	74
Figura A17. Espectro RMN ¹ H de 20,20-(etilendioxi)-16β-fenilpregna-5-en-3β,17α-diol (V).....	75
Figura A18. Espectro RMN ¹³ C de 20,20-(etilendioxi)-16β-fenilpregna-5-en-3β,17α-diol (V).....	75
Figura A19. Espectro IR de 20,20-(etilendioxi)-16β-fenilpregna-5-en-3β,17α-diol(V).....	76
Figura A20. Espectro de masas de 20,20-(etilendioxi)-16β-fenilpregna-5-en-3β,17α-diol (V).....	76
Figura A21. Espectro RMN ¹ H de 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VI).....	77
Figura A22. Espectro RMN ¹³ C de 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VI).....	77
Figura A22. Espectro IR de 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VI).....	78
Figura A23. Espectro de masas de 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VI).....	78
Figura A24. Espectro RMN ¹ H del acetato de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3β-ilo (VII).....	79
Figura A25. Espectro RMN ¹³ C de acetato de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3β-ilo (VII).....	79
Figura A26. Espectro IR de acetato de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3β-ilo (VII).....	80
Figura A27. Espectro de masas de acetato de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3β-ilo (VII).....	80
Figura A28. Espectro IR del acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (VIII).....	81
Figura A29. Espectro de masas del acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (VIII).....	81
Figura A30. Espectro de masas de la 16-fenil-3β-hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).....	82
Figura A31. Espectro de IR de la 16-fenil-3β-hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).....	82
Figura A32. Espectro RMN ¹ H del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (Xa).....	83
Figura A33. Espectro RMN ¹³ C del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (Xa).....	83
Figura A34. Espectro COSY del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (Xa).....	84
Figura A35. Espectro HSQC del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (Xa).....	84
Figura A36. Espectro NOESY del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (Xa).....	85

Figura A37. Espectro IR del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xa).....	85
Figura A38. Espectro de masas del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xa).....	86
Figura A39. Espectro RMN ^1H del butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xb)....	86
Figura A40. Espectro RMN ^{13}C del butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xb)...	87
Figura A41. Espectro COSY del del butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xb).....	87
Figura A42. Espectro HSQC del butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xb).....	88
Figura A43. Espectro NOESY del butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xb).....	88
Figura A44. Espectro IR del butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xb).....	89
Figura A45. Espectro de masas del Butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xb).	89

Índice de esquemas

Esquema 1. Biosíntesis del colesterol: unidades de isopreno.....	7
Esquema 2. Biosíntesis del colesterol: pirofosfato de geranilo.....	7
Esquema 3. Biosíntesis del colesterol: escualeno.	8
Esquema 4. Biosíntesis del colesterol: lanosterol	8
Esquema 5. Biosíntesis del colesterol.....	9
Esquema 6. Biosíntesis de la testosterona.	10
Esquema 7. Metabolismo de la testosterona (G, Glucuronido; HSD, Hidroxi esteroide dehidrogenasa; UGT, UDP-glucuronosiltransferasa).....	13
Esquema 8. Posible mecanismo de inhibición de la enzima 5 α -reductasa por parte de la finasterida.	19
Esquema 9. Ruta sintética para la obtención de los derivados del sistema 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona.	24
Esquema 10. Mecanismo de reacción, epoxidación del acetato de 16,17-dedihidropregnelonona (I).....	33
Esquema 11. Mecanismo de reacción, acetilación de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregna-5-en-20-ona (II).	35
Esquema 12. Mecanismo de reacción, protección del carbonilo en C20 en (III).	36
Esquema 13. Mecanismo de reacción, apertura del epóxido a través de la adición nucleofílica del bromuro de fenil cobre en el acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3 β -ilo (IV).	37
Esquema 14. Mecanismo de reacción, expansión del anillo D en el 20,20-(etilendioxi)-16 β -fenilpregna-5-en-3 β ,17 α -diol (V), generación del esqueleto molecular de los D-homo derivados.....	38
Esquema 15. Mecanismo de reacción de la deshidratación del acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo (VII).	40
Esquema 16. Mecanismo de reacción, hidrólisis de éster en C3 del acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (VIII).	44
Esquema 17. Deshidratación del acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo (VII) e hidrólisis del VIIIa para la obtención del derivado clorosulfínico del 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).	48
Esquema 18. Mecanismo de reacción, formación del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xa).	54
Esquema 19. Ruta inicial, para la obtención del acetato de 16-fenil-17-metil-6,17a-dioxopregna-4,16-dien-3 β -ilo (VIIc).....	56

Índice de tablas

Tabla 1. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas, (Concentración: 50 μ M y 25 μ M*).....55

1. Introducción

En la actualidad, el cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer con la mayor tasa de mortalidad después del cáncer de pulmón, y el segundo más frecuente en la población masculina a nivel mundial.^{1,2} La mayoría de las mutaciones del ácido desoxirribonucleico (ADN) relacionadas con el cáncer de próstata no parecen ser heredadas, sino que se forman durante el transcurso de la vida de un hombre. No está claro con qué frecuencia estos cambios del ADN se deben a eventos aleatorios, ni con qué frecuencia son influenciados por otros factores como la alimentación, niveles hormonales, etc. El desarrollo del cáncer de próstata puede estar asociado a un aumento en los niveles de ciertas hormonas. Los niveles altos de andrógenos (hormonas masculinas, como la testosterona) promueven el crecimiento de las células de la próstata, y pueden contribuir al riesgo de cáncer de próstata en algunos hombres. Igualmente, se ha observado que los hombres que presentan altos niveles del factor de crecimiento análogo a la insulina (IGF-1) tienen más probabilidades de padecer cáncer de próstata.³

Aunque pueden existir diversas causas para el desarrollo del cáncer de próstata, es claro que existe una relación entre los altos niveles de andrógenos en el organismo y la formación del tejido canceroso. En este sentido, el cáncer de próstata es considerado como una enfermedad andrógeno-dependiente, al igual otros padecimientos que afectan a la población masculina de edad avanzada, como la hiperplasia prostática benigna (HPB), cuya patología se manifiesta como un incremento anormal de la glándula prostática y la formación de nodos voluminosos bien delimitados.

El tratamiento más empleado para el cáncer de próstata es la cirugía; sin embargo, gran parte de la población masculina es renuente a este procedimiento debido a los efectos secundarios indeseables que genera. Actualmente existen otras alternativas para el tratamiento de esta enfermedad, como es el uso de agonistas de la hormona luteinizante (LH), la inhibición de la producción de andrógenos por agonistas del factor liberador de gonadotropinas hipotalámico (LHRH), la inhibición de la acción de andrógenos producida por antagonistas del receptor de andrógenos (AR) y la inhibición de la conversión de testosterona (T) a 5 α -dihidrotestosterona (DHT) por inhibidores de la 5 α -reductasa (5 α R).⁴

Los antagonistas androgénicos son un tratamiento potencialmente eficaz para distintas enfermedades andrógeno-dependientes, tales como el cáncer de próstata, la hiperplasia prostática benigna, el síndrome de ovarios poliquísticos, el hirsutismo en mujeres, el acné, la seborrea, la alopecia androgénica, entre otras.^{5,6}

Desafortunadamente, los antiandrógenos que se encuentran en el mercado, como el acetato de ciproterona (CPA), la finasterida, la flutamida y el ketoconazol, muestran severos efectos secundarios como son diarrea, vómito, disminución de la libido, daño hepático, etc, lo que limita su uso terapéutico.⁷

Entre los andrógenos endógenos más potentes involucrados directamente con el desarrollo de enfermedades andrógeno-dependientes se encuentra la DHT, producida a partir de la testosterona mediante un proceso reductivo catalizado por la enzima 5 α R. Así, uno de los blancos terapéuticos para el tratamiento de este tipo de enfermedades es la inhibición de la acción de esta enzima sobre la testosterona, disminuyendo drásticamente la concentración de la DHT en el organismo. Aunque algunos compuestos no-esteroidales actúan como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa, la mayoría de los antiandrógenos de interés terapéutico pertenecen a la serie esteroidal, específicamente a los derivados de la progesterona.^{8,9}

El grupo del Dr. Bratoeff y colaboradores han realizado numerosos estudios de relación estructura-actividad sobre diversos derivados de la progesterona y su actividad contra la enzima 5 α R. Así, entre los requerimientos estructurales encontrados para que una molécula presente buena actividad antiandrogénica, destaca la presencia de sistemas carbonílicos α,β -insaturados en distintas posiciones del sistema esteroidal, que permitan una adición 1,4 tipo Michael en el esteroide por parte de los fragmentos nucleofílicos presentes en el sitio activo de la enzima, generando un aducto irreversible con la consecuente inhibición de la enzima 5 α R.^{10,11}

En este contexto, el presente trabajo de investigación está enfocado en el desarrollo de una metodología experimental para la obtención de nuevos D-homo derivados de la pregnenolona, cuyo requisito estructural es la presencia de un sistema carbonílico α,β -insaturado, y con la finalidad de determinar su actividad antiproliferativa en la línea celular de cáncer de próstata PC-3.

2. Antecedentes

2.1. Aspectos generales de los esteroides

2.1.1. Nomenclatura de los esteroides y estereoquímica

El colesterol, los adrenocorticoides y las hormonas esteroidales se clasifican como esteroides y las reglas que definen su estructura, su estereoquímica y nomenclatura son en su mayoría, las mismas. Los anillos que conforman la estructura molecular de estos compuestos tienen una relación estereoquímica-actividad biológica

definida, de modo tal que pequeñas modificaciones estructurales, como transformaciones o adiciones de nuevos grupos funcionales, inducen cambios importantes en su actividad. Por el contrario, cambios drásticos en su estructura, como la modificación de la geometría en las uniones de los anillos del núcleo esteroidal, generalmente resulta en compuestos biológicamente inactivos.¹²

Los adrenocorticoides y las hormonas sexuales, en las que se incluyen los estrógenos, andrógenos y progestágenos, son biosintetizados a partir del colesterol.¹⁷ La estructura básica esteroidal consiste de cuatro anillos fusionados (A, B, C y D), formando el núcleo conocido como ciclopentanoperhidrofenantreno, en que el sistema de perhidrofenantreno (anillos A, B, C) es el derivado completamente saturado del fenantreno (Figura 1).

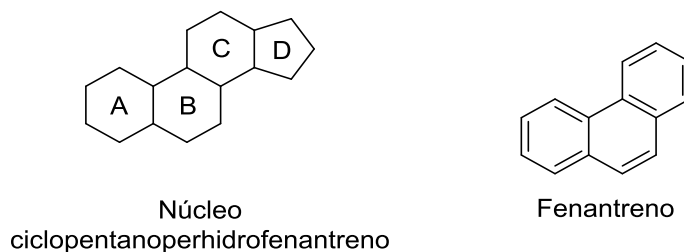


Figura 1. Estructura general de los esteroides: sistema del fenantreno.

Para ilustrar la nomenclatura en los esteroides generalmente se utiliza el 5 α -colestano como ejemplo (Figura 2). La notación 5 α se emplea para indicar que el átomo de hidrógeno en la posición 5 se encuentra en el lado opuesto de los grupos metilo en las posiciones 18 y 19, mismos que son asignados como β en la molécula. El término colestano, se refiere a un esteroide con 27 carbonos que incluyen una cadena lateral de 8 carbonos en la posición 17, en el lado β de la molécula. Así, los grupos funcionales en el lado β de la molécula se denotan con líneas sólidas, y los grupos en el lado α de la molécula se denotan con líneas discontinuas.^{22,12,17}

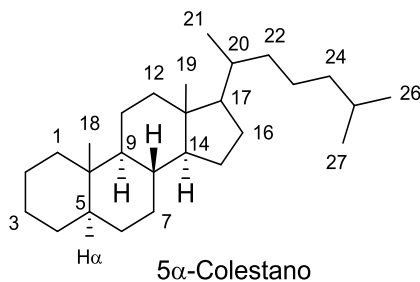


Figura 2. 5 α -colestano, nomenclatura del sistema esteroidal.

La representación tridimensional para el 5 α -colestano se ilustra en la figura 3. Aunque el ciclohexano puede llevar a cabo una inversión de la conformación, los esteroides son estructuras rígidas debido a que, generalmente, tienen al menos un sistema de anillos fusionados en forma *trans*.

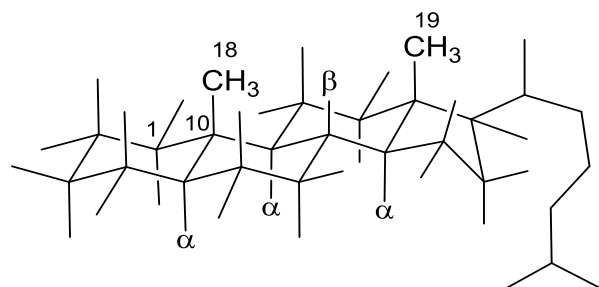


Figura 3. Representación conformacional del 5 α -colestano.

Considerando que los grupos metilo en las posiciones 18 y 19 se encuentran en posición β y tienen una orientación axial, la conformación de los demás enlaces del sistema esteroide puede ser fácilmente asignada. Así en el 5 α -colestano, el grupo Me-18 en la posición 10 siempre es β y axial, por lo que los dos enlaces en la posición 1 deben ser β -ecuatorial y α -axial como se indica en la figura 3. La orientación de los enlaces restantes puede ser determinada con base en los grupos posicionados en carbonos vecinos al anillo, identificados como *trans* si su relación es 1,2-diaxial o 1,2-diecuatorial, ó *cis* si su relación es 1,2-ecuatorial-axial.

La relación *cis* o *trans* de los cuatro anillos puede ser expresada en términos del eje principal de la molécula, por ejemplo, el compuesto 5 α -colestano se presenta un eje tipo *trans*-anti-*trans*-anti-*trans*, esto significa que todos los anillos están fusionados *trans* (di-ecuatorial). El enlace ecuatorial al anillo B, en la posición 9, que forma parte del anillo C, es anti (*trans*) al enlace ecuatorial al anillo B, en la posición 10, que forma parte del anillo A del esteroide.

Muchos esteroides presentan enlaces dobles en los anillos que forman el núcleo básico de su estructura, y éstos generalmente se encuentran entre las posiciones 4-5 o 5-6, y por ende no existe una relación *cis* o *trans* entre los anillos A y B. El signo Δ se utiliza frecuentemente para designar un enlace doble en el sistema esteroide. Si dicho enlace doble se presenta entre las posiciones 4 y 5, entonces el compuesto se designa como un Δ^4 -esteroide; si se presenta entre 5 y 10 se designa como un $\Delta^{5(10)}$ -esteroide. Así, el colesterol es un Δ^5 -esterol, con un alcohol insaturado en la posición 3 (coles-5-en-3 β -ol) (Figura 4).

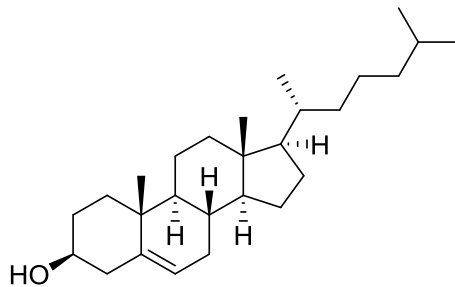


Figura 4. Estructura del colesterol.

Los ácidos biliares, por su parte, no presentan enlaces dobles y pertenecen a la serie 5β . Un ejemplo es el ácido cólico (ácido $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroxi- 5β -colan-24-oico) (Figura 5), un importante metabolito del colesterol presente en distintos animales. Este ácido tiene la base molecular característica del 5β -colestano, al igual que muchos glicósidos cardiotónicos que también pertenecen a esta serie.

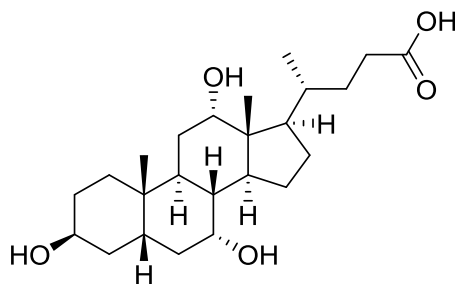


Figura 5. Estructura del ácido cólico.

Entre los principales triterpenos esteroidales que presentan la configuración del 5α -colestano se encuentran los 5α -androstanos, 5α -estranos y 5α -pregnanos, mismos que cuentan con 19, 18 y 21 átomos de carbono, respectivamente (Figura 6). Los esteroides de mayor relevancia terapéutica son: los adrenocorticoides, tipo cortisona ($17,21$ -dihidroxipregn-4-en-3,11,20-triona) y la progesterona (pregn-4-en-3,20-diona). Por otra parte los androstanos más importantes son las hormonas sexuales masculinas (andrógenos) y se basan en la estructura del 5α -androstano, como la testosterona (17β -hidroxi-4-androsten-3-ona). Finalmente los estranos u hormonas sexuales femeninas, son sintetizadas en el folículo de Graaf. Su representante más importante es el 17β -estradiol (estra-1,3,5,(10)-trien-3,17 β -diol).³³

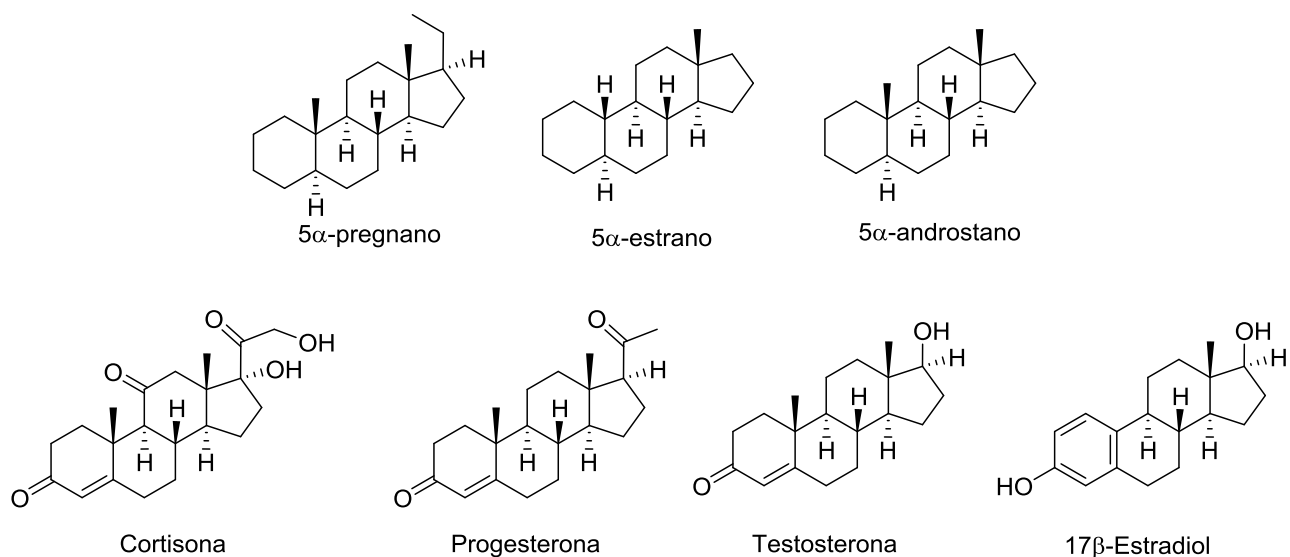


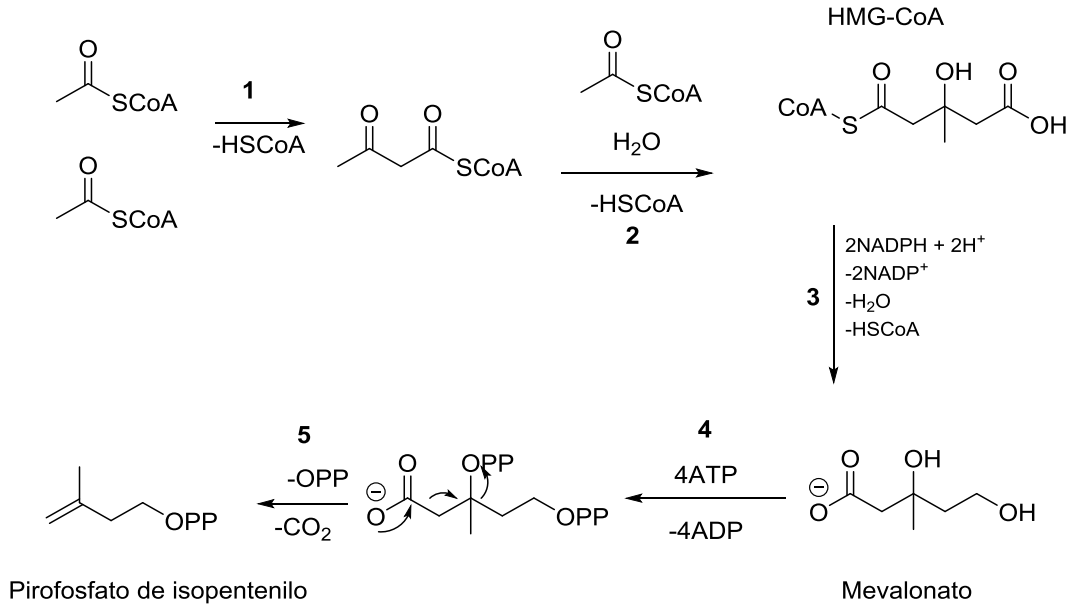
Figura 6. Principales 5α-androstanos, 5α-estrano, y 5α-pregnanos.

2.1.1.1. Biosíntesis del colesterol

Debido a la importancia fisiológica que representa el colesterol, precursor de muchos esteroides que regulan distintos procesos biológicos de alta relevancia, a continuación se describe brevemente la biosíntesis de esta importante molécula.^{12,13,17,47}

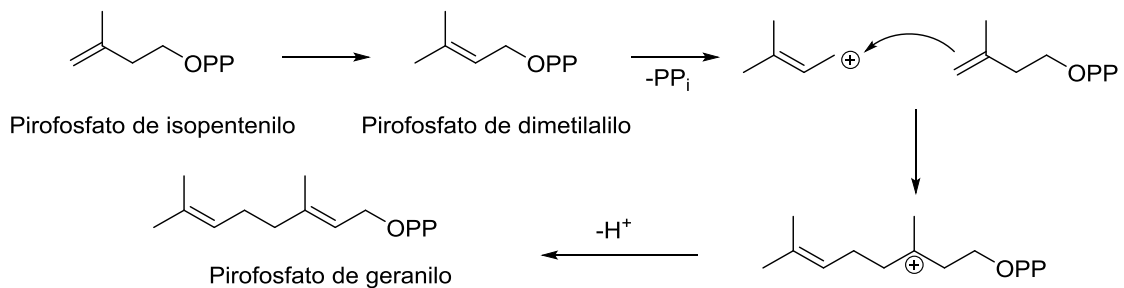
La biosíntesis del colesterol inicia mediante la condensación de dos unidades de acetil-CoA para formar la hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA), reacción catalizada por la enzima HMG-CoA sintasa (Esquema 1). Las reacciones en esta etapa son las mismas que se presentan en la cetogénesis, sin embargo la unidad de HMG-CoA utilizada en la cetogénesis se produce en la mitocondria; por el contrario, la HMG-CoA destinada para la síntesis de esteroides se forma en el citosol.

Los pasos subsecuentes después de la síntesis de HMG-CoA ocurren en el retículo endoplasmático liso. La HMG-CoA reductasa reduce la HMG-CoA a mevalonato. Posteriormente el mevalonato es convertido a varios intermediarios de unidades de isopreno. En la biosíntesis de éstas unidades (Esquema 1), las enzimas implicadas en los distintos procesos son: tiolasa (1), HMG-CoA sintetasa (2), HMG-CoA reductasa (3), mevalonato cinasa, fosfomevalonatocinasa (4), y difosfomevalonatodescarboxilasa (5). La inhibición de las proteínas asociadas con la síntesis de las unidades de IPP y DMAPP es de gran relevancia clínica. Algunos fármacos como las estatinas ejercen su efecto terapéutico mediante la inhibición de la HMG-CoA reductasa.



Esquema 1. Biosíntesis del colesterol: unidades de isopreno.

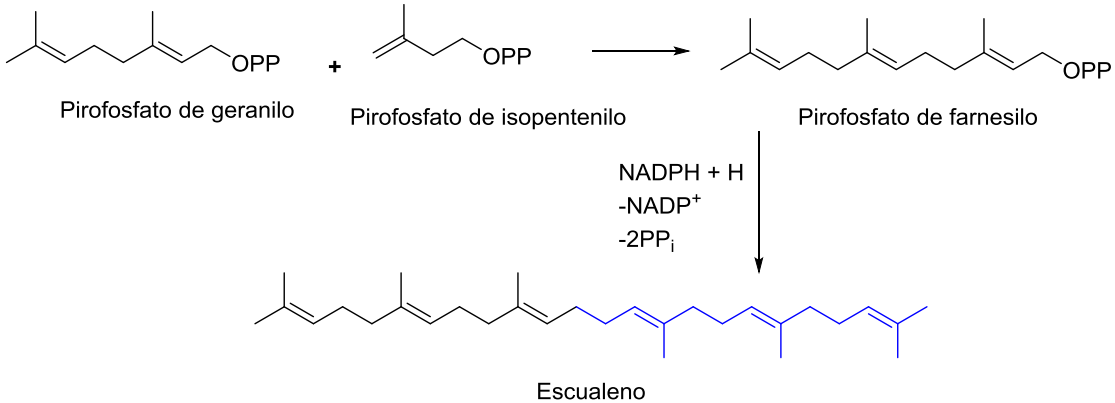
La siguiente etapa inicia con la isomerización de una molécula de pirofosfato de isopentenilo (IPP) a pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), catalizada por la pirofosfato de isopenteniloisomerasa (Esquema 2). El producto obtenido es a su vez condensado con otra unidad de IPP para generar el pirofosfato de geranilo (GPP). En esta reacción, catalizada por la pirofosfato de geranilo sintetasa, el pirofosfato del primer sustrato sirve como el grupo saliente y el carbocatión resultante reacciona con el doble enlace del segundo sustrato.



Esquema 2. Biosíntesis del colesterol: pirofosfato de geranilo.

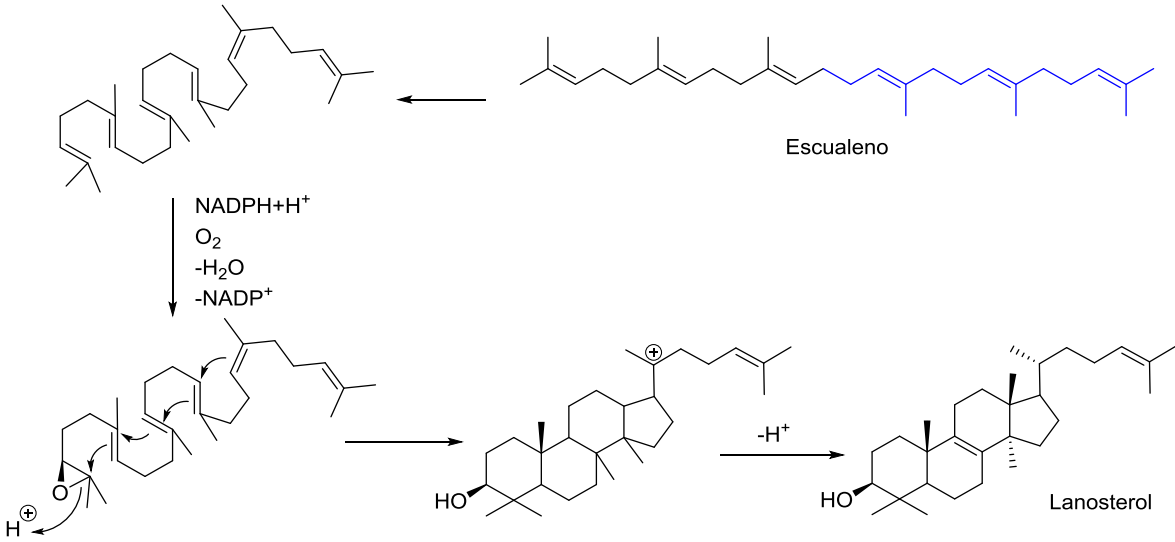
La síntesis del intermediario C₁₅, pirofosfato de farnesilo (FPP), mecanísticamente es similar a la síntesis del (GPP). El FPP, además de ser usado en la síntesis de esteroides, también está involucrado en numerosas modificaciones postranscripcionales de algunas proteínas asociadas a la membrana. Aunque la fracción del FPP utilizado para este propósito es muy poca.

Posteriormente, dos moléculas de FPP se unen cabeza-cabeza en la síntesis del precursor lineal final de los esteroides, el escualeno, y esta reacción es catalizada por la escualeno sintetasa (Esquema 3).



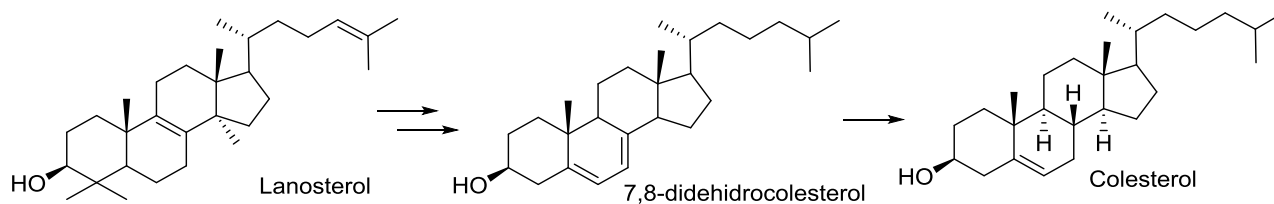
Esquema 3. Biosíntesis del colesterol: escualeno.

Finalmente, bajo la acción de las enzimas escualeno epoxidasa y lanosterol sintasa, se logra la formación del núcleo esteroidal (Esquema 4); la escualeno epoxidasa es una enzima tipo citocromo P450 que utiliza NADPH para reducir uno de los dos átomos presentes en el oxígeno molecular, mientras que mantiene el otro en un estado altamente reactivo, que posteriormente está implicado en un proceso específico. En el caso de la biosíntesis del colesterol, la escualeno epoxidasa introduce un oxígeno activo en el doble enlace terminal del escualeno para formar un epóxido, que posteriormente sufre una apertura por mediación de la lanosterol sintasa, iniciando así una cascada de reacciones que permite la formación de los cuatro anillos característicos de los sistemas esteroidales.



Esquema 4. Biosíntesis del colesterol: lanosterol

Las distintas reacciones que convierten el lanosterol a 7-dehidrocolesterol y luego a colesterol (Esquema 5) también son catalizadas por enzimas que pertenecen a la familia de la citocromo P450.



Esquema 5. Biosíntesis del colesterol.

2.2. Andrógenos y su acción molecular

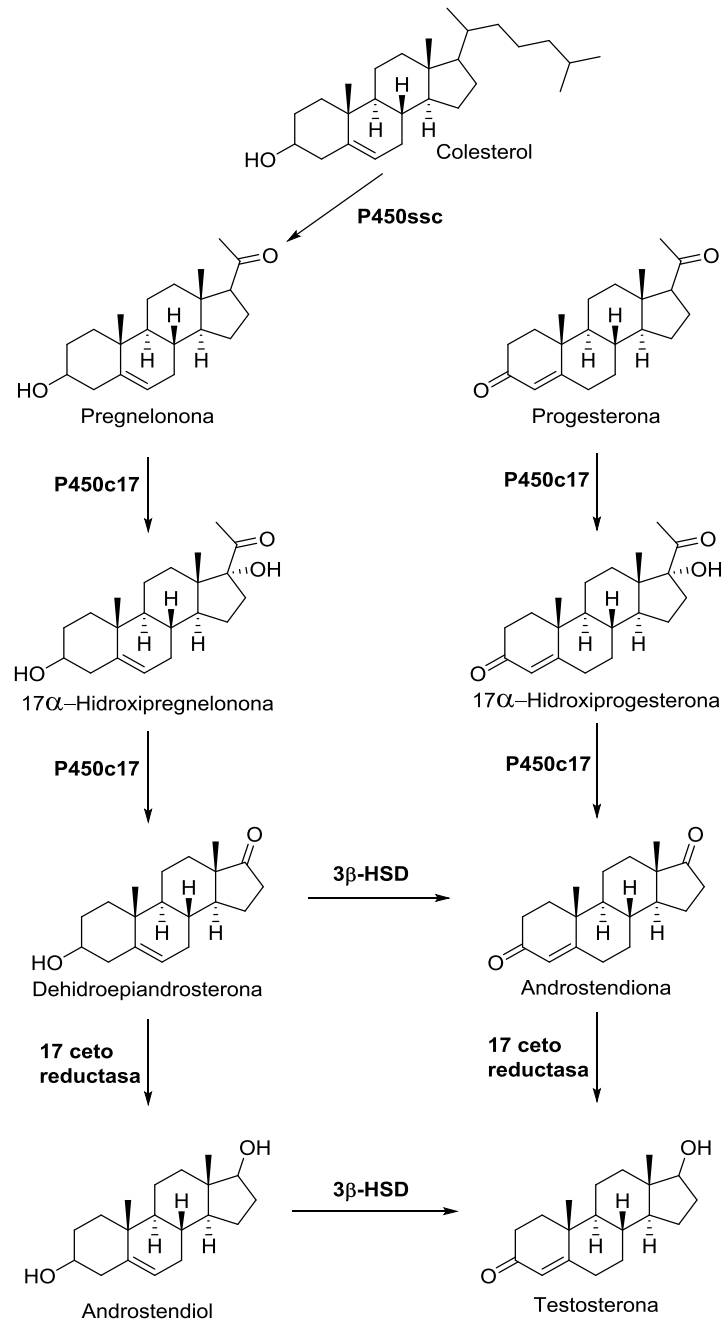
2.2.1. Biosíntesis de la testosterona

Los andrógenos son hormonas esteroidales que regulan la fisiología y el comportamiento sexual en el varón, promoviendo el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales primarios y secundarios. La estructura química de los andrógenos está basada en el esqueleto del androstano.^{12,13} La testosterona es la hormona sexual masculina predominante en la circulación y es producida principalmente en los testículos. El metabolito reducido de esta hormona por acción de la 5 α R, la 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) es el andrógeno endógeno más potente.

En su mayoría, la producción de testosterona se da a partir del colesterol y se realiza en las Células de Leydig localizadas en los testículos, aunque también se efectúa en la corteza adrenal, el hígado y los ovarios en las mujeres.

El paso limitante en la biosíntesis de la testosterona es la ruptura de la cadena lateral en el colesterol por parte de la P450scc (Esquema 6), proceso regulado por la hormona luteinizante, que es liberada a su vez en la glándula pituitaria por acción de la hormona liberadora de gonadotropinas, secretada en el hipotálamo, y también por acción de la regulación que genera la retroalimentación de la testosterona a nivel de la glándula pituitaria y del hipotálamo.^{14,15,16} En la membrana de las células de Leydig, localizadas en el tejido intersticial de los testículos, es donde ocurre la unión de la hormona luteinizante (LH) a sus receptores. Así la biogénesis de la testosterona en las células de Leydig inicia mediante la unión de la LH a su receptor y a través de la mediación por proteínas G se logra la activación de la adenilatoclasa, aumentando de este modo la concentración intracelular de AMP

cíclico (cAMP). Posteriormente, el cAMP activa una cinasa dependiente de cAMP que conlleva a la fosforilación y activación de distintas enzimas implicadas en la biosíntesis de los esteroides.^{17,18}



Esquema 6. Biosíntesis de la testosterona.

Aunque la dehidrepiandrosterona (DHEA) también posee un efecto agonista débil sobre el AR, son la testosterona y la 5α-DHT los andrógenos endógenos mayoritarios. Además de interactuar con el AR, la testosterona también se asocia con otros receptores esteroidales con menor afinidad, como los receptores de

progesterona y los receptores estrogénicos. En contraste, la 5 α -DHT se une específicamente y con mayor afinidad al AR.

Los hombres adultos sanos producen normalmente entre 3 y 10 mg de testosterona al día, y las concentraciones plasmáticas varían entre 300 y 700 ng/dL. La testosterona se asocia en alrededor de un 35% a la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG), mientras que el 55% restante está unida con baja afinidad a la albúmina; finalmente cerca de un 2% restante se encuentra como hormona libre. La 5 α -DHT tiene incluso una mayor afinidad por la SHBG que la que presenta la testosterona, sin embargo, la 5 α -DHT se encuentra en tan sólo un 5% de la abundancia con que se encuentra la testosterona en la sangre y es ampliamente derivada del metabolismo periférico de la testosterona. La concentración no asociada de testosterona determina su tasa de consumo metabólico. Así, la cantidad de SHBG en el plasma afectará el tiempo de vida media de la testosterona circulante.¹⁷ De este modo, los andrógenos están presentes en el torrente sanguíneo ya sea en su forma libre o asociados a distintas proteínas plasmáticas. Sin embargo, únicamente en su forma libre pueden atravesar las membranas celulares; la forma asociada está implicada solamente en el aumento de los niveles intracelulares de andrógenos. Así, el grado en que los andrógenos se unen a sus proteínas determina su función biológica, ya que distintas concentraciones intracelulares pueden generar efectos fisiológicos adversos. En este contexto, el organismo regula la producción, liberación, y disponibilidad de los andrógenos en todos los niveles corporales.¹⁵

A diferencia de las hormonas proteicas, cuyos receptores se encuentran en la membrana plasmática, los receptores para las hormonas esteroidales son intracelulares. La naturaleza lipídica de los esteroides permite que puedan atravesar las membranas celulares a través de un mecanismo de difusión simple. De esta manera, una vez que la testosterona se encuentra en el citoplasma de una célula blanco, se asocia con la enzima 5 α -reductasa que se encuentra en la membrana nuclear y es transformada, en presencia de NADPH, en su metabolito más activo DHT. Éste último forma un complejo con el receptor androgénico el cual está localizado dentro del núcleo. La unión de DHT al AR (DHT-AR) genera un cambio conformacional en el receptor, exponiéndose el dominio de unión para los elementos de respuesta hormonal (HRE) situados en el ADN. Se conoce que esta exposición se encuentra asociada a la liberación de una proteína de choque térmico (HSP90) con una subsecuente dimerización del complejo DHT-AR. Los homodímeros DHT-AR activados se unen a los HRE iniciando la transcripción de los genes de respuesta androgénica. Finalmente, los niveles elevados de RNA mensajero (mRNA) promueven el incremento de la síntesis proteica en el retículo endoplasmático, tales como enzimas, receptores y/o factores de secreción que subsecuentemente resulta en la respuesta esteroidal, regulando así la función, el crecimiento y la diferenciación celular. Así, la función del AR como un factor de transcripción es directamente dependiente de la asociación con la DHT.¹⁹

Por otra parte, la transformación de la testosterona a DHT por parte de la 5 α -reductasa involucra, en un inicio, la formación del complejo 5 α -reductasa-NADPH para una posterior unión de la testosterona y luego una transferencia regio y estereoespecífica de un hidruro por parte del NADPH a la posición 5 de la testosterona. El enolato resultante en C3-C4 se estabiliza por un residuo electrofílico de la enzima. La liberación de DHT del complejo se produce por el tautomerismo mediado por la enzima, y por último la regeneración de la misma se da a través de otro ciclo catalítico.²⁰

Los niveles de testosterona endógena, y de manera más significativa los de testosterona libre, disminuyen en hombres de edad avanzada, mientras que los niveles de SHBG aumentan. A pesar de los bajos niveles de testosterona libre, la incidencia del cáncer de próstata y de la hiperplasia prostática benigna es mayor con la edad, haciendo que esto sea relacionado con una conversión completa de la testosterona a 5 α -DHT en la próstata por parte de la 5 α R. Aunque no existe una evidencia directa de que la testosterona causa la enfermedad, el cáncer de próstata en su etapa inicial si es claramente dependiente de andrógenos.²¹

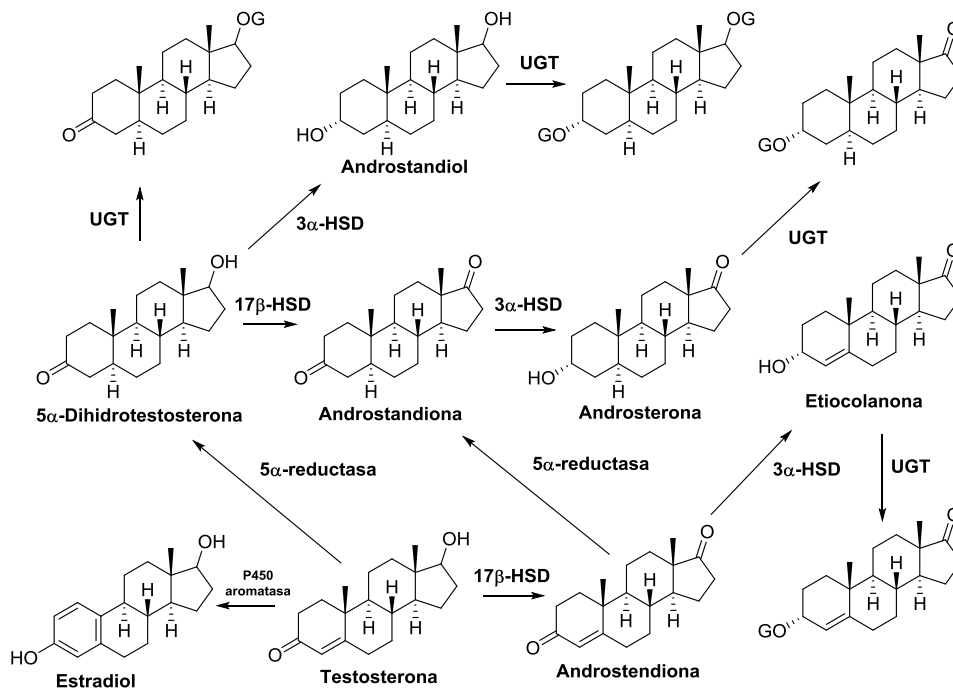
2.2.2. Metabolismo de la testosterona

La testosterona es metabolizada ya sea en sus tejidos blanco o en el hígado;^{22,23} en los tejidos blanco puede ser convertida a otros metabolitos fisiológicamente activos.²⁵

En los tejidos adiposos, una pequeña cantidad de testosterona (0.2%) es convertida a estradiol a través de la ruptura del grupo metílico en C₁₉ y la aromatización del anillo A (reacción catalizada por una aromatasa). Este proceso también ocurre en los ovarios de las mujeres. En los hombres, aproximadamente un 80% del estrógeno circulante proviene de la aromatización de la testosterona en los tejidos adiposos, mientras que el otro 20% es secretado por las células de Leydig en los testículos.²⁶ Tanto la reducción por la 5 α R como la aromatización para generar estradiol son procesos irreversibles.

Además de las vías metabólicas antes mencionadas, la testosterona puede ser desactivada por otras vías (Esquema 7), como la reducción y posterior oxidación en el hígado, seguido por glucuronidación y posterior excreción renal. También se presenta la conversión metabólica a androstendiona a través de la oxidación del grupo 17 β -OH, y androstandiona con una reducción del anillo A. La androstandiona puede ser convertida posteriormente a androsterona mediante la reducción del grupo 3-ceto. Alternativamente, la androstendiona

puede ser convertida a etioclolanona a través de la reducción de 5 β - y 3-ceto. De forma similar, la 5 α -DHT puede ser convertida a androstandiona, androsterona y androstandiol.²⁷



Esquema 7. Metabolismo de la testosterona (G, Glucuronido; HSD, Hidroxi esteroide dehidrogenasa; UGT, UDP-glucuronosiltransferasa).

La principal vía de eliminación de la testosterona es renal. Así, tras la administración de testosterona cerca del 90% es excretada en la orina, y un 6% se recupera en las heces a través de la circulación enterohepática. Los metabolitos mayoritarios presentes en la orina incluyen a la androsterona y la etioclolanona. Ambos metabolitos son excretados principalmente como glucurónidos conjugados o, en un menor porcentaje, como sulfatos conjugados. La mayoría de los metabolitos anteriormente mencionados sufren una extensa glucuronidización de los grupos 3 α - o 17 β -OH, ya sea en los tejidos blanco o en el hígado.²⁸

Por la vía oral el tiempo de vida media de la testosterona en el plasma es menor a 30 minutos. Aproximadamente el 90% de la testosterona es metabolizada antes de que alcance la circulación sistémica. Así, y con la finalidad de mejorar la biodisponibilidad de la testosterona, la mayoría de las preparaciones farmacéuticas son administradas a través de parches transdermales o inyecciones intramusculares. También, la alquilación o esterificación en la posición C17 ha sido ampliamente utilizada como una modificación estructural para disminuir marcadamente el metabolismo hepático e incrementar la biodisponibilidad oral o el tiempo de acción de la testosterona.

2.2.3. La disposición de la testosterona en los tejidos y su función

Numerosos estudios en animales han demostrado que los andrógenos, después de una administración intravenosa, presentan una mayor retención en los tejidos blanco como la próstata, donde el AR es altamente expresado. La eficiencia en retención en los tejidos y la selectividad de los diferentes ligandos parece estar fuertemente relacionada con su afinidad de unión por el receptor y su resistencia al metabolismo.²⁹

La testosterona ejerce su efecto en el organismo mediante la unión al AR en tejidos blanco donde la 5 α -reductasa no es expresada, puede ser convertida a 5 α -DHT (5-10%) por la 5 α -reductasa antes de asociarse con el AR, o ser aromatizada a estrógeno y actuar a través del receptor de estrógeno. En este sentido se considera que la formación de 5 α -DHT es la forma natural, para los tejidos dependientes de DHT, como la próstata y la vesícula seminal, al amplificar la actividad androgénica de la testosterona. La 5 α -DHT es un ligando más potente que la testosterona frente al receptor de andrógenos pues se une con mayor afinidad al AR, presentando una potencia 2-10 veces más fuerte en los tejidos dependientes de andrógenos.³⁰ Por otra parte, el estrógeno desempeña un rol primordial en la regulación de procesos metabólicos,^{31,32} en el estado de ánimo y la cognición,³³ enfermedades cardiovasculares,³⁴ y funciones sexuales como la libido.³⁵ Por otra parte la testosterona es el andrógeno principal que actúa en los tejidos “independientes de DHT”, tales como el músculo esquelético donde la 5 α -reductasa no se expresa en altos niveles.²⁴

2.3. El receptor androgénico

El receptor androgénico es un miembro de la súper familia de receptores nucleares y esteroidales. Esta familia comprende más de 100 miembros diferentes conocidos, de los cuales, solo se conocen cinco receptores (estrógeno, progesterona, andrógeno, glucocorticoide y mineralocorticoide) en los organismos vertebrados.³⁶ A través de la clonación del receptor androgénico a partir de ADN complementario (cADN) de rata y humano, se ha podido lograr la elucidación de la estructura del receptor androgénico. El AR humano es una proteína soluble que funciona como un factor de transcripción intracelular. Está compuesto por 919 residuos de aminoácidos (110 kDa) es codificado por un gen ubicado en el cromosoma X, y dividido en 8 exones. Dos de estos exones codifican para dos dedos de zinc involucrados en la unión al ADN, y otros cuatro exones están involucrados en la codificación para el dominio implicado en la unión de la DHT, localizado en la región carboxi-terminal de la

cadena proteica.³⁷⁻⁴³ La secuencia de aminoácidos en el AR humano es muy similar al AR de las ratas (85% de similitud), y tienen secuencias idénticas en las regiones de los dominios de unión de los ligandos y al ADN.⁴⁰ La asociación de la DHT al AR induce un cambio conformacional que expone el dominio de unión al ADN y esto conlleva a una dimerización del complejo DHT-AR; dicho dominio de unión presenta secuencias características de cisteínas que forman dedos de zinc, mismos que se introducen en regiones específicas de los elementos de respuesta hormonal (HRE), confiriendo así la estabilidad conformacional requerida por la RNA polimerasa, el ADN y múltiples factores involucrados en la transcripción proteica.

Debido a que la expresión de genes regulada por el AR es responsable de la diferenciación sexual masculina y de los cambios en la pubertad de los varones, numerosos fármacos que se acoplan al AR son empleados con aplicaciones clínicas: los agonistas del AR se usan para el tratamiento del hipogonadismo mientras que los antagonistas se emplean generalmente para tratar enfermedades andrógeno dependientes como el cáncer de próstata.⁴³ Por otra parte, los ligandos que se unen al AR se pueden clasificar como esteroideos y no-esteroideos con base a su estructura.^{44,45}

El AR es expresado principalmente en tejidos blanco de andrógenos, como la próstata, el músculo esquelético, el hígado, y el sistema nervioso central, encontrándose el más alto nivel de expresión en la próstata y la glándula adrenal.⁴⁶

La activación de este receptor por los andrógenos endógenos como la testosterona y la 5 α -DHT promueven la diferenciación sexual masculina en el útero, y de los cambios en la pubertad masculina. En los varones adultos, la regulación androgénica mantiene la libido, la espermatogénesis, masa muscular y fuerza, y de la densidad mineral en los huesos.^{47,48} El efecto de los andrógenos en los tejidos reproductivos, incluidos la próstata, la vesícula seminal, y testículos, se conoce como androgénico, mientras que los efectos retenedores de nitrógeno en el músculo y en los huesos se conocen como anabólico.

2.4. Regulación del crecimiento de la próstata por los andrógenos

En el desarrollo fetal masculino, los testículos secretan testosterona al torrente sanguíneo, estimulando la diferenciación de los ductos de Wolff, las vesículas seminales, el epidídimo y la próstata. Sin embargo si la cantidad de testosterona es insuficiente dentro del suero fetal, la próstata no se desarrollará. Aunque actualmente se sabe que distintos factores regulan el crecimiento de la próstata y se conoce además oncogenes

y supresores génicos implicados en su desarrollo, es clara la dependencia continua de andrógenos para mantener la estructura y funcionalidad de la próstata.⁴⁹⁻⁵² Diversos estudios han demostrado que la glándula prostática no presenta un crecimiento normal en hombres con pseudohermafroditismo. Este padecimiento es causado por una marcada deficiencia de la enzima 5 α R tipo II, aunque estas personas presentan caracteres sexuales normales, como musculatura razonable en la pubertad, normalidad en sus genitales, líbido y erecciones, estos son atribuidos a la acción androgénica de la testosterona.⁵³ Finalmente se ha demostrado es la 5 α -DHT el andrógeno más activo dentro de la próstata, ya sea por la respuesta que tiene dicha glándula a su acción androgénica, o por la elevada afinidad que tiene el receptor androgénico por la 5 α -DHT sobre la testosterona y/o por el hecho de que la concentración intranuclear de la 5 α -DHT excede a la de cualquier otro andrógeno encontrado en las células prostáticas.^{54,55}

2.5. La enzima 5 α -reductasa

2.5.1. Las isoenzimas tipo 1 y 2 de la 5 α -reductasa y su relación con desórdenes endócrinos

Dos isoenzimas de la 5 α R, designadas como tipo 1 y tipo 2, han sido identificadas mediante la clonación del cADN de humano y rata. Ambas isoenzimas están compuestas de aproximadamente 250 aminoácidos, y comparten un 50% de similitud en su secuencia y ambas son proteínas integrales de la membrana del retículo endoplasmático.^{56,57,20} A pesar de todas estas similitudes, ambas isoformas presentan diferentes propiedades cinéticas, bioquímicas y farmacológicas.

La isoenzima de tipo 1 es producida principalmente en las glándulas sebáceas y en el hígado, tiene una baja afinidad por sustratos esteroidales, y es sensible a ciertos inhibidores de tipo benzoquinolínico. Por otra parte, la isoenzima de tipo 2 presenta una mayor afinidad por los sustratos esteroidales y es susceptible a ciertos inhibidores de tipo 4-azastoriodes.^{58,59}

El papel fisiológico de esta última isoforma ha sido ampliamente estudiado. Así, ésta isoenzima es responsable de la síntesis embrionaria de la 5 α -DHT que es requerida para el desarrollo de los genitales externos y la próstata.^{60,61}

En gran parte, el razonamiento médico detrás del enfoque que se le da a la 5 α -reductasa para ser considerada la diana de interés en el tratamiento del cáncer de próstata, radica en la identificación de una deficiencia genética de esta enzima en un grupo de hombres que presentaban pseudo hermafroditismo en la República Dominicana;

dichos hombres nacían con genitales externos ambiguos y eran comúnmente criados como chicas hasta que, en la pubertad, el incremento de los niveles de testosterona causaba el desarrollo del fenotipo típico masculino. Después de la pubertad dichos hombres llevaban vidas normales, pero presentaban tres características importantes: principalmente no desarrollaban un crecimiento normal de la próstata, no poseían acné, y no presentaban calvicie prematura.⁵³

Este hallazgo enfocó el interés científico sobre la investigación de la 5 α -DHT y su relación con algunos desórdenes endócrinos más que hacia la testosterona. Recientemente, se ha establecido que esta deficiencia genética se atribuye a la pérdida en la expresión de la 5 α -reductasa de tipo 2. Por otra parte, la 5 α -reductasa de tipo 1 contribuye solamente a un tercio de los niveles circulantes de 5 α -DHT y, de manera interesante, es la isoenzima predominante en la piel facial donde su rol en los desórdenes androgénicos no es claro.^{62,63,20}

2.5.2. Mecanismo de la inhibición de la enzima 5 α -reductasa: modificación covalente por la finasterida

La finasterida [*N*-(1,1-dimetiletil)-3-oxo-4-aza-5 α -androst-1-en-17 β -carboxamida] es un potente inhibidor irreversible de la enzima 5 α -reductasa (Figura 7), que bloquea la conversión de testosterona a 5 α -dihidrotestosterona. Este fármaco se comercializa bajo el nombre de Proscar, y es utilizada actualmente para el tratamiento de enfermedades andrógeno dependientes, como el cáncer de próstata y la neoplasia prostática benigna.^{64,65}

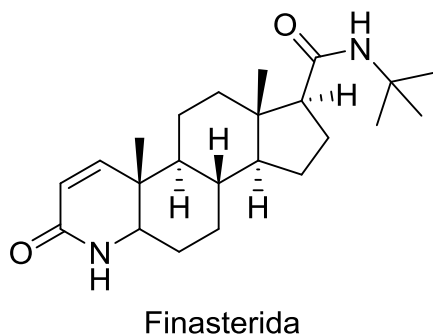


Figura 7. *N*-(1,1-dimetiletil)-3-oxo-4-aza-5 α -androst-1-en-17 β -carboxamida.

Se ha establecido que el complejo enzima-inhibidor formado con la 5 α -reductasa de tipo 1 es estable bajo una amplia variedad de condiciones desnaturalizantes, como 6 M Gdn-HCl, 1% SDS, o altas temperaturas; por otra parte el complejo que se genera con la 5 α -reductasa de tipo 2 es menos estable bajo estos tratamientos.

Adicionalmente, numerosos estudios han permitido establecer el mecanismo para la inhibición de la 5 α -reductasa por parte de la Finasterida. La constante de equilibrio observada en la inhibición de la enzima tiene una relación claramente hiperbólica con la concentración del inhibidor, indicando que el mecanismo de inhibición debe ser de dos pasos.⁶⁶ Además el doble enlace Δ^1 de la finasterida parece ser esencial para lograr la inhibición: se ha propuesto que el mecanismo de la inhibición implica una adición de Michael por parte de un nucleófilo presente en el sitio activo de la enzima sobre el C1 de la finasterida. Una adición de Michael causaría un cambio en la hibridación de los carbonos del sistema carbonílico α,β -insaturado, pasando de sp^2 a sp^3 . Estudios mecanísticos realizados por Tian y colaboradores,⁶⁷ demostraron mediante el empleo de tritio la inhibición de competencia interna entre finasterida marcada con 3H y finasterida sin marcaje isotópico. El uso de [1,2- 3H]finasterida permitió demostrar que la inhibición de las dos isoenzimas de 5 α -reductasa por la finasterida implica dos pasos:



Donde K_i es la constante inicial de equilibrio para la inhibición, y k_3 es la constante para el segundo paso, dependiente del tiempo. Para un mecanismo cinético de dos pasos como este cuando $[I] \gg [E]$, el efecto isotópico en el segundo paso $^T k_3$ puede ser calculado mediante:

$$^T k_3 = R_e / R_0$$

En donde R_0 y R_e representan la relación de las concentraciones de 1H -finasterida respecto a la concentración de 3H -finasterida, en la fase acuosa, antes y después de la extracción, respectivamente; dichas concentraciones fueron determinadas a través del conteo dual de $^{14}C/^3H$.

El resultado de estos estudios permitió evidenciar que las transformaciones químicas sobre el doble enlace Δ^1 de la finasterida, está en congruencia con la hipótesis de una modificación covalente de la 5 α -reductasa por parte de la finasterida.⁶⁵

Por otra parte, Bull y colaboradores,⁶⁸ mediante estudios cinéticos con finasterida marcada isotópicamente ($[^3H]$ finasterida), pudieron elucidar otros aspectos importantes para entender el mecanismo de inhibición sobre la 5 α -reductasa. Así, este grupo de investigación demostró que el inhibidor forma un aducto covalente con la enzima por el ataque del enolato de dihidrofinasterida (producto directo de la transferencia de hidruro por parte del NADPH). El intermediario propuesto se presenta en la figura 8.

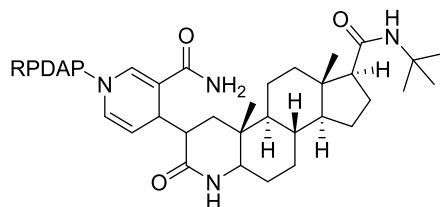
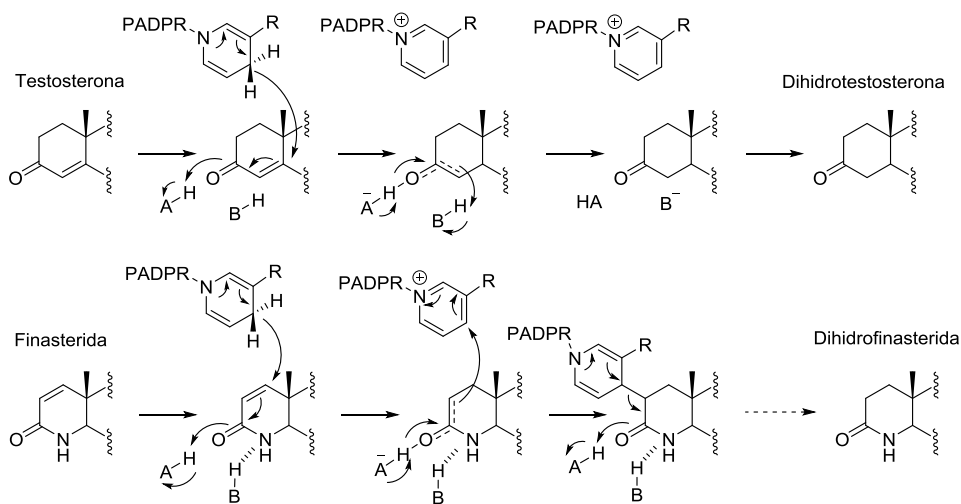


Figura 8. Intermediario propuesto como inhibidor de la enzima 5 α -reductasa por parte de la finasterida.

Dicho intermediario es inestable en solución y, entre otras reacciones, se descompone para generar [^{14}C]dihidrofinasterida con un 75% de rendimiento y con un tiempo de vida media de 11 días en condiciones estándar a 37°C. En este contexto, el mecanismo propuesto por Bull y colaboradores,⁶⁸ y cuyas hipótesis se basan en los trabajos de Tian y colaboradores,^{65,67} se ilustra en el esquema 8, en donde se aprecia que la reducción de la testosterona y la inhibición por la finasterida siguen reacciones paralelas similares que proceden a través de intermediarios de tipo enol(ato). Las dos reacciones divergen en el paso final, en donde la finasterida transloca el enolato/carbanión a una posición en que este impide la transferencia del protón necesaria para llevar a cabo la reducción de la molécula. h



Esquema 8. Posible mecanismo de inhibición de la enzima 5 α -reductasa por parte de la finasterida.

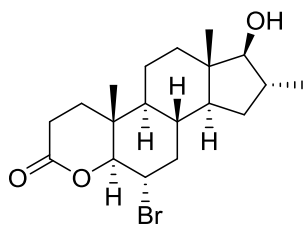
La translocación del carbanión no parece ser el único factor que previene esta transferencia, pues estudios recientes con distintos átomos en la posición 4 de la finasterida, mostraron que un heteroátomo es necesario para poder evadir la transferencia del protón, debido a que se logra una unión al donante del protón mediante un puente de hidrógeno. Así, los derivados de finasterida que contienen en la posición 4 un átomo de oxígeno, son también potentes inhibidores dependientes del tiempo y, por el contrario, derivados en que se presenta un metileno en la posición 4 no presentan actividad inhibitoria, siendo regenerados como sustratos alternos sin haber inactivado la enzima.⁶⁸

2.6. Antiandrógenos

Los andrógenos son una clase de hormonas esteroidales que regulan la fisiología y el comportamiento sexual en los varones. Además, están implicados en la masculinización, a través del desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales primarios y secundarios en el hombre.^{12,13} En el cuerpo humano, la testosterona es el andrógeno en mayor circulación, y se produce mayoritariamente en los testículos. Sin embargo, el andrógeno endógeno más potente es su metabolito reducido, la 5 α -DHT, cuya producción se realiza solamente en determinados órganos blanco, y es catalizada por la enzima 5 α R. Ambos andrógenos, además de estar estrechamente implicados en el desarrollo sexual del varón, también participan en distintos procesos metabólicos en otros tejidos como el riñón, hígado y cerebro.¹⁷

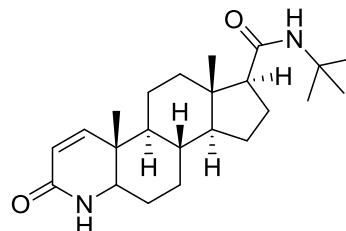
Se considera un antiandrógeno a una molécula que antagoniza los efectos de la testosterona en los órganos o tejidos sensibles a los andrógenos y que, cuando son administrados junto con los andrógenos, bloquean o disminuyen la efectividad androgénica. Estas sustancias pueden actuar de distintas formas, ya sea interfiriendo con la entrada de andrógenos a la célula blanco, o mediante el bloqueo de la conversión de la testosterona a su metabolito más activo 5 α -DHT, e incluso a través de la competencia por el receptor androgénico.

Los antiandrógenos pueden ser de origen natural, como la progesterona, o bien de origen sintético, ya sean esteroidales o no esteroidales. Los antiandrógenos esteroidales son los de mayor interés terapéutico (Figura 9), en especial los derivados de la progesterona, debido a que son homólogos de los esteroides de origen natural. Entre los más conocidos se encuentran el acetato de ciproterona (CPA), la finasterida, oxendolona y el BOMT. El CPA genera su efecto antiandrogénico a través de la competencia con la 5 α -DHT por el sitio de unión con el AR;^{69,70} la finasterida por otra parte, es el prototipo de los fármacos que actúan inhibiendo la enzima 5 α R, reduciendo los niveles de 5 α -DHT y aumentando los de testosterona; la oxendolona y el BOMT han sido fármacos menos estudiados, y presentan su actividad antiandrogénica por competencia por el AR. En general el uso de estos antiandrógenos genera anormalidades a todos los niveles fisiológicos, que van desde los progestacionales y conducta sexual, hasta anormalidades hormonales, como la pérdida de libido, ginecomastia, impotencia, anormalidades en el espermatozoides, corazón y atrofia celular.^{71,72}



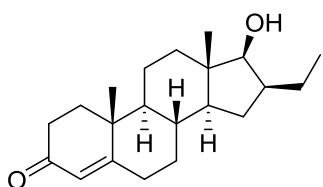
BOMT

6α-bromo-17β-hidroxi-16α-metil-4-oxa-5α-androstan-3-ona



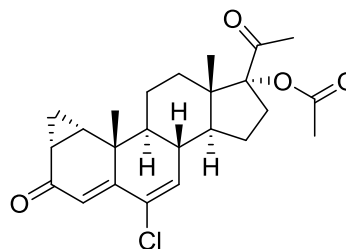
Finasterida

17β-(N-tert-butilcarbamoil)-4-aza-5α-andros-1-en-3-ona



Oxendolona

16β-etil-17β-hidroxiestr-4-en-3-ona



Acetato de ciproterona

17α-acetoxi-6-cloro-1α,2α-metilenpregna-4,6-dien-3,20-diona

Figura 9. Principales antiandrógenos esteroidales utilizados en el tratamiento de enfermedades andrógeno dependientes.

Por otra parte, los antiandrógenos no esteroidales presenta diferencias en su estructura y mecanismo de acción. Entre los más utilizados se encuentran la flutamida, bicalutamida y el ketoconazol (Figura 10). La flutamida, no compite con los dominios de unión para la 5α-DHT en el AR, pues su cadena lateral le permite adquirir la suficiente flexibilidad para encajar en el sitio activo del AR como un andrógeno.⁷³ La bicalutamida, carece de acción sobre la glándula pituitaria o sobre el hipotálamo. Se ha demostrado que el mecanismo de acción de este fármaco es mediante la competencia con la 5α-DHT por los dominios de unión con el AR.⁷⁴ Por otra parte, el ketoconazol es un agente que disminuye drásticamente la producción de testosterona, debido a que interactúa con el receptor androgénico e inhibe la enzima citocromo P-450 involucrada en su biogénesis.^{75,76} Estos fármacos antiandrogénicos no presentan los efectos secundarios de hepatotoxicidad, diarreas, náuseas y vómitos, que se han observado por el uso de antiandrógenos esteroidales. Sin embargo, la desventaja más grande que presentan estos agentes es su tiempo de vida media tan corta, lo que conlleva al uso de dosis mayores en tiempo cortos y que se asocian a efectos secundarios inaceptables.^{77,78}

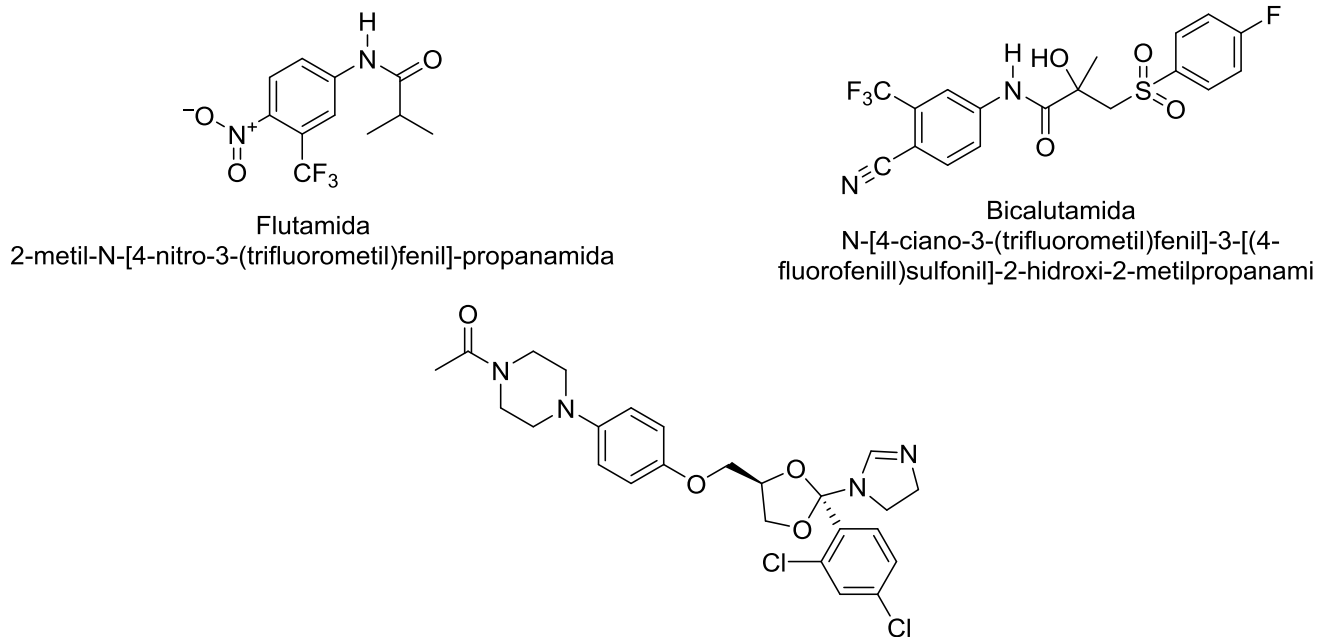


Figura 10. Principales antiandrógenos no esteroideos utilizados en el tratamiento de enfermedades andrógeno dependientes.

Con base al mecanismo de transformación enzimática de la testosterona a 5α -DHT se han diseñado dos tipos de inhibidores de la enzima 5α -reductasa. El primer tipo son los substratos análogos a la testosterona, que compiten con esta inhibiendo su unión al complejo 5α -reductasa-NADPH; el segundo tipo de inhibidores que se unen al complejo 5α -reductasa-NADP⁺, después de que la 5α -DHT ha sido liberada, ocasionando que dicho complejo no pueda entrar al siguiente ciclo catalítico. Así, los inhibidores de la enzima 5α -reductasa provocan una disminución en la concentración de 5α -DHT, aumentando los niveles de testosterona, y con ello se produce una reducción del tamaño de la próstata, sin presentar efectos secundarios no deseables.^{49,50}

En este contexto, y con base a los antecedentes expuestos anteriormente, se propone la síntesis de nuevos D-homo derivados de la pregnenolona, con un sistema carbonílico α,β -insaturado, 16-en-17a-ona, siendo este el requisito estructural para que los distintos derivados sintetizados puedan actuar como inhibidores de la enzima 5α -reductasa, y actuar así como antiandrógenos en el tratamiento de enfermedades andrógeno dependientes, como el cáncer de próstata.

3. Hipótesis

Los D-homo derivados de la pregnenolona que contengan un sistema carbonílico α,β -insaturado, sintetizados a partir del acetato de 16,17-dedihidropregnenolona tendrán propiedades antiandrogénicas mediante la inhibición de la enzima 5 α -reductasa.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

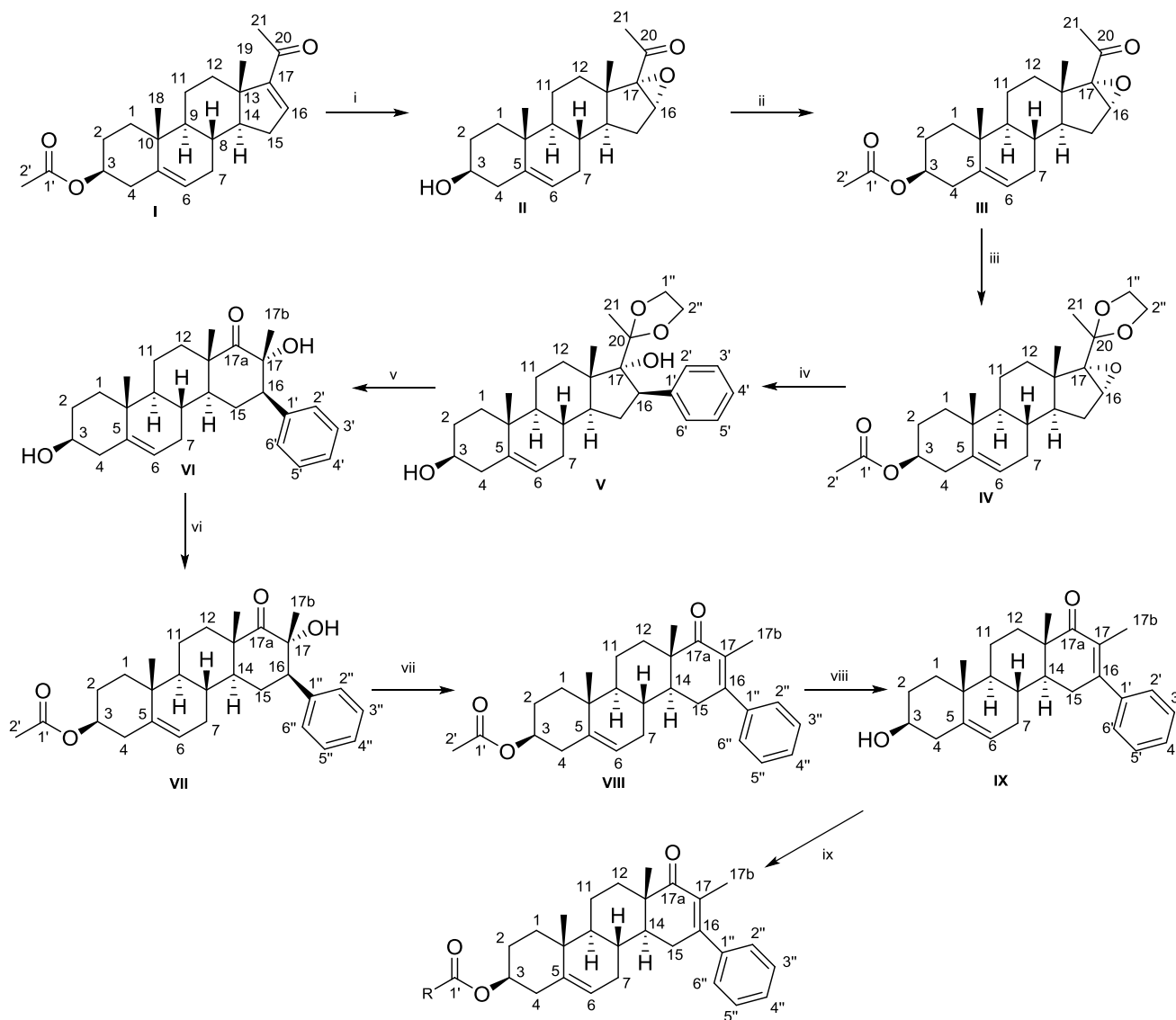
- Sintetizar una serie de D-homo derivados del sistema 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona, y establecer su potencial antiproliferativo mediante ensayos *in vitro* sobre la línea celular de cáncer de próstata PC3.

4.2. Objetivos específicos

1. Desarrollar, estandarizar y optimizar una estrategia de síntesis de derivados novedosos del sistema 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona. Una vez sintetizados estos compuestos, se caracterizarán mediante análisis espectroscópicos y espectrométricos.
2. Determinar la actividad antiproliferativa *in-vitro* de todos los compuestos sintetizados mediante la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento celular sobre líneas celulares de cáncer de próstata PC3.
3. Determinar la influencia del anillo D modificado con un sistema carbonílico α,β -insaturado en la actividad antiandrogénica, de los compuestos sintetizados.
4. Determinar la influencia de la longitud de la cadena carbonada de los ésteres lineales en la posición C3 de los productos finales en su actividad antiproliferativa.

5. Metodología

Para la síntesis de los derivados del sistema 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona se propuso la siguiente ruta sintética:



Esquema 9. Ruta sintética para la obtención de los derivados del sistema 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona.

(i) H₂O₂, NaOH 4N; (ii) Piridina, anhídrido acético; (iii) etilenglicol, APTS, trimetilortoformiato de etilo; (iv) PhMgBr 3N, (CH₃)₂S.CuBr, THF(anh); (v) HClO₄, acetona; (vi) piridina, anhídrido acético; (vii) SOCl₂, piridina; (viii) MeOH, KOH solución 10%; (ix) anhídrido correspondiente, piridina.

5.1. Parte experimental

5.1.1. Etapa 1. Síntesis de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-pregna-5-en-20-ona (II)

En un matraz bola se pesaron 1.0 g (2.8×10^{-3} mol) de la materia prima, acetato de 16,17-dedihidropregnenolona (16-DHP), y se adicionaron 66 mL de metanol caliente, 2 mL de hidróxido de sodio 4N (8×10^{-3} mol) y 4 mL de peróxido de hidrógeno al 30% en agua (0.135 mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas monitoreando su avance por cromatografía de capa fina (CCF). Una vez concluida la reacción, se agregó suficiente hielo y se concentró a vacío para eliminar el metanol, precipitando de manera espontánea el producto II en forma de cristales blancos. El exceso de base se eliminó mediante lavados sucesivos con agua y posterior secado al vacío. Se obtuvieron 0.9 g (98%) en forma de cristales blancos con p.f. de 180-182 °C.

Acetato de la 16,17-dedihidropregnenolona (I): $C_{23}H_{32}O_3$, PM: 356.51 g/mol, **EM-ESI m/z [A]:** 357.373 [M + H]⁺, 297.286 [M - C₂H₄O₂]⁺; **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 6.64 (dd, $J = 3.3, 1.9$ Hz, 1H, H16), 5.32 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H6), 4.54 (tdd, $J = 10.8, 6.8, 4.3$ Hz, 1H, H3), 2.40 – 2.21 (m, 4H), 2.19 (s, 3H, H21), 1.96 (s, 3H, H2'), 1.95 – 1.72 (m, 3H), 1.69 – 1.44 (m, 5H), 1.42 – 1.19 (m, 2H), 1.09 (m, 1H), 0.99 (s, 3H, H18), 0.85 (s, 3H, H19). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ 196.87, C20; 170.56, C1'; 155.33, C17; 144.47, C16; 140.26, C5; 122.01, C6; 73.89, C3; 56.36, C14; 50.39, C9; 46.09, C13; 38.16, C4; 36.88, C1; 36.80, C10; 34.61, C12; 32.27, C7; 31.55, C15; 30.17, C8; 27.74, C2; 27.18, C21; 21.47, C2'; 20.65, C11; 19.25, C18; 15.74, C19. **IR [cm⁻¹]** 3042.08, 3059.14, C=CH; 2943.71, 2965.16, 2865.45, 2838.49, -CH₂-; 1728.14, -(C=O)O-; 1660.07, C=O; 1583.94, C=C; 1463-1440, -C-H; 1372.62, -C-O-CH₃; 1365.20, -CH₃, 1245, 1232.50, C=C; 1035.92, C-O; 976.21, C=C-H; 906.29, C=CH.

16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-pregna-5-en-20-ona (II): $C_{21}H_{30}O_3$, PM: 330.47 g/mol, **EM-ESI m/z [A]:** 331.035 [M + H]⁺, 313.291 [M - H₂O]⁺, 254.220 [M - C₂H₄O₃]⁺, **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 5.37 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H6), 3.73 (s, 1H, H16), 3.63 – 3.49 (m, 1H, H3), 2.40 – 2.19 (m, 2H), 2.07 (s, 3H, H20), 2.04 – 1.81 (m, 4H), 1.75 – 1.66 (m, 3H), 1.67 – 1.28 (m, 7H), 1.09 (s, 3H, H18), 1.06 (s, 3H, H19). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ 205.06, C20; 141.15, C5; 121.05, C6; 71.67, C17; 71.07, C3; 60.58, C16; 50.30, C9; 45.56, C13; 42.23, C4; 41.54, C14; 37.14, C1; 36.71, C10; 31.59, C15; 31.47, C8; 31.39, C12; 29.76, C2; 27.56, C7; 26.05, C21; 20.47, C11; 19.37, C18; 15.23, C19. **IR [cm⁻¹]** 3551.69, 3341.41, OH; 3030.94, H-C=C; 2970.16, 2936.12, 2864.28, 2835.09, -CH₂-, -CH-; 1691.65, C=O; 1467.17-1435.97, -C-H y -O-H; 1374.99, -CH₃; 1244.35 Flexión C=C; 1055.02, 1045.28, 1025.69, C-OH y C-O; 970.95, C=C-H.

5.1.2. Etapa 2. Síntesis del acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20-oxopregna-5-en-3 β -ilo (III)

Se pesaron 1 g de II (3.03×10^{-3} mol) en un matraz bola y se disolvieron en 10 mL (0.105 mol) de Ac₂O y 2.5 mL (0.03 mol) de piridina. La mezcla anterior se agitó a temperatura ambiente por 4h, monitoreando el curso de la reacción por CCF, Una vez finalizada la reacción, la mezcla anterior se transfirió a un vaso de precipitados y se adicionaron 100 mL de agua y suficiente hielo, permitiendo así la cristalización espontánea de III en forma de cristales blancos, los cuales fueron secados al vacío y se lavaron sucesivamente con 10 mL de una solución de HCl al 5% para eliminar el exceso de piridina y anhídrido acético, obteniéndose 1.1 g de un sólido (III) con un rendimiento del 96%, con respecto a la materia prima (II) como agujas de color blanco con p.f. de 157-159°C.

Acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20-oxopregna-5-en-3 β -ilo (III): C₂₃H₃₂O₄, PM: 372.51 g/mol, **EM-ESI *m/z* [A]:** 373.368 [M + H]⁺, 313.294 [M – C₂H₄O₂]⁺, 254.219 [M – C₄H₇O₄]⁺, **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 5.40 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H6), 4.63 (tdd, *J* = 10.4, 6.5, 4.2 Hz, 1H, H3), 3.72 (s, 1H, H16), 2.48 – 2.24 (m, 3H), 2.08 – 2.05 (m, 6H, H21 y H2'), 2.04 – 1.82 (m, 5H), 1.61 (m, 7H), 1.52 – 1.27 (m, 3H), 1.27 – 1.13 (m, 3H), 1.09 – 1.06 (m, 6H, H18 y H19). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ 204.99, C20; 170.54, C1'; 140.04, C5; 121.97, C6; 73.82, C3; 71.02, C17; 60.53, C16; 50.22, C9; 45.51, C13; 41.53, C4; 38.09, C1; 36.89, C10; 36.79, C7; 31.45, C8; 31.35, C14; 29.72, C15; 27.70, C2; 27.55, C21; 26.02, C11; 21.45, C2'; 20.42, C18; 19.27, C19; 15.21, C12. **IR [cm⁻¹]** 3034.69, OCH; 2966.01, 2941.89, 2902.62, 2870.82, 2849.22, 2837.37, -CH₂-, -CH-; 1729.36, -(C=O)O-; 1660.66, C=O; 1587.70, C=C; 1450.26, 1434.83, -CH-; 1374.83, -CH₃; 1359.46, -CO-CH₃; 1241.57, -C-O-; 1203.86, C=C; 1030.65, C-O; 907.24, C=CH-

5.1.3. Etapa 3. Síntesis del acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3 β -ilo (IV)

Se pesaron 1.0 g (2.6×10^{-3} mol) de III en un matraz de bola y se adicionaron 6 mL de tolueno seco, 3 mL de etilenglicol (0.053 mol), 5 mL de ortoformiato de trimetilol (0.045 mol) y 0.3 g de ácido p-toluensulfónico seco (1.7×10^{-3} mol) como catalizador. La mezcla de reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente y bajo condiciones anhidras, monitoreando el curso de la reacción por CCF. Una vez finalizada la reacción, la mezcla anterior se neutralizó con 0.035 g (4.26×10^{-4} mol) de acetato de sodio anhidro y se sometió a un proceso de separación por reparto con 30 mL de CHCl₃ y lavados sucesivos con agua destilada (3 x 50 mL); y la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro y evaporada al vacío, produciendo un sólido amarillo el cual fue recrystalizado con metanol, obteniéndose 0.83 g (74%) de IV, con p.f. de 194-196°C.

Acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3 β -ilo (IV): C₂₅H₃₆O₅, PM: 416.56 g/mol, **EM-ESI *m/z* [A]:** 417.403 [M + H]⁺, 356.374 [M - C₂H₄O₂]⁺, **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 5.30 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H6), 4.52 (ddd, *J* = 10.8, 8.8, 4.3 Hz, 1H, H3), 3.98 – 3.75 (m, 4H, H1'' y H2''), 3.31 (s, 1H), 2.23 (dd, *J* = 13.3, 9.3 Hz, 2H), 3.31 (s, 1H, H16), 2.23 (dd, *J* = 13.3, 9.3 Hz, 2H), 1.96 (s, 3H, H2'), 1.89 – 1.72 (m, 5H), 1.51 (ddd, *J* = 17.9, 11.5, 5.0 Hz, 7H), 1.37 (s, 3H, H21), 1.14 (m, 3H), 0.96 (s, 3H, H18), 0.90 (s, 3H, H19). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ 170.57, C1'; 139.88, C5; 122.28, C6; 109.22, C20; 73.88, C3; 70.81, C17; 65.15, C1''; 64.68, C2''; 58.63, C9; 50.17, C14; 46.08, C16; 41.62, C4; 38.11, C1; 36.89, C10; 36.77, C12; 32.73, C8; 31.46, C13; 29.86, C15; 27.73, C7; 27.07, C2; 23.77, C2'; 21.49, C11; 20.53, C18; 19.27, C19; 15.74, C21. **IR [cm⁻¹]** 3041.90, -O-CH; 2998.77, 2969.37, 2942.16, 2915.27, 2884.18, 2853.74, 2824.02, -CH₂-, -CH-; 1717.69, -(C=O)O-; 1464.79, 1441.60, 1430.06 -CH-; 1369.88, -C-O-CH₃; 1245.31, C=C; 1043.67, 1033.20, 1023.79, C-O.

5.1.4. Etapa 4. Síntesis de 20,20-(etilendioxi)-16 β -fenilpregna-5-en-3 β ,17 α -diol (V)

En un matraz bola se pesan 1 g (2.4×10^{-3} mol) del producto **IV**, 300 mg (1.47×10^{-3} mol) del complejo bromuro de dimetilsulfuro-cobre, y se adicionan en 5 mL de tetrahidrofurano seco; enseguida, gota a gota y en atmósfera inerte, se adicionan 2.4 mL (6.97×10^{-3} mol) de una solución de PhMgBr (3N), la mezcla resultante se agitó a reflujo por 5 días en atmósfera inerte. Transcurrido este tiempo de reacción, a la mezcla se le adicionan 100 mL de una solución saturada de cloruro de amonio y hielo, y se agitó por 30 minutos, posteriormente se realizó una extracción con CHCl₃ (3 x 30mL), la fase orgánica fue lavada sucesivamente con agua y esta se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, tras evaporar el disolvente a vacío se obtuvo un producto aceitoso. La purificación por CCA del producto en un sistema de elución de 6:5,Hexano:Acetato de etilo, produciendo 0.71 g (65%) de **V** como producto puro en forma de finas agujas blancas con p.f. de 220-222°C.

20,20-(etilendioxi)-16 β -fenilpregna-5-en-3 β ,17 α -diol (V): C₂₉H₄₀O₄, PM: 452.63 g/mol, **EM-ESI *m/z* [A]:** 453.645 [M + H]⁺, 435.447 [M - H₂O]⁺, 391.419 [M - C₂H₄O₂]⁺, **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 7.23 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H2' y H6'), 7.14 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H3' y H5'), 7.05 – 6.98 (m, 1H, H4'), 5.30 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H6), 3.61 – 3.35 (m, 4H, H1'' y H2''), 3.22 (dd, *J* = 10.4, 8.6 Hz, 1H, H3), 3.02 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H16), 2.36 – 2.11 (m, 3H), 2.09 – 1.90 (m, 2H), 1.87 – 1.68 (m, 4H), 1.69 – 1.36 (m, 10H), 1.14 (s, 3H, H21), 1.03 (s, 3H, H18), 0.99 (s, 3H, H19). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ 143.58, C5; 140.70, C1'; 127.09, C3' y C5'; 125.24, C2' y C6'; 121.63, C4'; 113.49, C20; 90.11, C6; 71.77, C17; 64.49, C3; 61.45, C1''; 60.73, C2''; 49.97, C9; 49.55, C14; 46.35, C16; 42.30, C4; 37.25, C13; 36.54,

C10; 34.63, C1; 32.59, C12; 31.99, C8; 31.66, C2; 31.29, C7; 21.25, C11; 20.76, C18; 19.49, C19; 14.54, C21. IR [cm^{-1}] 3570.40, -OH; 3482.56, 3272.79, -OH; 3086.44, C=C-H; 3052.39, Ar-H; 2961.23, 2950.47, 2932.18, 2886.50, 2833.90, 2825.26, Tensiones -CH₂-, -CH-; 1670.34, 1599.29, C=C; 1490.68, 1455.84, 1438.47, -CH-, -CH₃-; 1369.88, -CO-CH₃; 1245.31, C=C; 1043.67, 1033.20, 1023.79, C-O-.

5.1.5. Etapa 5. Síntesis del 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VI)

A 1.0 g (2.2×10^{-3} mol) del producto **V** disueltos en 80 mL de acetona, es tratado con 1.0 mL de HClO₄ (0.11 mol) adicionado gota a gota en agitación constante. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4h monitoreando el avance de la reacción por CCF. Una vez finalizada la reacción se eliminó el disolvente a sequedad; posteriormente la mezcla se vertió en un vaso de precipitados con aproximadamente 150 mL de una solución saturada de NaHCO₃, y hielo. Así **VI** precipitó como un sólido blanco amorfo, tras purificación con cromatografía en columna (6:5, Hexano:Acetato de etilo) se obtuvieron 0.87 g (96%) de **VI** puros como cristales ligeramente transparentes con p.f. de 210-211°C.

16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VI): C₂₇H₃₆O₃, PM: 408.58 g/mol, **EM-ESI *m/z* [A]:** 409.419 [M + H]⁺, 391.421 [M - H₂O]⁺, 373.395 [M - H₄O₂]⁺, **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 7.46 – 7.14 (m, 5H, H-aromáticos), 5.35 – 5.27 (m, 1H, H6), 4.18 (s, 1H, OH-17), 3.58 – 3.42 (m, 1H, H3), 3.00 – 2.85 (m, 1H, H16), 2.35 – 2.14 (m, 3H), 2.08 – 1.92 (m, 3H), 1.92 – 1.80 (m, 2H), 1.77 – 1.61 (m, 3H), 1.61 – 1.44 (m, 4H), 1.39 – 1.30 (m, 1H), 1.21 (s, 3H, H17b), 1.11 (s, 3H, H18), 1.04 (s, 3H, H19). **RMN ¹³C** (101 MHz, CDCl₃) δ 218.15, C17a; 140.61, C5; 139.74, C1'; 129.10, C3' y C5'; 127.86, C2' y C6'; 126.83, C4'; 120.84, C6; 78.23, C17; 71.47, C3; 54.49, C16; 50.99, C9; 49.03, C14; 47.05, C13; 41.93, C4; 36.81, C10; 36.77, C1; 33.06, C12; 31.72, C2; 31.50, C7; 31.01, C8; 26.49, C15; 23.97, C11; 19.46, C17b; 19.36, C18; 15.99, C19. **IR [cm^{-1}]** 3482.57, HO; 3482.56, HO; 3085.74, C=C-H; 3030.77, Ar-H; 2998.53, 2986.78, 2955.00, 2931-2838.21, -CH₂-, -CH-; 1688.54, C=O; 1603.48, 1583.39, Ar-H; 1496.38-1437.87, C=C; 1380.86, -CH-, -CH₃-; 1343.09-1297.42, -OH; 1057.63, -OH, 774.30, aromático mono-sustituido.

5.1.6. Etapa 6. Síntesis del acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo (VII)

En un matraz bola de 50 mL se pesan 0.559 g del compuesto **VI** (1.37×10^{-3} mol) y se adicionaron 1.81 mL (0.019 mol) de Ac₂O y 1.35 mL (0.016 mol) de piridina, esta mezcla se agitó a temperatura ambiente por 4 h, monitoreando el avance de la reacción por CCF, una vez finalizada la reacción, la mezcla se vertió en un vaso de precipitado con 50 mL de agua y suficiente hielo, precipitando de manera espontánea en forma de cristales blancos el producto **VII**. Enseguida el producto fue lavado sucesivamente con 10 mL de solución de HCl (1N) y agua para eliminar el exceso de piridina y anhídrido acético. La purificación del producto mediante CCC permitió la obtención de 0.606 g (99%) del derivado acetilado correspondiente **VII**.

Acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo (VII): C₂₉H₃₈O₄, PM: 450.62 g/mol, **EM-ESI m/z [A]:** 451.426 [M + H]⁺, 391.408 [M - C₂H₄O₂]⁺, 433.439 [M - H₂O]⁺, 373.379 [M - C₆H₅]⁺, **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38 – 7.07 (m, 5H, H-aromáticos), 5.39 – 5.30 (m, 1H, H6), 4.66 – 4.53 (m, 1H, H3), 4.21 (s, 1H, OH-17), 3.01 – 2.85 (m, 1H, H16), 2.39 – 2.16 (m, 3H), 2.04 (s, 3H, H2'), 2.01 – 1.83 (m, 4H), 1.77 – 1.47 (m, 7H), 1.43 – 1.32 (m, 1H), 1.21 (s, 3H, H17b), 1.10 (s, 3H, H19), 1.05 (s, 3H, H18). **RMN ¹³C** (101 MHz, CDCl₃) δ 218.07, C17a; 170.44, C1'; 139.73, C5; 139.52, C1''; 129.10, C3'' y C5''; 127.86, C2'' y C5''; 126.82, C4''; 121.78, C6; 78.21, C17; 73.62, C3; 54.47, C16; 50.91, C9; 48.94, C14; 47.02, C13; 37.81, C4; 36.86, C1; 36.56, C10; 33.01, C12; 31.70, C7; 30.97, C8; 27.63, C2; 26.48, C14; 23.96, C2'; 21.38, C11; 19.41, C17b; 19.27, C18; 15.98, C19. **IR [cm⁻¹]** 3549.15, 3472.45, HO-; 3087.12, C=C-H; 3061.27, Ar-H; 2931.08-2835.20, tensiones -CH₂-, -CH-; 1727.64, -(C=O)O-; 1689.57, C=O; 1601.25, 1582.38, Ar-H; 1493.51-1449.64, C=C; 1367.91-1342.55, -CH-, -CH₃-; 1239.19, C-O; 769.38, benceno mono-sustituido.

5.1.7. Etapa 7. Síntesis del acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (VIII)

En un matraz bola de 50 mL se disolvieron 0.305 g del derivado **VII** (6.7×10^{-4} mol) en 2.4 mL de CH₂Cl₂ seco, tras enfriar en baño de hielo y en atmósfera inerte, se añadieron, 0.3 mL (3.96×10^{-3} mol) de piridina, previamente destilada, y gota a gota 0.08 mL (1.18×10^{-3} mol) de SOCl₂ recién destilado, agitando la mezcla de reacción a temperatura ambiente y en atmósfera inerte por 1.5 h, y monitoreando el avance de la reacción por CCF. Al término de la reacción se realizó una extracción vía partición adicionando CHCl₃ y lavando sucesivamente la fase orgánica con agua, una solución de HCl (5%) para eliminar el exceso de piridina, y luego con una solución saturada de NaHCO₃ para eliminar el exceso de ácido, finalmente la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y tras

evaporar el disolvente se obtuvo un sólido amorfo que tras un proceso de purificación por cromatografía en columna, manejando un sistema de elución de 8:1, Hexano:Acetato de etilo, se obtuvieron 0.176 g (62%) de **VIII** como un finas agujas blancas.

Acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (VIII): C₂₉H₃₆O₃, PM: 432.60 g/mol, **EM-ESI m/z [A]:** 433.509 [M + H]⁺, **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.06 (m, 5H, H-aromáticos), 5.30 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H6), 4.63 – 4.42 (m, 1H, H3), 2.58 – 2.46 (m, 1H), 2.34 – 2.16 (m, 3H), 2.15 – 2.00 (m, 2H), 1.97 (s, 3H, H17b), 1.92 – 1.75 (m, 2H), 1.64 (s, 3H, H2'), 1.57 – 1.43 (m, 3H), 1.42 – 1.27 (m, 2H), 1.03 (s, 3H, H18), 0.96 (s, 3H, H19). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ 205.47, C17a; 170.59, C1'; 153.43, C16; 141.40, C5; 139.58, C1''; 129.32, C17; 128.42, C3'' y C5''; 127.80, C4''; 127.13, C2'' y C4''; 121.79, C6; 73.77, C3; 48.79, C9; 46.61, C13; 43.22, C14; 37.91, C4; 36.77, C1; 36.60, C10; 33.86, C12; 32.47, C7; 32.04, C2; 31.02, C8; 27.68, C15; 21.49, C2'; 20.02, C11; 19.32, C18; 15.76, C19; 13.39, C17b. **IR [cm⁻¹]** 3060.26, C=C-H; 3027.54, Ar-H; 2980.86-2839.42, R₂CH₂, R₃CH; 1724.86, -(C=O)O-; 1649.84, (C=C)C=O; 1619.58, C=C; 1597.32-1574.56, Ar-H; 1461.77-1429.13, C=C y -C-H; 1370.90, -CH₃; 1245.24, C-O; 774.68, benceno mono-sustituido.

5.1.8. Etapa 8. Síntesis de la 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX)

En un matraz de fondo redondo se pesaron 0.311 g (7.19 x 10⁻⁴ mol) del compuesto **VIII** y se disolvieron en 45 mL de metanol, enseguida a esta mezcla se adicionaron 0.8 mL de una solución de KOH en MeOH (10%) (1.15 x 10⁻³ mol), esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, monitoreando el avance de la reacción por CCF. Una vez concluida la reacción, se adicionó una solución saturada de NaCl, y se realizó una extracción con CHCl₃ (3 x 30 mL). Las fases orgánicas resultantes se reunieron y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, y se evaporó el disolvente a vacío. El producto resultante se purificó mediante una CCC [Hexano:Acetato de etilo (1.5:1)] se obtuvieron 0.278 g (99%) de **IX** como un sólido blanco.

16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX): C₂₇H₃₄O₂, PM: 390.57 g/mol, **EM-ESI m/z [A]:** 391.425 [M + H]⁺, 373.398 [M - H₂O]⁺, **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.57 – 7.02 (m, 5H, H-aromáticos), 5.39 – 5.25 (m, 1H, H6), 3.54 (ddd, J = 15.7, 11.1, 4.7 Hz, 1H, H3), 2.65-2.50 (m, 1H), 2.39 – 2.06 (m, 5H), 1.98 – 1.81 (m, 2H), 1.70 (s, 3H, H17b), 1.66 – 1.33 (m, 7H), 1.29 – 1.19 (m, 2H), 1.15 (s, 3H, H18), 1.06 (s, 3H, H19). **RMN ¹³C** (101 MHz, CDCl₃) δ 204.46, C17a; 152.37, C16; 140.37, C5; 139.65, C1'; 128.27, C17; 127.35, C3' y C5'; 126.72,

C4'; 126.05, C2' y C4'; 119.78, C6; 70.58, C3; 47.85, C9; 45.66, C14; 42.19, C13; 40.97, C4; 35.80, C1; 35.64, C10; 32.85, C12; 31.47, C2; 31.06, C7; 30.52, C8; 30.00, C15; 19.01, C11; 18.33, C19; 14.68, C18; 12.31, C17b.

5.1.9. Etapa 9. Síntesis de los derivados de 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (Xa, Xb)

Finalmente, se realizó la formación de los derivados de éster del producto 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (**IX**), utilizando el anhídrido correspondiente y la piridina, en el caso del éster propiónico el método utilizado fue el siguiente: 0.148 g del producto **IX** (3.79×10^{-3} mol) fueron disueltos en 0.37 mL (4.62×10^{-3} mol) de piridina y 0.67 mL (5.3×10^{-3} mol) de anhídrido propiónico, esta mezcla se agitó a temperatura ambiente por 2.5 h, monitoreando el avance de la reacción por CCF, al término de la reacción, la mezcla de reacción se vertió en agua con hielo, lo que hizo precipitar al propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (**Xa**) como un sólido blanco, tras esto se realizó extracción usando CHCl₃ (3 x 30 mL) y la fase orgánica se lavó con 30 mL de solución HCl al 5%, eliminando el exceso de piridina, y posteriormente con una solución saturada de NaHCO₃, para eliminar el exceso de ácido. Tras esto, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío para obtener finas agujas blancas que fueron purificadas por CCC [Hexano:Acetato de etilo, 9:1], dando 0.160 g del éster propiónico (94%). En el caso del éster butírico, siguiendo el mismo procedimiento se obtuvo un rendimiento del 96%.

Propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xa): C₃₀H₃₈O₃, PM: 446.63 g/mol, **EM-ESI m/z [A]:** 447.466 [M + H]⁺, 373.384 [M - C₃H₆O₂]⁺, **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.53 – 7.09 (m, 5H, H-aromáticos), 5.38 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, H6), 4.62 (ddd, *J* = 16.1, 11.1, 4.7 Hz, 1H, H3), 2.62-2.59 (m, 1H), 2.29 (s, 3H, H17b), 2.22 – 2.05 (m, 2H), 1.98 – 1.82 (m, 2H), 1.75 (s, 3H, H18), 1.66 – 1.52 (m, 3H), 1.51 – 1.34 (m, 2H), 1.14 (s, 3H, H3'), 1.08 (s, 3H, H19). **RMN ¹³C** (101 MHz, CDCl₃) δ 205.34, C17a; 173.89, C1'; 153.33, C16; 141.37, C5; 139.62, C1''; 129.27, C17; 128.35, C3'' y C5''; 127.72, C4''; 127.06, C2'' y C6''; 121.65, C6; 73.48, C3; 48.76, C9; 46.59, C14; 43.16, C13; 37.89, C4; 36.73, C1; 36.57, C10; 33.82, C12; 32.44, C7; 32.01, C2; 30.98, C8; 27.88, C2'; 27.65, C15; 19.98, C11; 19.26, C18; 15.67, C19; 13.30, C17b; 9.15, C3'. **IR [cm⁻¹]** 3068.30, C=C-H; 3026.26, Ar-H; 2966.85-2840.12, R₂CH₂, R₃CH; 1724.58, -(C=O)O-; 1649.72, (C=C)C=O; 1619.17, C=C; 1575.65, 1491.70, Ar-H; 1460.61-1428.69, C=C y -C-H; 1376.15, -CH₃; 1188.26, C-O; 771.30, benceno mono-sustituido.

Butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (Xb): C₃₁H₄₀O₃, PM: 460.30 g/mol, **EM-ESI m/z [A]:** 447.188 [M + H]⁺, 372.996 [M - C₄H₈O₂]⁺, **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.47 – 7.06 (m, 5H, H-aromáticos), 5.37 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H6), 4.62 (ddd, J = 16.0, 11.1, 4.7 Hz, 1H, H3), 2.59 (m, 1H), 2.38 – 2.22 (m, 5H), 2.20 – 2.06 (m, 2H), 1.97 – 1.84 (m, 2H), 1.69 (s, 3H, H17b), 1.66 – 1.55 (m, 1H), 1.50 – 1.32 (m, 2H), 1.13 – 1.07 (s, 3H, H18), 1.05 (s, 3H, H19), 0.96 (s, 3H, H4'). **RMN ¹³C** (101 MHz, CDCl₃) δ 204.42, C17a; 172.14, C1'; 152.41, C16; 140.36, C5; 138.62, C1''; 128.28, C17; 127.36, C3'' y C5''; 126.73, C4''; 126.06, C2'' y C6''; 120.65, C6; 72.43, C3, 47.76, C9; 45.59, C13; 42.18, C14, 36.91, C4; 35.74, C1; 35.57, C10; 35.54, C2'; 34.76, C12; 32.83, C7; 31.43, C2; 31.01, C8; 29.98, C15; 26.68, C11; 18.98, C18; 18.26, C19; 17.52, C3'; 12.61, C4'; 12.30, C17b. **IR [cm⁻¹]** 3066.57, C=C-H; 3031.93, Ar-H; 2966.14-2836.26, R₂CH₂, R₃CH; 1723.51 -(C=O)O-; 1650.70, (C=C)C=O; 1620.03, C=C; 1575.30, 1490.87, Ar-H; 1460.82 -1439.78, C=C y C-H; 1375.78, -CH₃; 1182.92, C-O; 770.56, benceno mono-sustituido.

El rendimiento total de la ruta sintética realizada es del 25%.

Determinación de la actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de próstata PC3

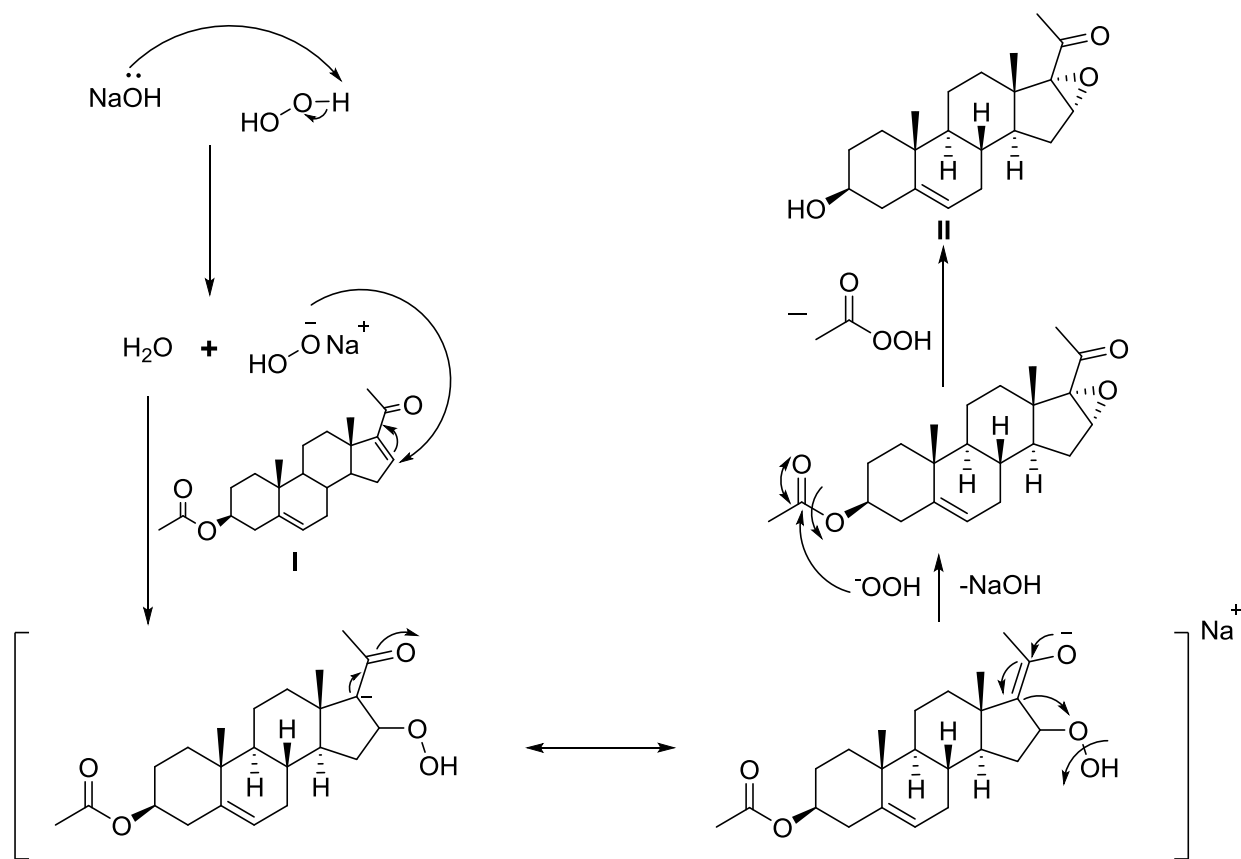
La línea celular PC-3 (Cáncer de próstata) fue proporcionada por el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) de Estados Unidos. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 enriquecido con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL penicilina G, 100 µg/mL sulfato de estreptomicina, 0.25 µg/mL de anfotericina B y 1% de aminoácidos no esenciales y se incubaron a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂.

Posteriormente, se tomó 100 µL de la solución celular fue vertida en una placa de ELISA (El contenido de las células por pozo varía entre 5000 y 10 000) y se incubó por 24 h. Cada compuesto evaluado fue disuelto en DMSO y adicionado a cada pozo, a la concentración final de cada compuesto de 50 µM, y se incubó por 48 horas, a 37°C y en atmósfera con 5% CO₂ y 100% de humedad relativa. Los pozos control contenían únicamente las células tumorales. Una vez finalizado el periodo de incubación, las células fijadas *in-situ* con 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v) frío. Esta mezcla se incubó durante 60 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante, se hicieron 5 lavados con agua desionizada y se dejó secar por 24 h. Posteriormente, la placa fue teñida con 100 µL de sulforodamida B (SRB) (0.4% p/v en 1% ácido acético), se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron lavados con una solución de ácido acético al 1% y se dejó secar por 24 h. Las células fijadas fueron resuspendidas con 10 mM de buffer Tris, pH=10 en agitación por 5 min. Finalmente se determinó la densidad óptica a 515 nm utilizando un lector de ELISA.

6. Discusión de resultados

6.1. Epoxidación e hidrólisis del acetato de 16,17-dedihidropregnenolona (I)

El mecanismo de reacción por el cual se lleva a cabo la epoxidación de la materia prima (I), bajo las condiciones de reacción indicadas en la parte experimental del presente trabajo, se ilustra a continuación (Esquema10):



Esquema 10. Mecanismo de reacción, epoxidación del acetato de 16,17-dedihidropregnenolona (I).

La integridad de la materia prima (I), previo a la reacción de epoxidación, fue comprobada mediante sus análisis de RMN, IR, y EM (Figuras A1-A4). Así, en el primer paso de esta reacción ocurre la epoxidación de la doble ligadura en la posición C16-C17 que es electrodeficiente y susceptible al ataque de especies nucleofílicas. Esta posición al estar conjugada a un grupo carbonílico altamente electroatractor, genera que los electrones localizados en los orbitales π del doble enlace estén en resonancia en el sistema carbonílico α,β -insaturado. En contraste, el doble enlace en C5-C6, el cuál es rico en electrones, genera repulsión de especies nucleofílicas debido a su alta densidad electrónica localizada en sus orbitales π .

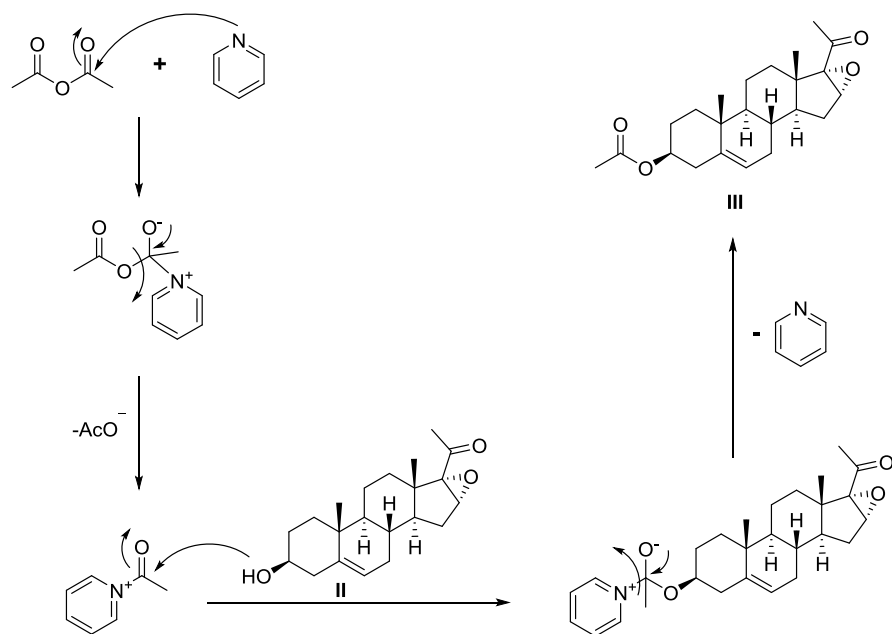
Por otra parte, y debido a las condiciones básicas de reacción, el éster en C3 es hidrolizado al alcohol libre correspondiente. Finalmente el grupo carbonílico unido a C20 es atacado nucleofílicamente por parte del anión peróxido, sin embargo, este proceso es reversible ya que dicho anión es mejor grupo saliente lo cual regenera inmediatamente a la función carbonílica.

El producto final de esta reacción, la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregna-5-en-20-ona(II), fue caracterizado mediante el análisis de sus espectros de RMN, IR y EM (Figuras A5-A8) y por comparación con los datos previamente reportados en el grupo de trabajo. Las diferencias entre los espectros de RMN de I y II radica principalmente en el desplazamiento de H3, m, δ = 4.54 ppm en I y m, δ = 3.63 ppm, respectivamente, correspondiente a la hidrólisis del éster acético al hidroxilo libre en C3; respecto a los desplazamiento que ocurren en ^{13}C , las señales de 16C y 17C son 144.5 y 155.3 ppm en I, y 60.6 y 71.7 ppm en II, respectivamente, debido a la sustitución en la doble ligadura C16-C17 perteneciente al sistema carbonílico α,β -insaturado, para formar el epóxido correspondiente; y a la desaparición de la señal en 170.6 ppm en I correspondiente a la pérdida del éster en C3.

En los espectros de IR, podemos observar la pérdida de la banda de 1728 cm^{-1} asociada al grupo carbonílico de éster en C3 en I y la aparición de una banda característica de un alcohol libre 3551.69 cm^{-1} en II. Además se observan bandas en 1055.02, 1045.28, 1025.69 cm^{-1} correspondiente a los enlaces C-O del epóxido en II. Finalmente, los espectros de masas confirmaron las señales asociadas a los iones $[\text{M} + \text{H}]^+$, para ambos compuestos.

6.2. Acetilación de la función hidroxílica en C3

La siguiente reacción en la ruta sintética fue la protección del alcohol libre en C3, debido a que este es un punto de derivatización posterior y que es susceptible a eliminación por deshidratación (Etapa 3), por lo que es necesario preservar dicho grupo funcional hasta el final de la ruta. Así, se realizó una acetilación (Esquema 11) con anhídrido acético y piridina. El producto de esta reacción, el acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20-oxopregna-5-en-3 β -ilo (III) fue caracterizado mediante el análisis de sus espectros de RMN, IR, y EM (Figuras A7-A10). Así, y de manera contraria a lo observado en la hidrólisis del éster en C3 de I para generar el alcohol libre en II, el protón asociado a C3 en II (m, δ = 3.63 ppm) se desplaza a campos más bajos en III (m, δ = 4.63 ppm), además de que se observa en el espectro RMN ^{13}C de III la señal correspondiente al carbonilo de éster en 1705 ppm.



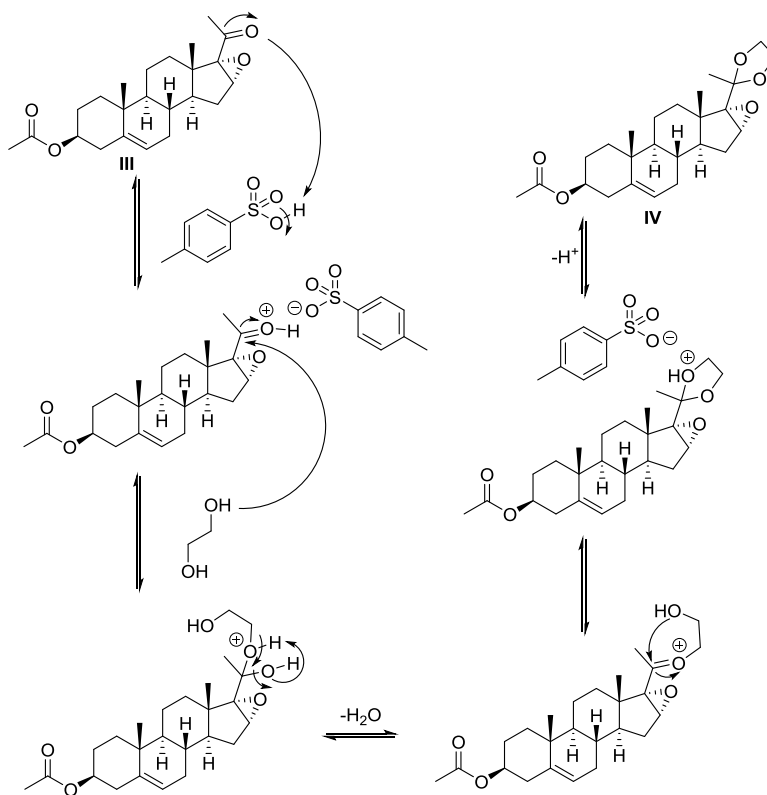
Esquema 11. Mecanismo de reacción, acetilación de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregna-5-en-20-ona (II).

Adicionalmente en el espectro de IR de **III** se observa una banda en 1660 cm⁻¹ atribuible al carbonilo de éster. Finalmente en el espectro de masas se observa el pico asociado al ion [M + H]⁺, confirmándose así la estructura propuesta de **III**.

6.3. Protección del grupo carbonilo en C20: formación del anillo de dioxolano

La tercera etapa de la ruta sintética fue la protección del carbonilo en C20 a través de la formación del anillo de dioxolano para generar el producto **IV** (Acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3 β -ilo)(74% de rendimiento). Esta reacción generó una serie de productos secundarios, mismos que fueron purificados mediante sucesivas cristalizaciones y purificaciones por CCA. Cabe mencionar que se realizaon numeroso intentos para proteger el carbonilo en C20 a partir del producto **II**, sin embargo en todos los casos se observó la deshidratación del alcohol en C3.

El mecanismo de reacción para la formación de **IV** se presenta en el esquema 12. En esta reacción se requiere de etilenglicol para poder formar el anillo de dioxolano, ácido p-toluensulfónico como catalizador para la formación de cetales, y trimetilortoformiato como agente desecante en el medio de reacción.

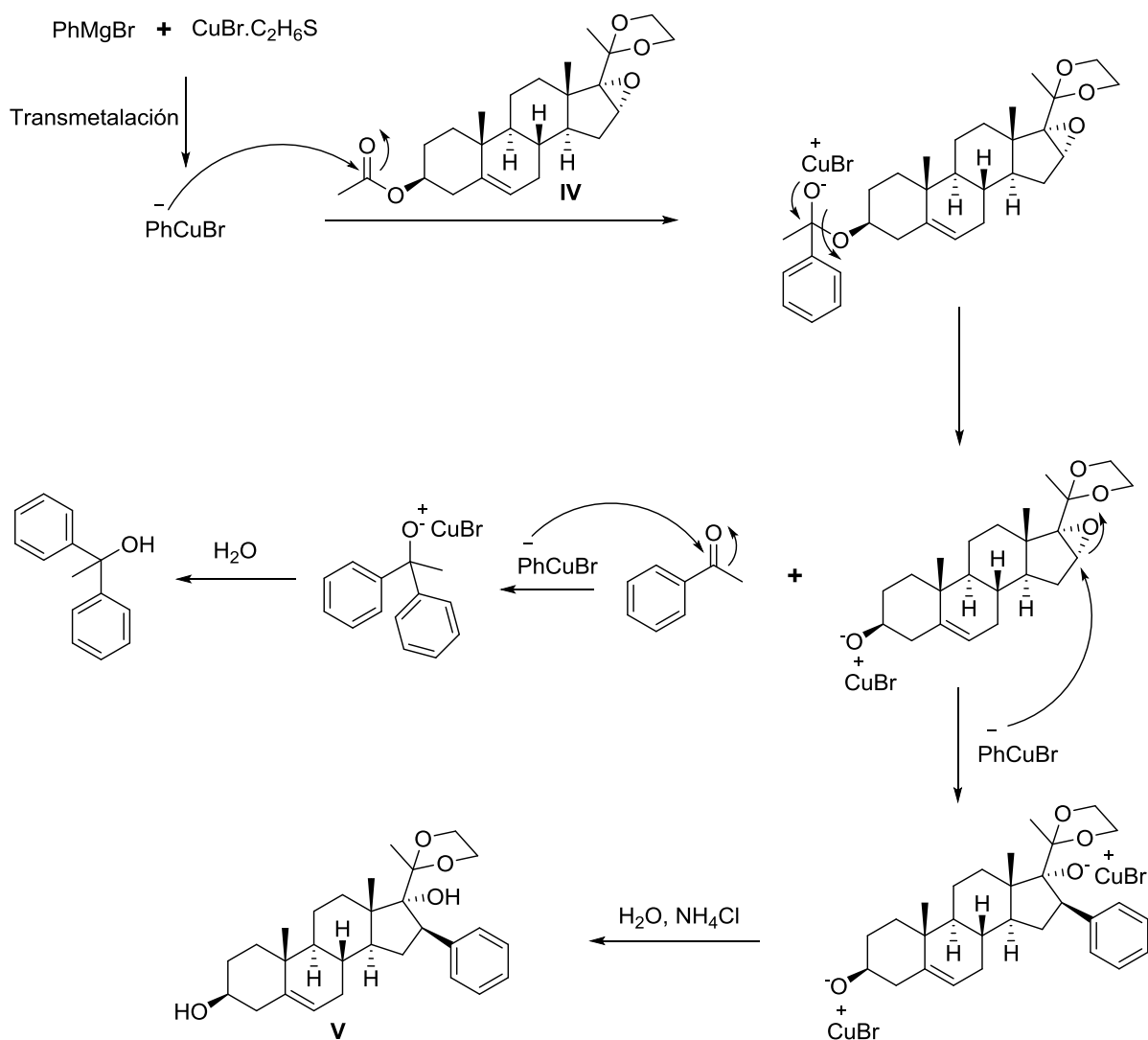


Esquema 12. Mecanismo de reacción, protección del carbonilo en C20 en (III).

En el espectro de RMN ^1H de **IV** (Figura A11) se observan las señales atribuidas a los protones de los metilenos del anillo de dioxolano, como un multiplete entre 3.75 – 3.98 ppm; en el espectro de RMN ^{13}C (Figura A12) se observa un desplazamiento a campos más altos del carbonilo en C20 (de 204.99 ppm a 109.22 ppm) y que corresponden a la formación del anillo de dioxolano. Finalmente, en el espectro de IR de **IV** (Figura A13) se observan las bandas características de los metilenos base de oxígeno en 1043.67, 1033.20, 1023.7 cm^{-1} y en el EM (Figura A14) se observó el ion molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ confirmando así la estructura propuesta.

6.4. Apertura del epóxido a través de una reacción de Grignard

Esta reacción consistió en la apertura del epóxido del acetato de $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en- 3β -ilo (**IV**) a través de la adición nucleofílica del bromuro de fenilcobre (Esquema 13). Para que esta reacción se lleve a cabo sin la generación de productos secundarios, se realizó en condiciones totalmente anhidras e inertes con un flujo controlado de N_2 .



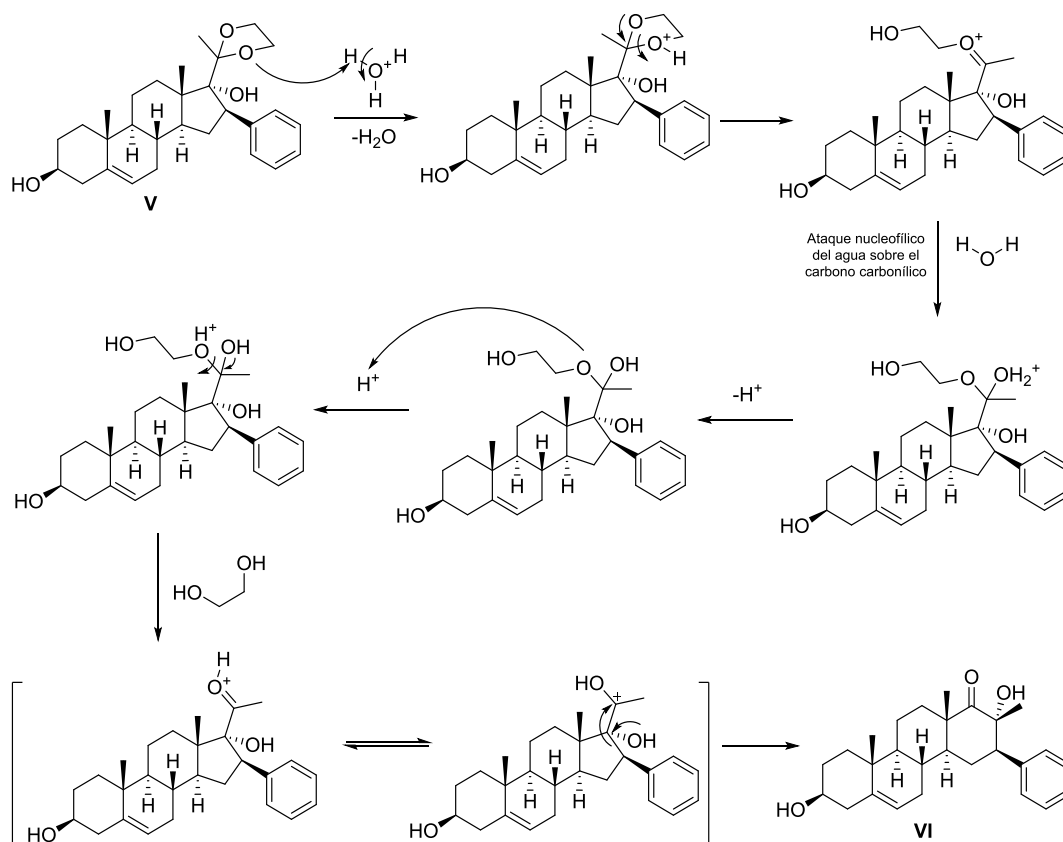
Esquema 13. Mecanismo de reacción, apertura del epóxido a través de la adición nucleofílica del bromuro de fenil cobre en el acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3 β -ilo (IV).

Cabe destacar que esta reacción involucró varios días de reacción, así, en el primer paso de esta reacción ocurre la transmetalación del bromuro de fenilmagnesio al bromuro de fenilcobre, el cual ataca al grupo carbonílico en C1'. Posteriormente, este mismo reactivo organometálico favorece la apertura del epóxido, pues la transmetalación con cobre genera una especie organometálica con un carácter más blando, y esto ocurre fácil y rápidamente, la apertura del epóxido requiere distintas condiciones de reacción, es por esto que se adiciona el bromuro de dimetilsulfurocobre, dando así la adición del correspondiente nucleófilo para generar 20,20-(etilendioxi)-16 β -fenilpregna-5-en-3 β ,17 α -diol (V).

En RMN ^1H (Figura A15) se puede observar las señales asociadas a los protones aromáticos entre 7.0 y 7.3 ppm; H-3 se desplaza a campos más bajos (4.52 ppm) debido a la hidrólisis del éster. Consecuentemente, en el espectro de RMN ^{13}C (Figura A16) se observa la pérdida del carbonilo de éster en 170 ppm y el metilo (C2') también desaparece del espectro; finalmente, la señal correspondiente al protón en C16 asociado al epóxido, se desplaza a campos más bajos en el producto (**V**). En el espectro de IR (Figura A17) se observan dos bandas asociadas a los alcoholes del producto en 3570 y 3482 cm^{-1} , además de las bandas del fenilo en 1490, 1455 y 1438 cm^{-1} . Por último, en el EM (Figura A18) se puede observar el pico asociado al ion $[\text{M} + \text{H}]^+$, que confirma la estructura propuesta.

6.5. Expansión del anillo D, generación de D-homo derivados

La quinta etapa consistió en la expansión del anillo D mediante el empleo de HClO_4 en acetona. La eliminación del anillo de dioxolano sigue el mecanismo típico de la hidrólisis ácida de acetales, sin embargo, al ser protonado el carbonilo libre en C20, sufre una transposición Wagner-Meerwein del enlace C16-C17 lo cual genera el producto **VI** con el anillo D expandido (Esquema 14).



Esquema 14. Mecanismo de reacción, expansión del anillo D en el 20,20-(etilendioxo)-16 β -fenilpregna-5-en-3 β ,17 α -diol (**V**), generación del esqueleto molecular de los D-homo derivados

En el espectro de RMN ^1H (Figura A19) se observa la pérdida de las señales asociadas a los protones del anillo de dioxolano (3.61-3.35 ppm) y la aparición del alcohol terciario de C17 en 4.18 ppm. Además, el singulete del metilo en C21 en **V** (1.14 ppm) se desplaza a campos más bajos (1.27 ppm) tras la transposición Wagner-Meerwein, y corresponde al metilo ahora en C17b del anillo D expandido en **VI**. En el espectro de RMN ^{13}C (Figura A20) se observa una nueva señal característica del carbonilo en C17a en 218.1 ppm, además de que se observa la pérdida de las señales de C1'' y C2'', en 64.49 y 61.45 ppm, respectivamente, asociadas a los carbonos del anillo de dioxolano.

En el espectro de IR (Figura A21), se conservan las dos señales correspondientes a los alcoholes presentes en **VI** en 3482 y 3480 cm^{-1} . Adicionalmente, se observa la señal característica del carbonilo en C17a en 1688 cm^{-1} . Finalmente en el EM (Figura A22), se puede observar la señal asociada al ion $[\text{M} + \text{H}]^+$, confirmándose la estructura propuesta.

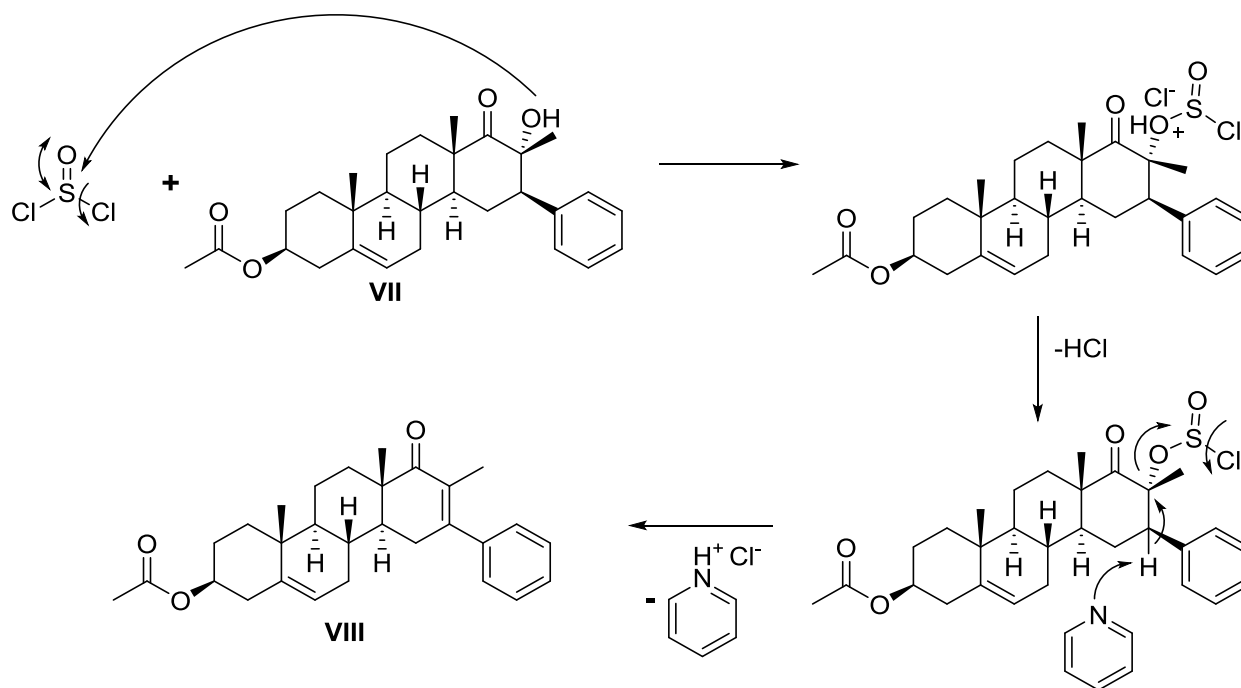
6.6. Acetilación del hidroxilo en C3

A continuación se realizó una acetilación en C3 del producto **VI** utilizando la misma metodología de la segunda etapa de la ruta sintética: anhídrido acético y piridina. Es importante mencionar que el alcohol en C17 no fue acetilado posiblemente por el alto impedimento estérico que presenta.

En el espectro de RMN ^1H (Figura A23) se observa la señal del protón en C3 desplazada de 3.58 ppm a 4.66 ppm, además de que en 2.0 ppm se encuentra el metilo en C2' como un singulete. En el espectro de RMN ^{13}C (Figura A24) se observa la señal del carbonilo C1' en 170.4 ppm, y del metilo de C2' en 23.9 ppm. En el espectro de IR (Figura A25) se observa la banda asociada al carbono carbonílico C1' en 1727 cm^{-1} , característica de ésteres, además de que desaparece la banda del alcohol en C3. Finalmente, en el EM (Figura A26) se logró identificar la señal asociada al ion $[\text{M} + \text{H}]^+$, confirmándose así la estructura propuesta para **VII** (acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo).

6.7. Deshidratación del OH-C17 para generar el sistema carbonílico α,β -insaturado en el anillo D

La deshidratación del hidroxilo en C17, para el producto **VII**, se llevó a cabo con SOCl_2 en condiciones anhidras. Esta reacción permitió generar el sistema carbonílico α,β -insaturado en **VIII**, y que es un requerimiento estructural necesario para la inhibición de la enzima 5α -reductasa. En esta reacción se adicionó piridina con la finalidad de atrapar los protones generados en el medio de reacción y neutralizar especies ácidas generadas *in-situ*. La adición de SOCl_2 se realizó lentamente y en baño de hielo para prevenir la obtención de productos secundarios. El mecanismo se presenta en el esquema 15:



Esquema 15. Mecanismo de reacción de la deshidratación del acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo (VII).

Como ya se mencionó, el producto **VIII** (acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo) contiene un sistema carbonílico α,β -insaturado en el anillo D, considerándose así un producto final de la ruta sintética, y candidato para ser evaluado en los ensayos *in-vitro* correspondientes.

Por tratarse de un producto novedoso, a continuación se describe con detalle sus constantes espectroscópicas y espectrométricas:

Acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (VIII): (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.35-7.23 (m, 3H, H2'', H4'' y H6''); 7.11 (ddd, J = 4.3, 3.7, 1.9 Hz, 2H, H3'' y H5''); 5.30 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H6); 4.61-4.47 (m, 1H, H3); 2.60 – 2.46 (m, 1H); 2.24 (td, J = 11.0, 4.7 Hz, 3H); 2.13 – 2.00 (m, 2H); 1.96 (d, J = 3.0 Hz, 3H, 2''); 1.91 – 1.74 (m, 2H); 1.63 (s, 3H, CH₃-17b); 1.43 – 1.30 (m, 2H); 1.03 (s, 3H, CH₃-18); 0.96 (s, 3H, CH₃-19). **RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 205.5, C17a; 170.6, C1'; 153.7, C16; 141.4, C1''; 139.6, C5; 129.4, C17; 128.5, C3'' y C5''; 127.8, C4''; 127.2, C2'' y C6''; 121.8, C6; 73.8, C3; 48.8, C9; 46.6, C13; 43.3, C14; 37.9, C4; 36.8, C1; 36.6, C10; 33.9, C12; 32.1, C7; 31.1, C2; 27.7, C15; 21.5, C2'; 20.1, C11; 19.4, C19; 15.8, C18; 13.4, C17b.**

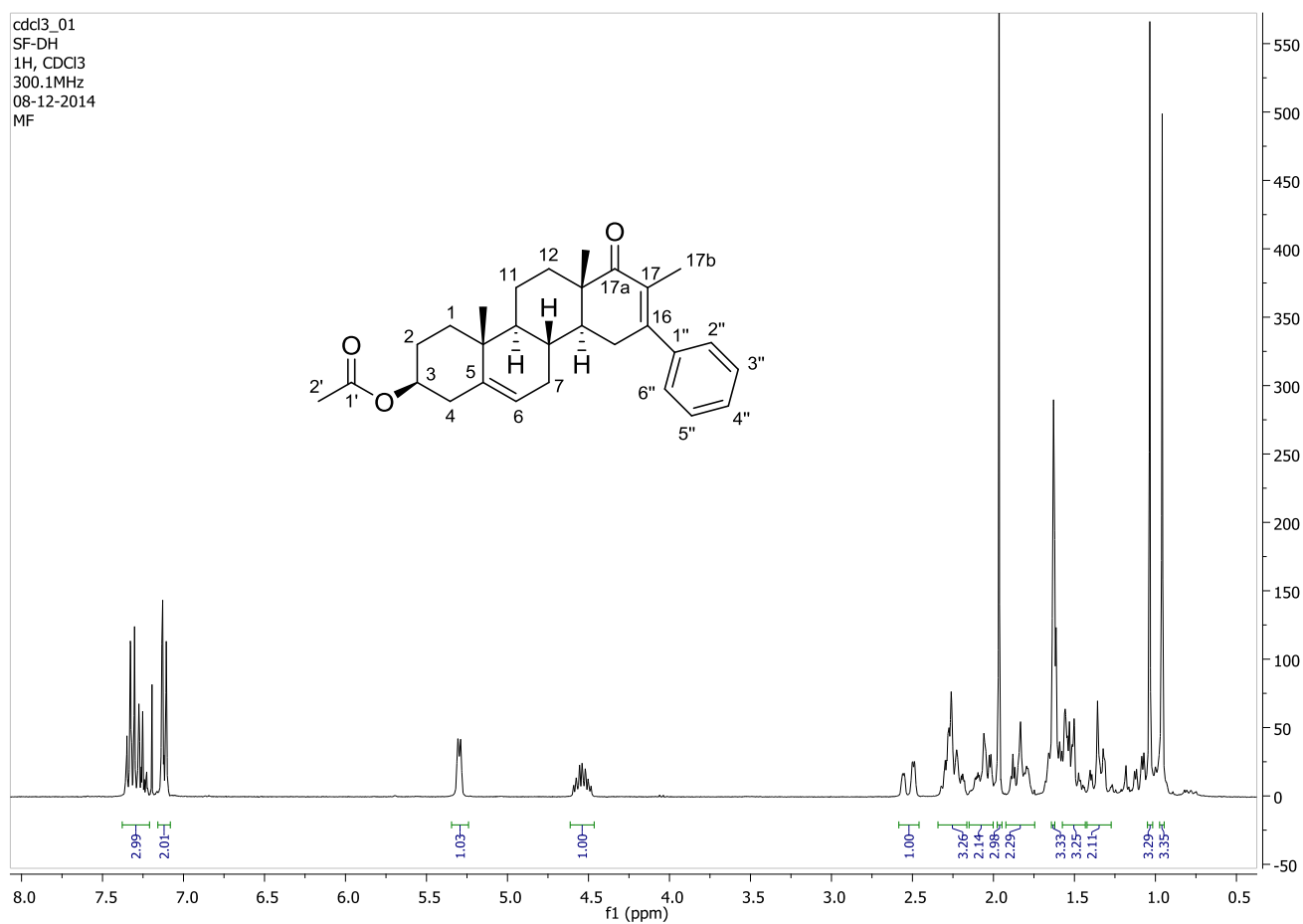


Figura 11. Espectro RMN ¹H del acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (VIII).

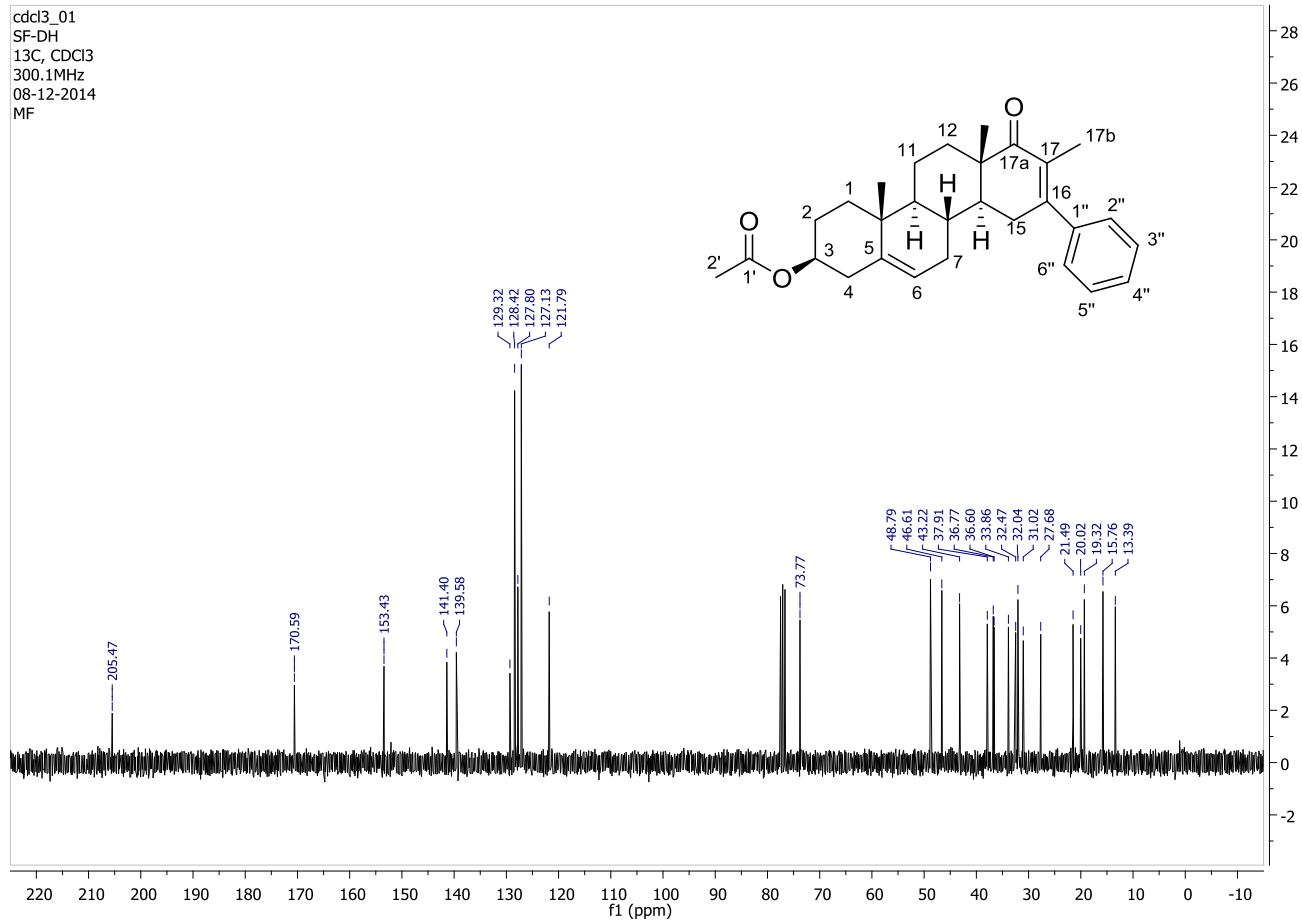


Figura 12. Espectro RMN ^{13}C del acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (**VIII**).

En el espectro de RMN ^1H (Figura 11) se puede observar la pérdida de las señales del OH-17 (4.28 ppm) y el H-16 (3.01 ppm) debidas a la formación del sistema α,β -insaturado en **VIII**. Por otra parte, en el espectro de RMN ^{13}C (Figura 12) se observa que las señales asociadas a C17 y C17 en el producto **VII**, se desplaza a campos más bajos (153.4 y 129.3 ppm respectivamente) debido a la formación de la insaturación. En los espectros de IR se observó claramente la pérdida de la banda atribuida al alcohol en C17 (3549 cm^{-1}) en **VIII** (Figura A27). En los espectros de UV (Figuras 13 y 14) se observa un cambio en la longitud de onda máxima de absorción de **VII** y **VIII**. Mientras que para **VII** se observan varios entre 240 y 265 nm, en **VIII**, la curva de absorción se centra en un máximo de 265 nm, debido a la conjugación extendida que se genera entre el sistema α,β -insaturado y el anillo aromático.

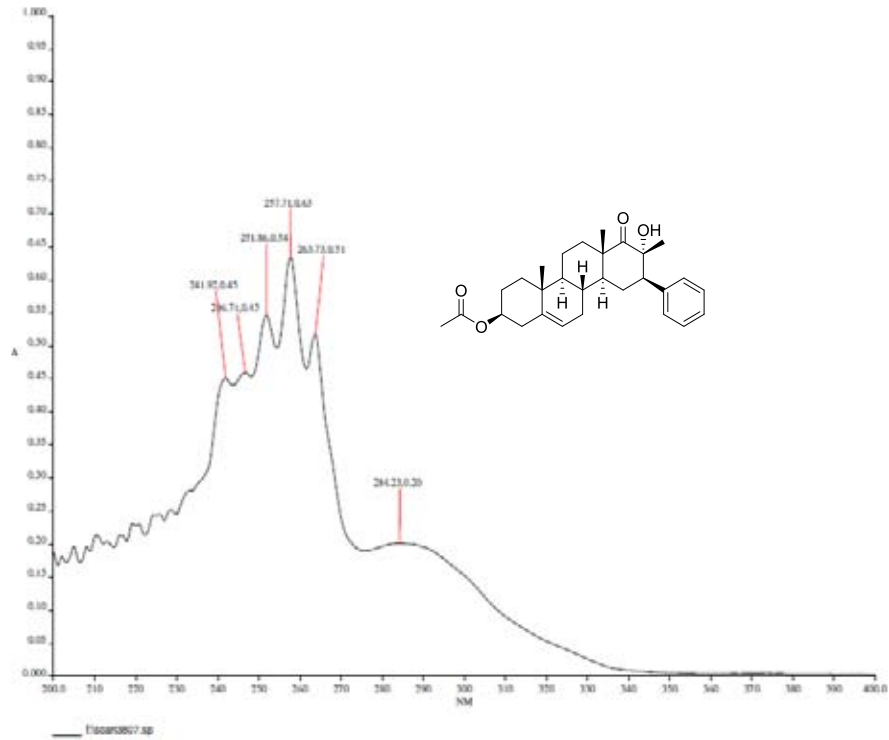


Figura 13. Espectro de UV del acetato de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3β-ilo(VII).

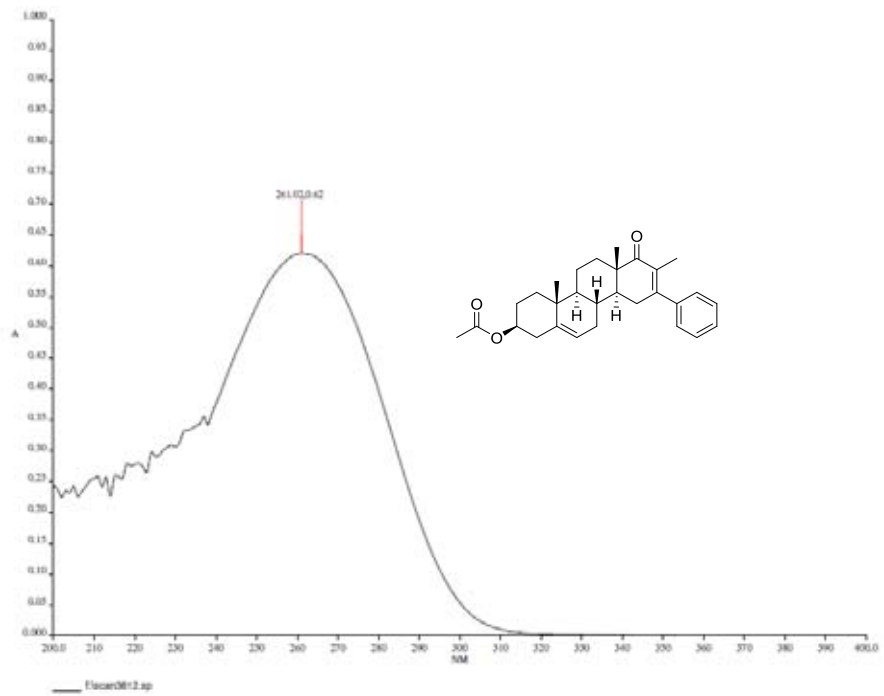
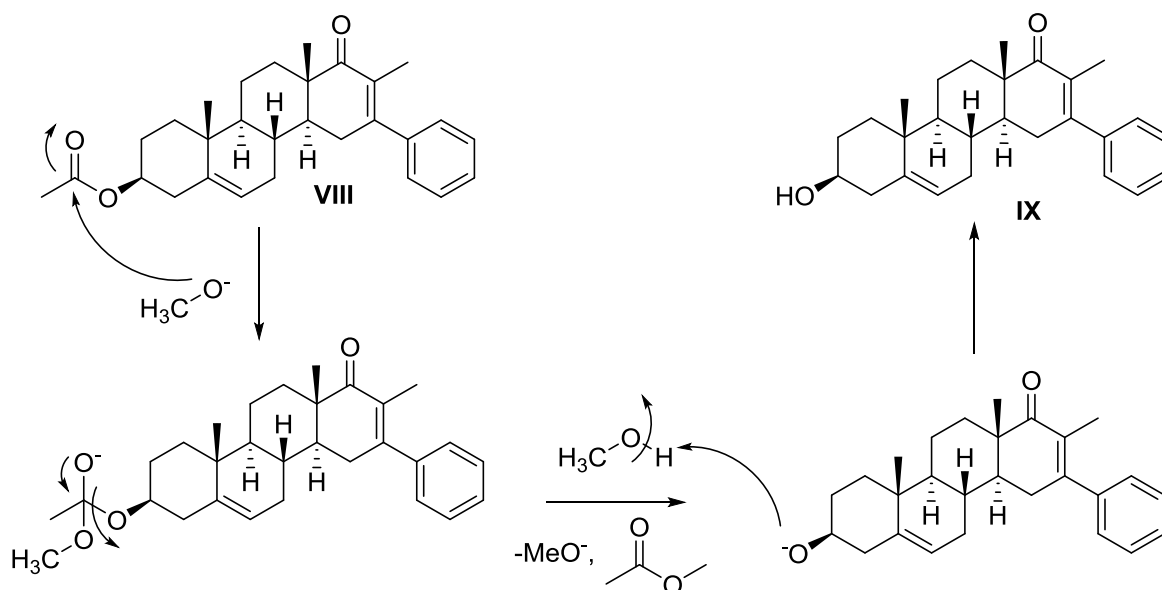


Figura 14. Espectro UV de acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (VIII).

Finalmente, en EM (Figura A28) se observa claramente el ion molecular $[M + H]^+$ m/z 391.4, además del fragmento correspondiente a la pérdida del OH-C3 (m/z 373.4 $[M - H_2O]^+$).

6.8. Hidrólisis del éster acético en C3

La eliminación del éster en C3 del producto **VIII** se realizó efectuó en medio básico, (KOH en MeOH 10%) (Esquema 16).



Esquema 16. Mecanismo de reacción, hidrólisis de éster en C3 del acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (**VIII**).

En el espectro de RMN 1H (Figura 15) del producto de hidrólisis (**IX**), se observa la pérdida del metilo del acetato en 1.64 ppm, además de que el protón en C3 se desplaza a campos más altos (3.54 ppm) en el alcohol libre. En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 16) se observa la pérdida de las señales atribuidas al carbono carbonílico del éster (C1') y al correspondiente metilo en 153.4 y 21.5 ppm, respectivamente. En el EM (Figura A29) se logró identificar el ion molecular $[M + H]^+$ que corresponde con la estructura propuesta **IX**. Finalmente, en el espectro de IR (Figura A30) se observa la pérdida de la banda asociada al carbonilo de éster de C3 en 1724.8 cm^{-1} y la aparición de la banda del alcohol en 3406 cm^{-1} .

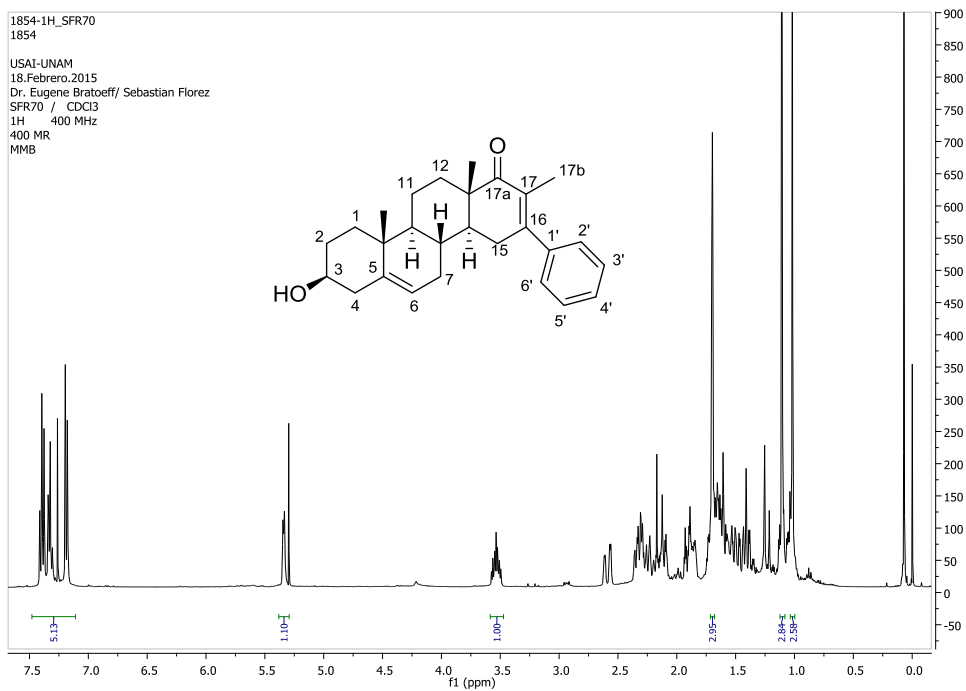


Figura 15. Espectro RMN ^1H de la 16-fenil- β -3-hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).

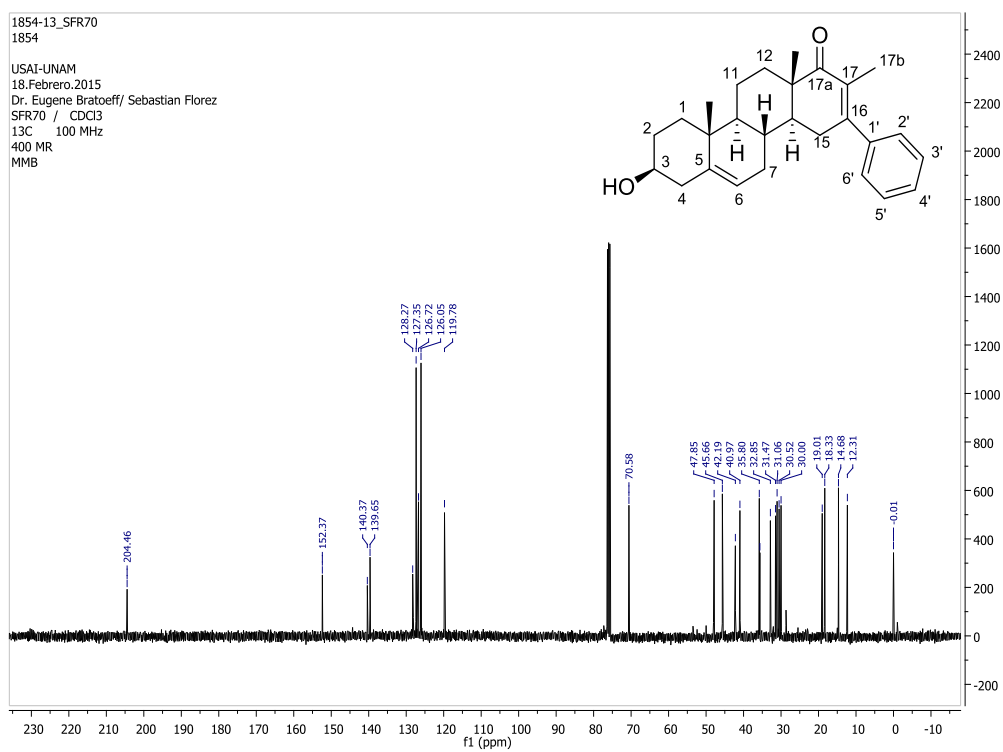


Figura 16. Espectro RMN ^{13}C de la 16-fenil- β -3-hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).

Adicionalmente, para este producto se registraron sus espectros bidimensionales de COSY, HSQC y NOESY (Figuras 17 – 19). De estos se lograron identificar las correlaciones que se ilustran en la figura 19:

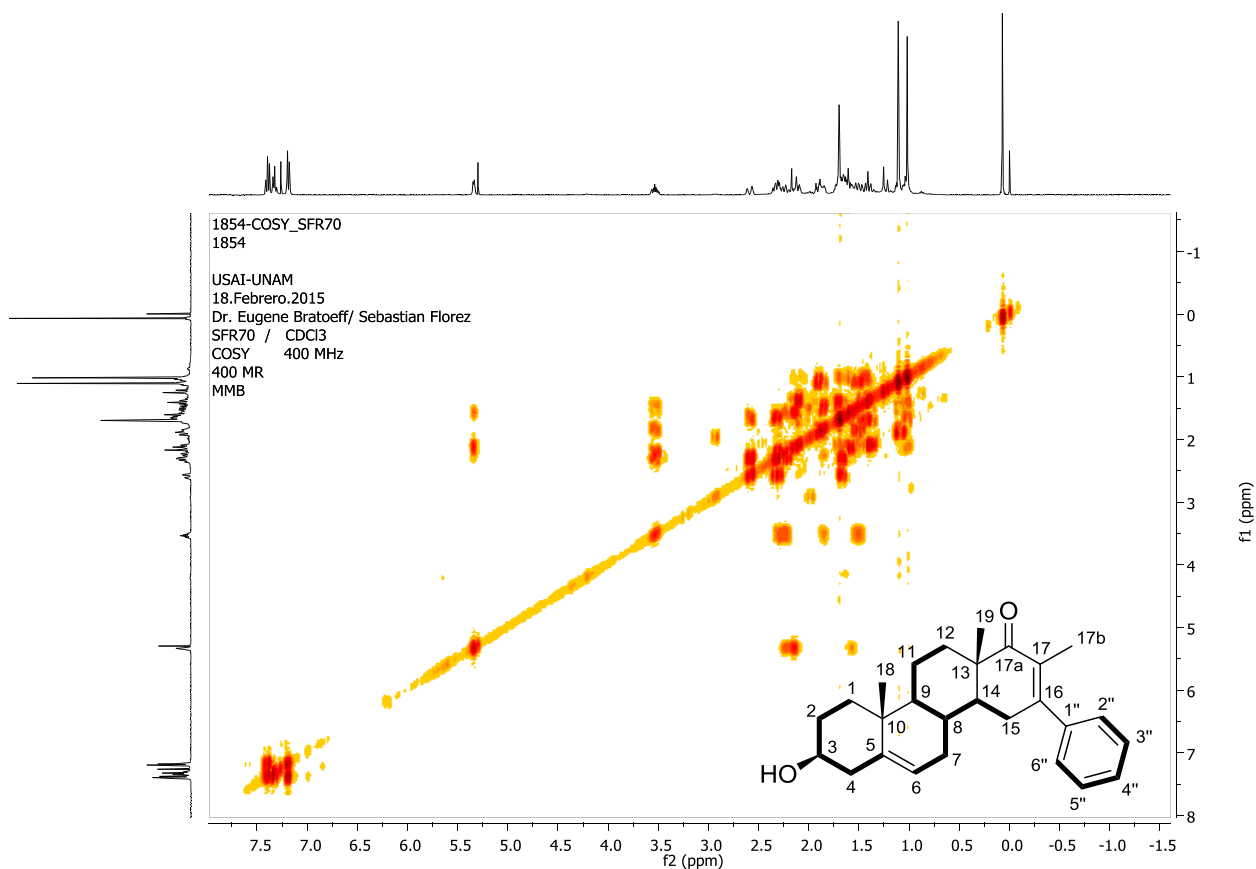


Figura 17. Espectro COSY de 16-fenil-3β-hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).

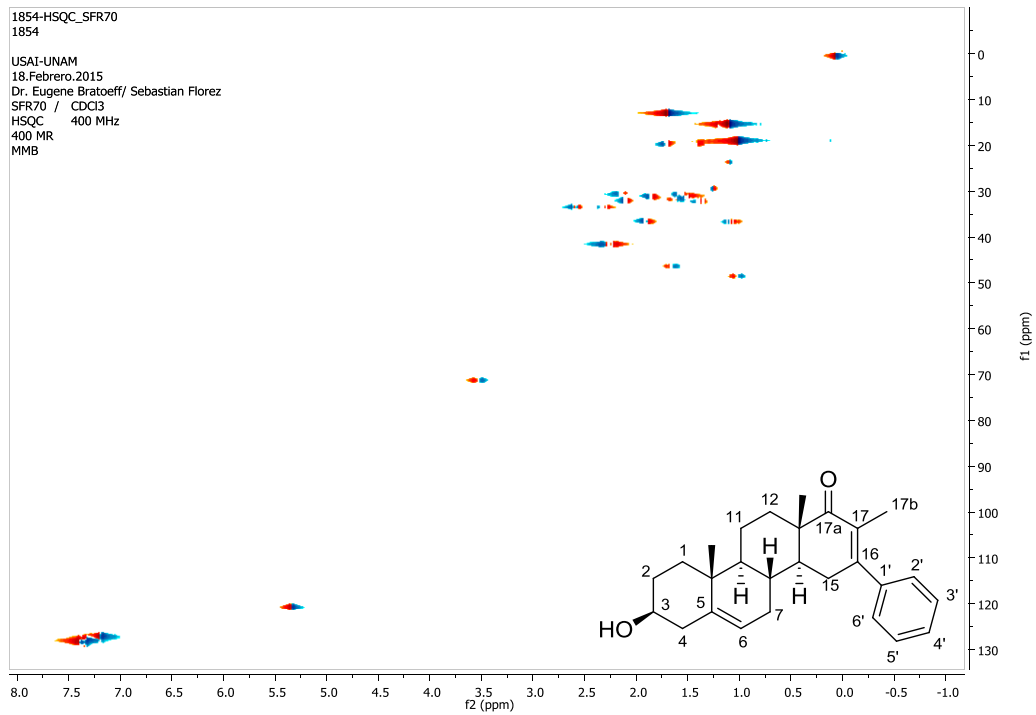


Figura 18. Espectro HSQC de 16-fenil-3β-hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).

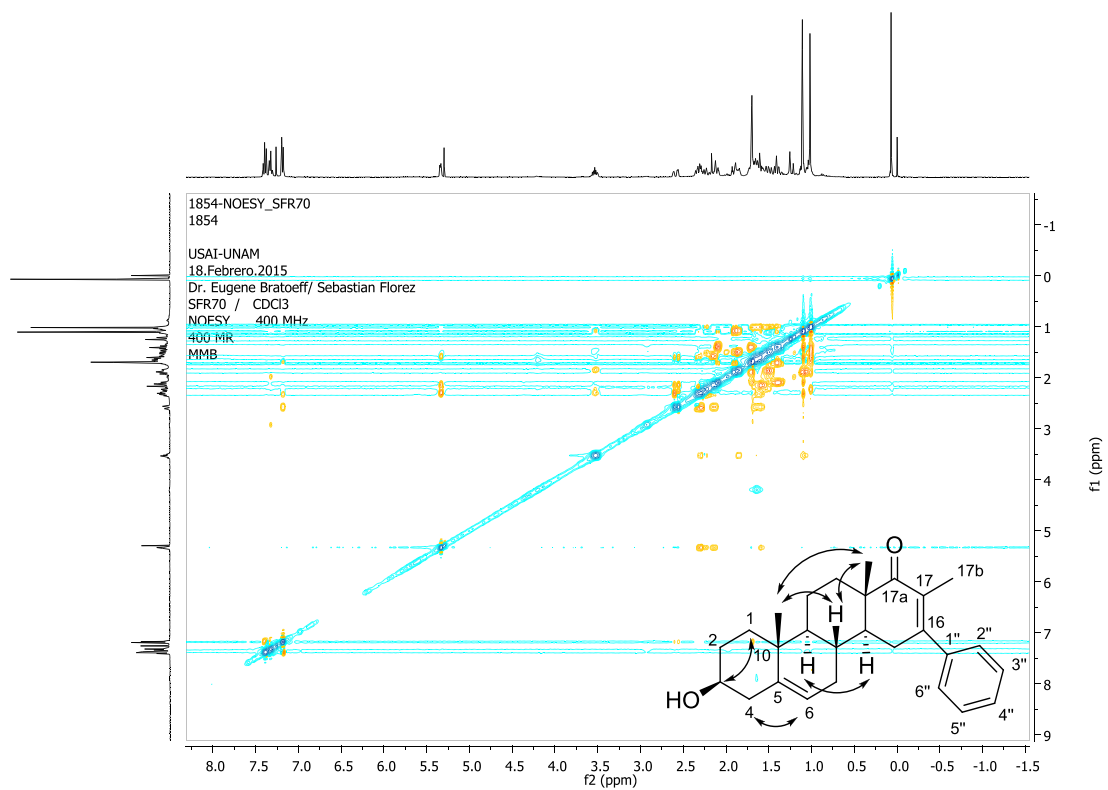
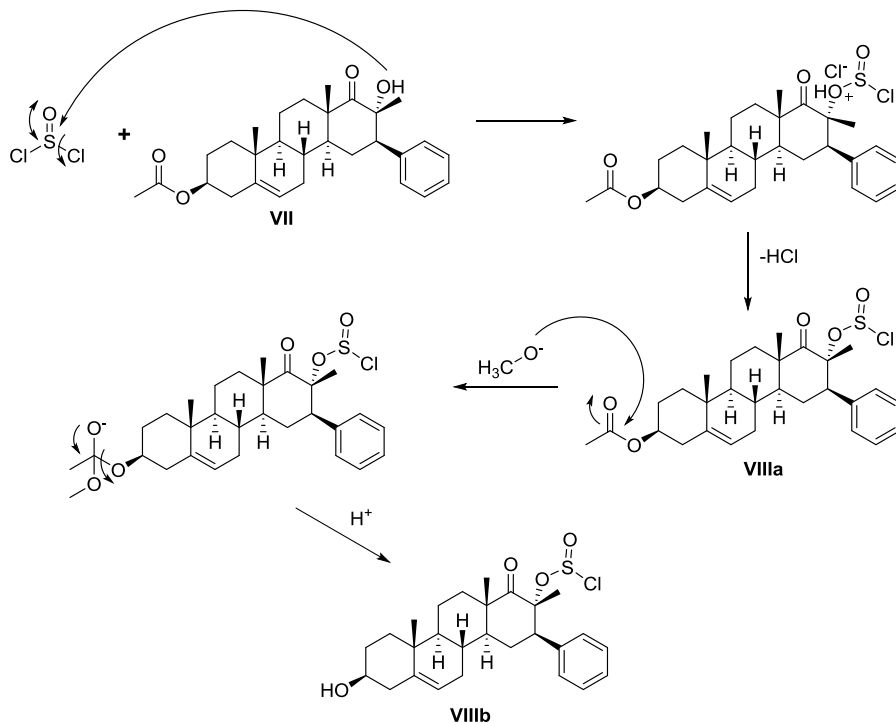


Figura 19. Espectro NOESY de 16-fenil-3β-hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).

6.9. Productos secundarios en la reacción de deshidratación del acetato de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3β-ilo (VII)

En el mecanismo presentado anteriormente para la reacción de deshidratación del producto VII, se puede observar que la reacción se lleva a cabo en dos etapas: la primera es el ataque nucleofílico por parte del alcohol en C17 sobre el azufre del cloruro de tionilo, produciendo el derivado clorosulfínico. Posteriormente, la piridina elimina el protón en C16 y se induce la generación de la insaturación entre C16 y C17 a través de la eliminación del grupo clorosulfínico. Este reacción inicialmente se desarrolló con cantidades pequeñas de sustrato con la finalidad de definir las condiciones óptimas de reacción (En esta reacción se obtuvo un solo producto principal con un rendimiento del 62%). Sin embargo, durante el escalamiento de la reacción [1g de VII] y a pesar de utilizar las mismas condiciones de reacción, se obtuvo otro producto distinto al esperado en un 85%. Este producto no fue caracterizado inicialmente y fue sometido a la hidrólisis del éster acético en C3, obteniendo en muy baja proporción el producto esperado, y como producto mayoritario otro compuesto desconocido. Este producto mayoritario final fue tentativamente caracterizado como el derivado clorosulfínico de la 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VIIIb) (Figuras 20-26). A continuación se ilustra por la propuesta mecanística por la cual se obtuvo este producto:



Esquema 17. Deshidratación del acetato de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3β-ilo (VII) e hidrólisis del VIIIa para la obtención del derivado clorosulfínico del 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VIIIb).

Derivado clorosulfínico del 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb): C₂₇H₃₅ClO₄S, PM: 490.19 g/mol; **EM-ES *m/z*:** 491.427 [M + H]⁺, 391.405 [M – SO₂Cl]⁺; **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.49 – 7.12 (m, 5H, H-aromáticos), 5.38 – 5.23 (m, 1H, H6), 3.61 – 3.44 (m, 1H, H3), 3.02 – 2.86 (m, 1H, H16), 2.31 – 2.00 (m, 3H), 2.00 – 1.71 (m, 5H), 1.71 – 1.34 (m, 8H), 1.20 (s, 3H, H17b), 1.10 (s, 3H, H18), 1.06 – 1.04 (s, 3H, H19). **RMN ¹³C** (101 MHz, CDCl₃) δ 217.15, C17b; 139.60, C5; 138.73, C1'; 128.10, C3' y C5'; 126.87, C2' y C6'; 125.83, C4'; 119.85, C6; 77.23, C17; 70.48, C3; 53.49, C16; 49.99, C9; 48.03, C14; 46.05, C13; 40.92, C4; 35.81, C10; 35.77, C1; 32.05, C12; 30.72, C2; 30.50, C7; 30.00, C8; 25.48, C15; 22.96, C11; 18.46, C17b; 18.35, C18; 14.99, C19. **IR [cm⁻¹]** 3482.37, HO-C3; 3085.60, R₂C=C-H; 3030.62, Ar-H; 2998.15-2838.59, R₂CH₂, R₃CH; 1688.95, C=O; 1603.46, 1583.54, Ar-H; 1496.21-1438.11, C=C; 1380.42, R₃CH, -CH₃; 774.05, Ar.

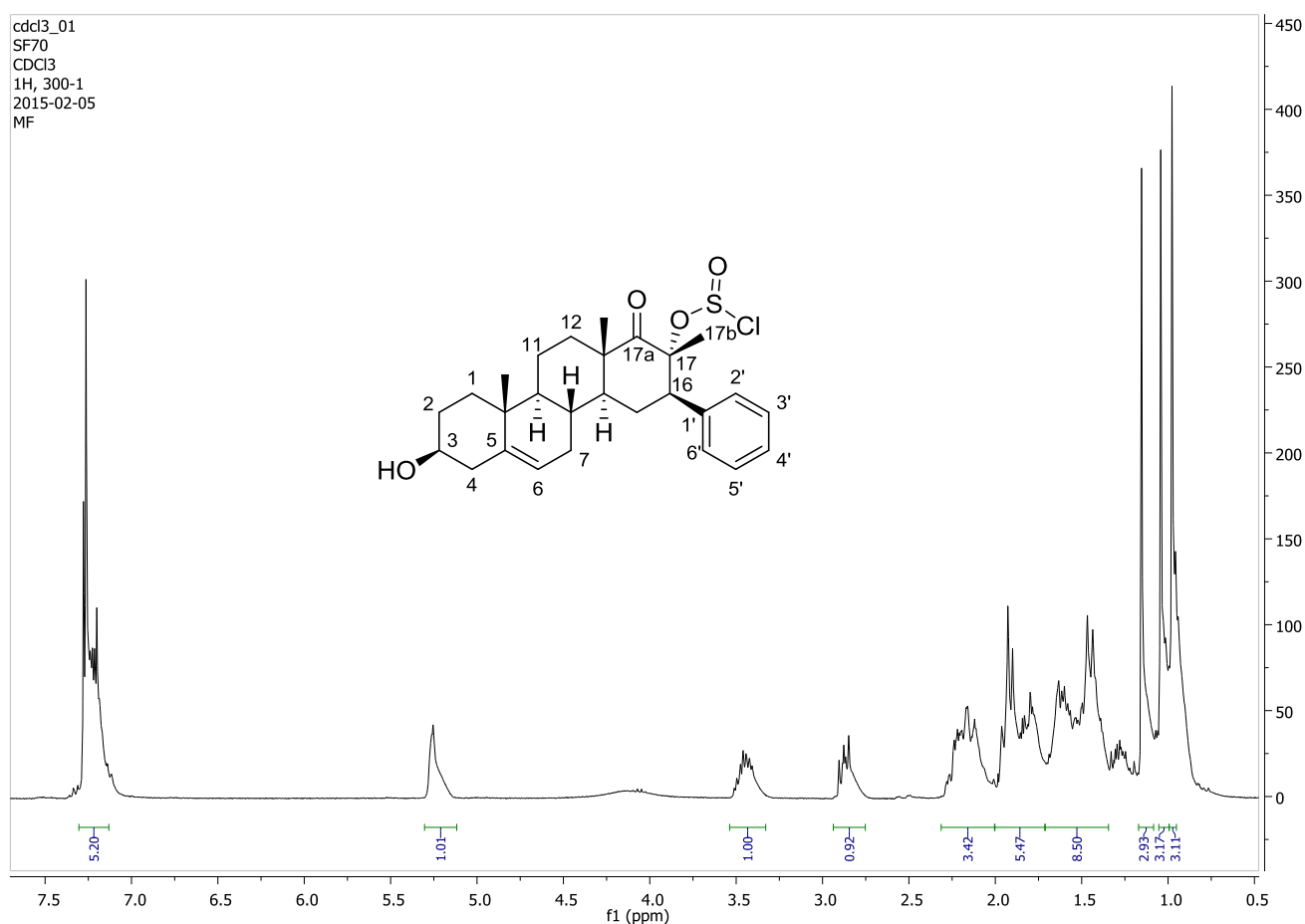


Figura 20. Espectro de RMN ¹H del derivado clorosulfínico del 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).

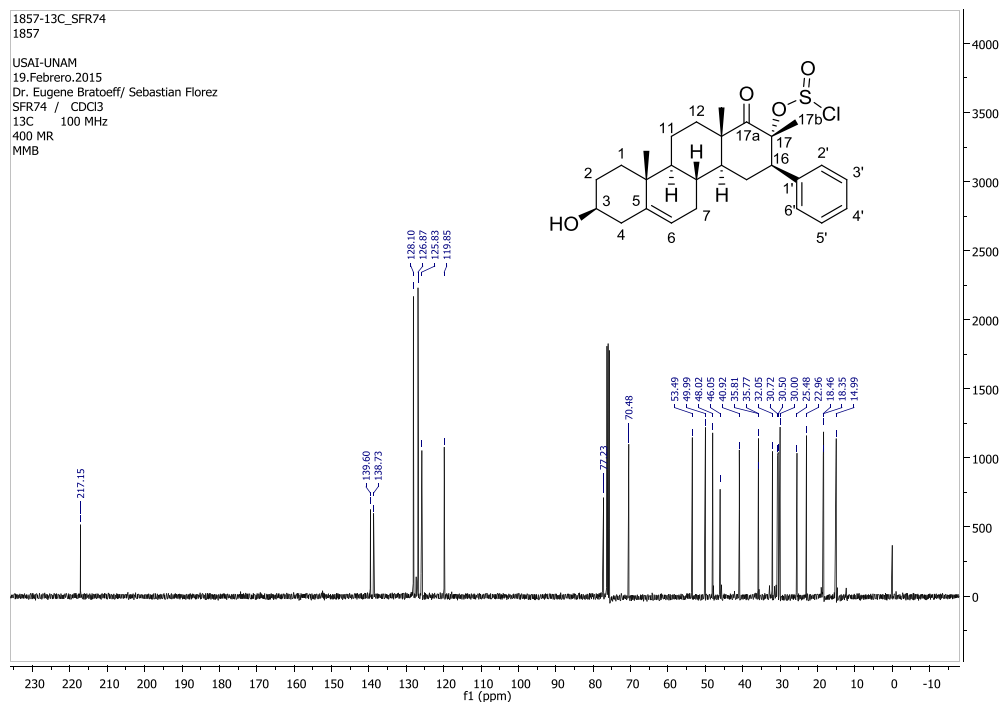


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C del derivado clorosulfínico del 16 β -fenil-17 β -metil-17 α -oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).

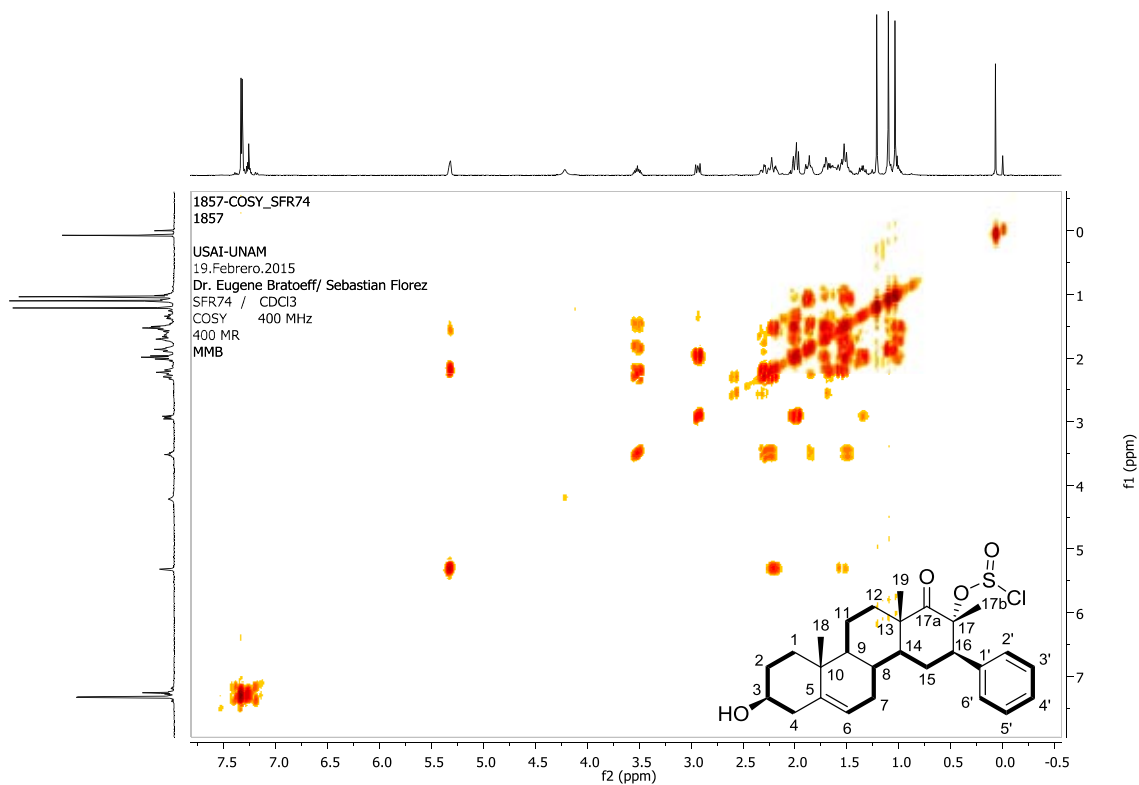


Figura 22. Espectro de COSY del derivado clorosulfínico 16 β -fenil-17 β -metil-17 α -oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).

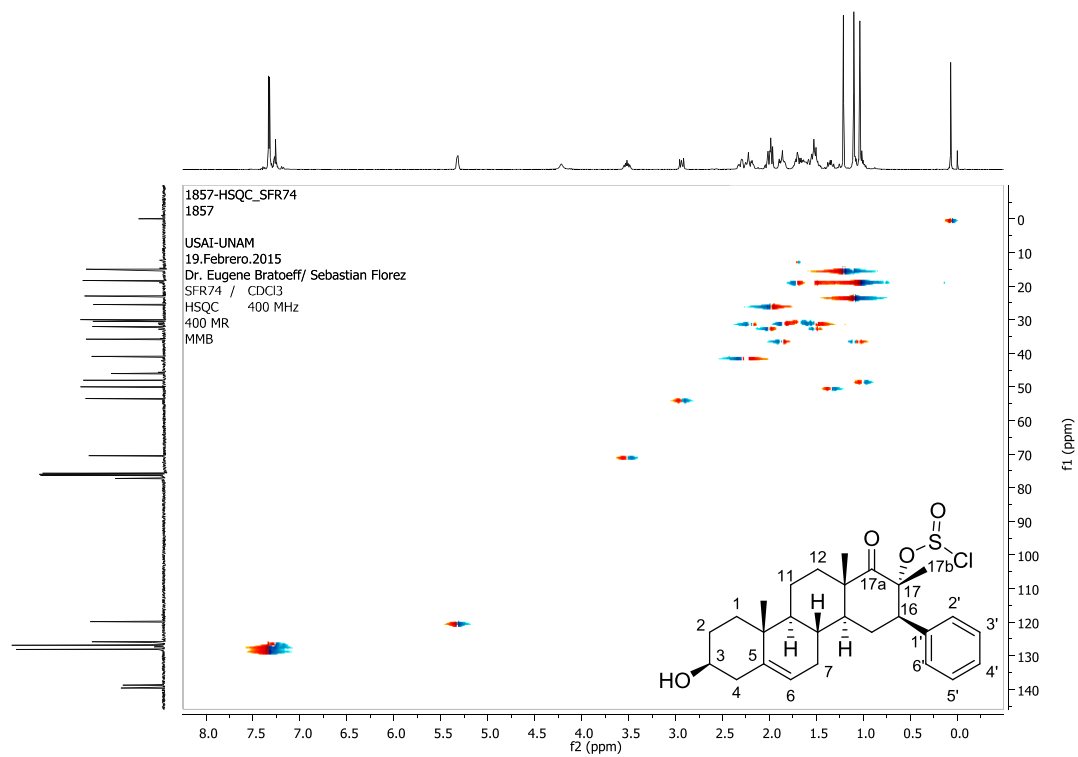


Figura 23. Espectro de HSQC del derivado clorosulfínico 16 β -fenil-17 β -metil-17 α -oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).

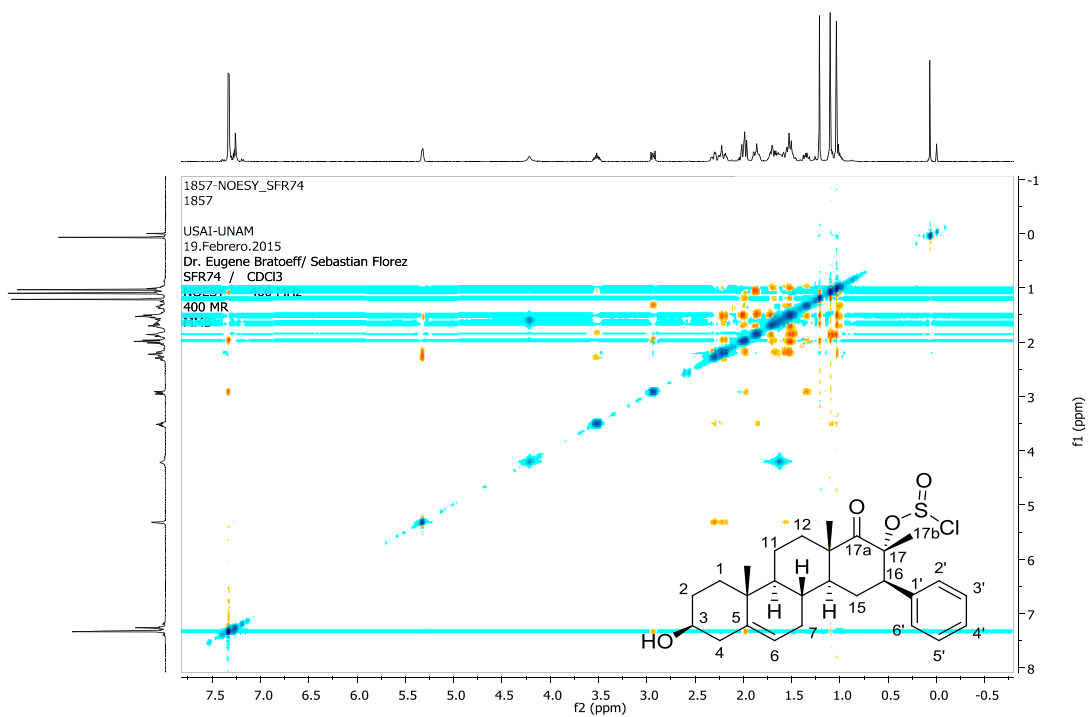


Figura 24. Espectro de NOESY del derivado clorosulfínico 16 β -fenil-17 β -metil-17 α -oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).

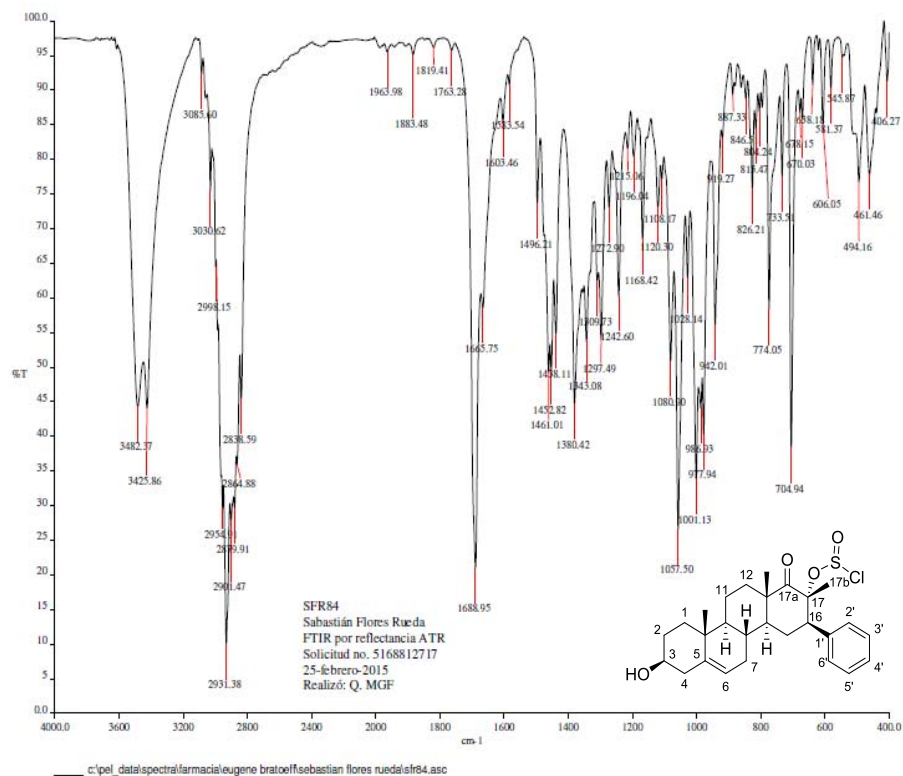


Figura 25. Espectro de IR del derivado clorosulfínico del 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VIIIb).

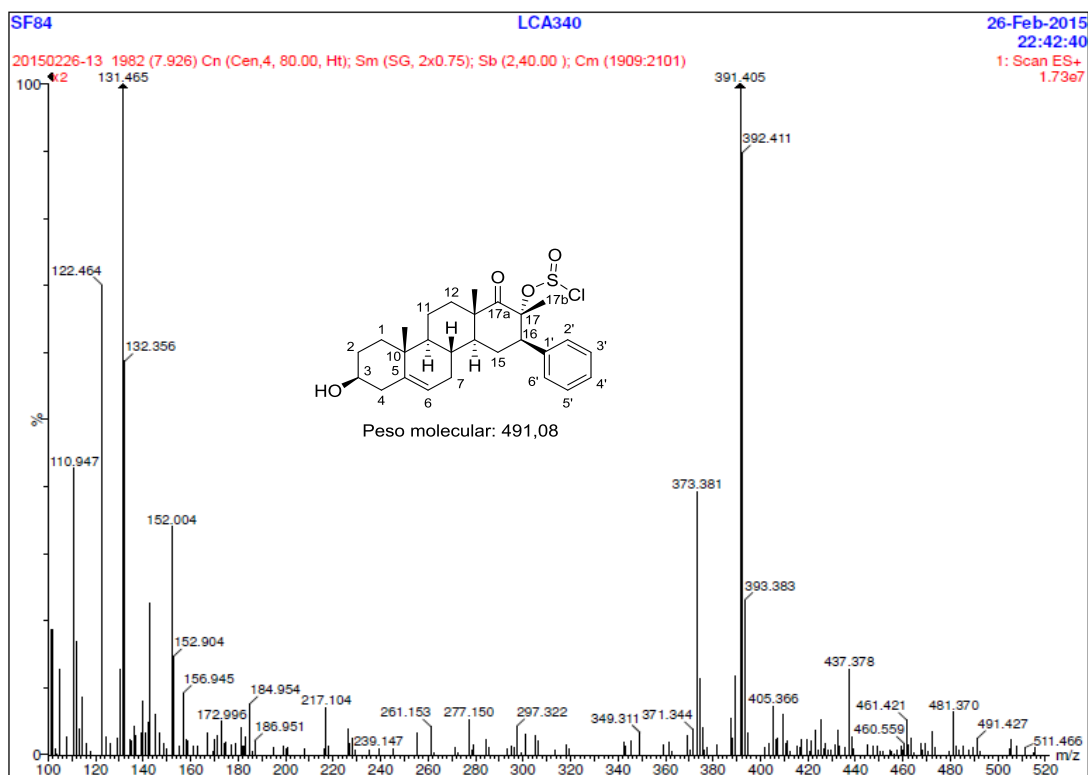


Figura 26. Espectro de masas de derivado clorosulfínico 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VIIIb).

Como puede evidenciarse en el espectro de RMN ^1H de VIIIb, la señal correspondiente al OH-17 presente en la materia prima (δ 4.18 ppm) desaparece. El espectro resultante es similar al obtenido para VII (Figura xx). Adicionalmente, en el espectro de masas del producto VIIIb, se puede observar el ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ correspondiente con el peso molecular propuesto para este producto (m/z 491.4).

Una segunda evidencia experimental de que el producto VIIIb es diferente a VI puede evidenciarse por CCF ya que ambos compuestos presentaron unos factores de retención distintos (Figura 27). En los extremos de la placa se utilizó la referencia de VI, mientras que las distintas fracciones obtenidas por la purificación de IX por CCA se monitorearon en el resto de la placa cromatográfica en orden creciente de elución.

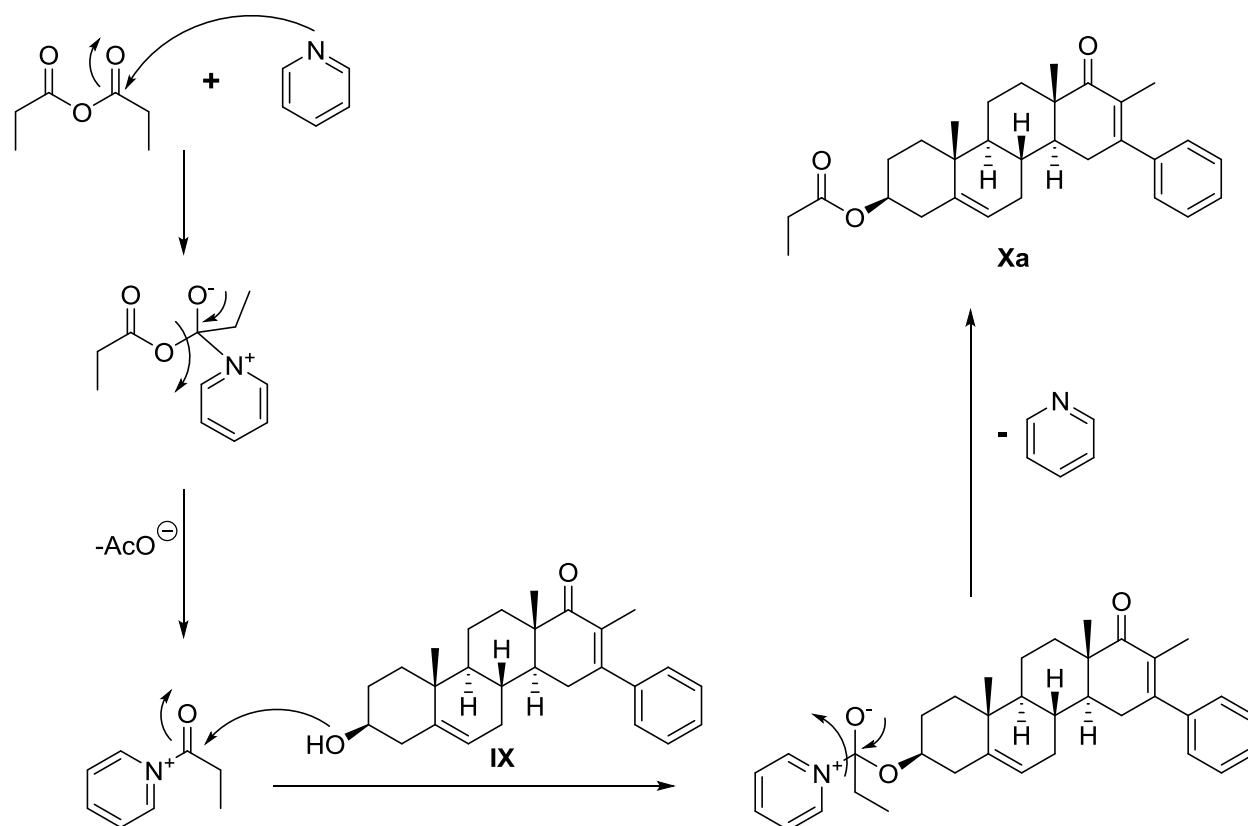


Figura 27. Seguimiento de una purificación por columna de la 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX) donde se evidencia la presencia del derivado clorosulfínico 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (VIIIb).

6.10. Derivatización en el hidroxilo de la posición C3, generación de ésteres lineales

Finalmente, se realizó la esterificación de hidroxilo en C3 de la 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX) siguiendo la misma metodología previamente descrita para la acetilación del compuesto II (16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-pregna-5-en-20-ona) pero con los correspondientes anhídridos propiónico, para obtener **Xa** (Propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo) y anhídrido butírico para obtener **Xb** (Propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo).

El mecanismo de reacción para la formación del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (**Xa**) se ilustra en el esquema 18:



Esquema 18. Mecanismo de reacción, formación del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (Xa).

En los espectros de RMN ^1H , se puede observar que en ambos ésteres el protón asociado a C3 se desplaza a campos más bajos (4.62 ppm) confirmando la esterificación del hidroxilo en esta posición. Adicionalmente, en los espectros de RMN ^{13}C se observan las señales características del carbonilo, y los metilos y metilenos de ambos ésteres en 173.9, C1'; 27.9, C2'; 9.15, C3' para el éster propiónico, y 172.14, C1'; 35.5, C2'; 17.52, C3'; 12.61, C4' para el éster butírico.

6.11. Determinación de la actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de próstata PC3

La determinación de la actividad citotóxica sobre la línea celular PC3 para los compuestos VI-IX, Xa, Xb, y VIIIb, se realizó en el ensayo de citotoxicidad SRB y siguiendo la metodología descrita en la parte experimental. Los resultados de esta evaluación se ilustran en la tabla 1.

El compuesto más activo fue la 16-fenil-3β-hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX). Esta molécula posee el sistema carbonílico α,β -insaturado en el anillo D, y el alcohol libre en C3. Cuando

comparamos la actividad de ésta molécula con su equivalente pero sin el sistema carbonílico α,β -insaturado (**VI**), se observa que la actividad se reduce a un 63.9%.

Muestra, código	Porcentaje de inhibición de crecimiento celular en PC-3
VI	63.92±7.4
VII	57.89±5.5*
VIII	73.57±8.9
IX	100*
Xa	26.70±3.4
Xb	16.06±2.3
VIIIa	95.99±4.0*

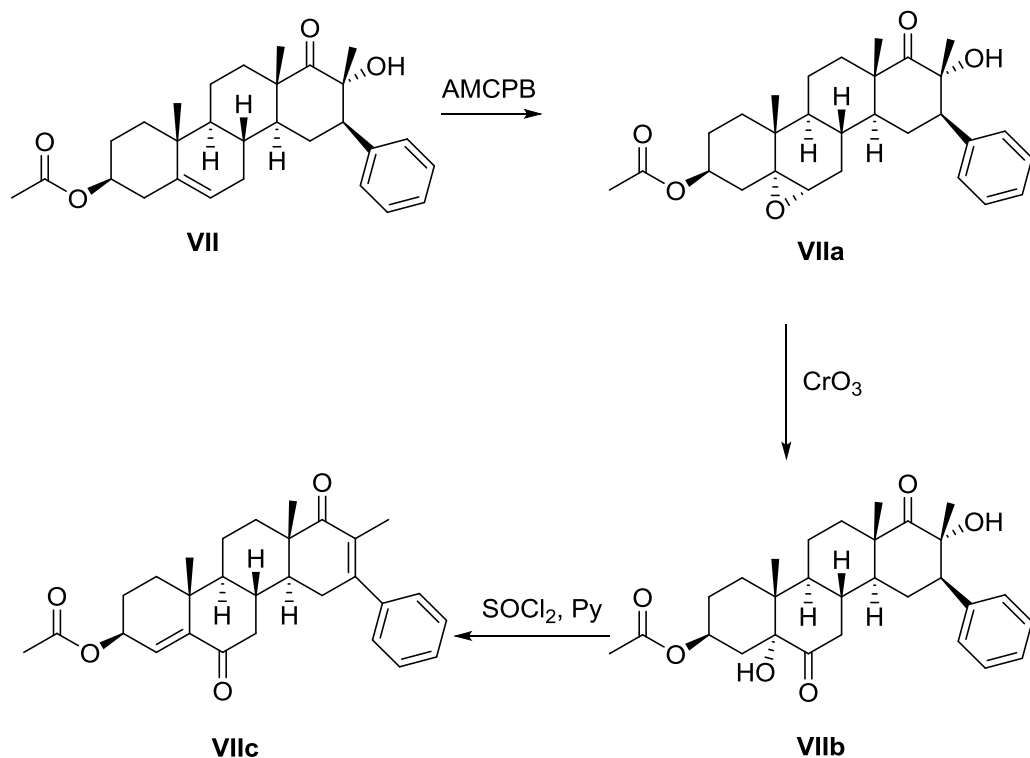
Tabla 1. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas, (Concentración: 50 μ M y 25 μ M*).

El segundo compuesto más activo fue el derivado clorosulfínico 16 β -fenil-17 β -metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3 β ,17 α -diol (**VIIIb**), el cuál inhibió el crecimiento celular en un 96% a 25 μ M. Cabe destacar que este producto no posee el sistema carbonílico α,β -insaturado en el anillo D, sin embargo, en C17 tiene el grupo hidroxilo unido a un fragmento clorosulfínico, que podría presentar una adición nucleofílica generando la actividad antiproliferativa, ya que un heteroátomo en el sitio activo de alguna enzima de alta importancia metabólica en las células cancerígenas, podría atacar el grupo clorosulfínico.

Por otra parte, los compuestos que presentaron la actividad inhibitoria más baja fueron el propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (**Xa**) y el butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (**Xb**) con un porcentaje de inhibición del 27% y 16%, respectivamente. Estos resultados confirman los resultados de otras investigaciones que se realizaron en el grupo de investigación en que se afirma que la presencia de un hidroxilo libre en C3 mejora la actividad biológica de los derivados, como se observa en el producto **IX**.

6.12. Ruta inicial propuesta

Antes de haberse realizado la ruta de 9 pasos anteriormente descrita se había trabajado sobre una ruta de 12 pasos que, además de generar un sistema carbonílico α,β -insaturado en el anillo D, proponía la obtención de otro sistema carbonílico α,β -insaturado en la posición 4 y 5 (4,5-en-6-ona). A continuación se presenta el esquema de síntesis de esta ruta propuesta:



Esquema 19. Ruta inicial, para la obtención del acetato de 16-fenil-17-metil-6,17a-dioxopregna-4,16-dien-3 β -ilo (VIIc).

El objetivo de esta estrategia era que a partir del acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo (**VII**) se realizará una epoxidación del doble enlace entre C5-C6, utilizando ácido m-cloroperoxibenzóico. Debido a que esta no es electrodeficiente, la metodología de epoxidación con H₂O₂ 30% no era viable. Posteriormente se utilizaría CrO₃ para abrir el epóxido y generar la función α -hidroxicarbonílica 4,5-en-6-ona, misma que sería deshidratada con SOCl₂ y piridina, de tal modo que las dos funciones α -hidroxicarbonílicas se redujeran y generaran los respectivos sistemas carbonílicos α,β -insaturados.

Sin embargo y como anteriormente ya demostramos, la reacción de deshidratación en el anillo D no es fácil de ejecutar, ya que el alcohol en C17, aunque si reacciona con el SOCl₂ y genera el intermediario clorosulfínico, presenta dificultad para que la piridina elimine el protón en C16 y complete la reacción. Adicionalmente, la apertura del epóxido en C5-C6 es difícil y genera rendimientos muy bajos.

Después de numerosos intentos para lograr la deshidratación de la función α -hidroxicarbonílica (5-hidroxi-6-ona) del anillo B siguiendo la metodología alterna antes descrita, se logró la obtención del compuesto **VIIc**. Aunque este producto no se obtuvo en forma pura, a continuación se presentan sus espectro de RMN (Figuras 28 y 29) y de los cuales podemos deducir lo siguiente:

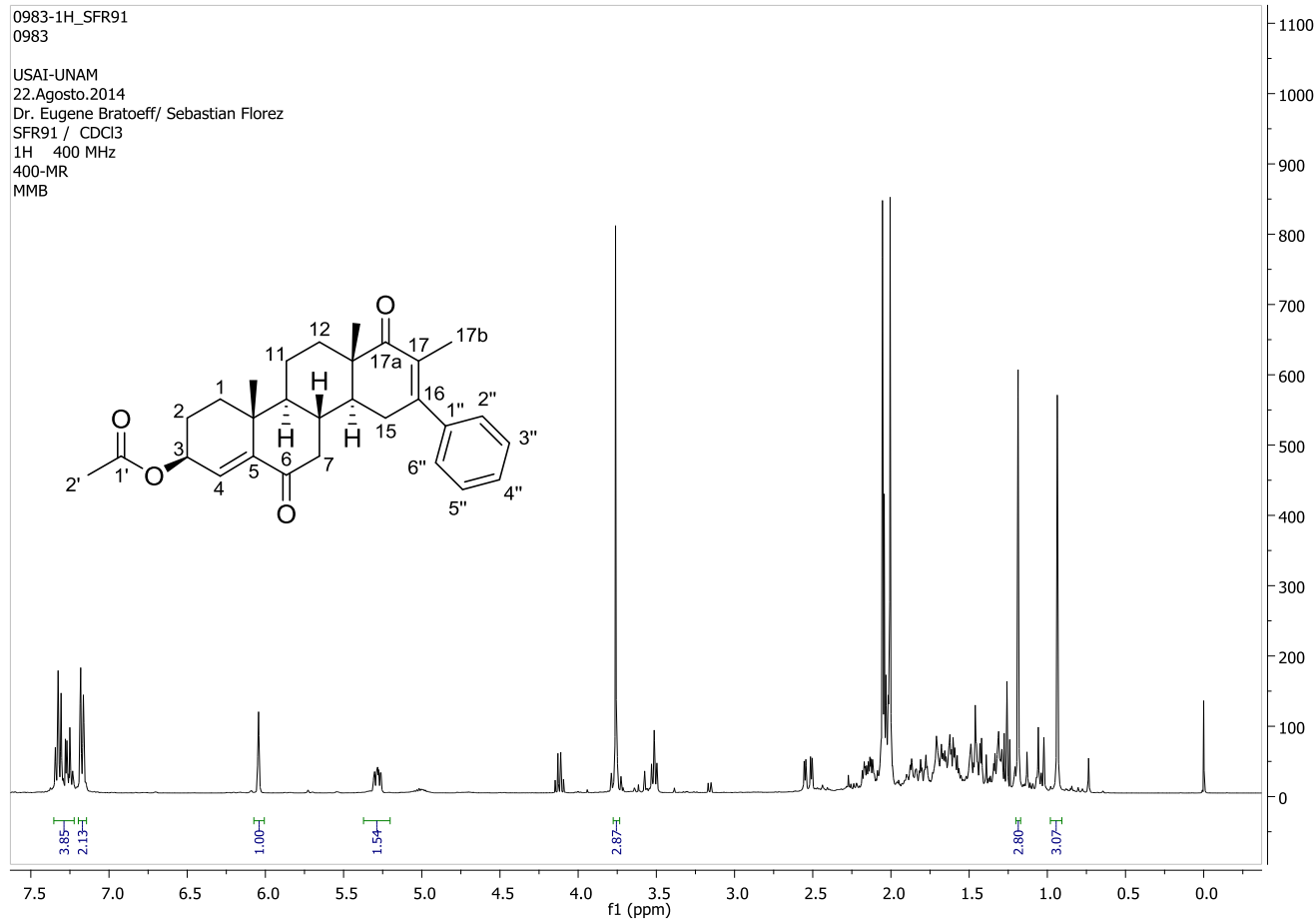


Figura 28. Espectro RMN ^1H de la del acetato de 16-fenil-17-metil-6,17a-dioxopregna-4,16-dien-3 β -ilo (VIIc).

El espectro de RMN ^1H de **VIIc** (Figura 28) se observa una señal característica de un protón vinílico en C4 (6.4 ppm) del sistema carbonílico α,β -insaturado. Cabe destacar que debido al ángulo diedro que presenta este protón con el de C3, no observa un acoplamiento característico para un protón vecinal. Adicionalmente, el protón en C3 se desplaza a campos bajos (5.30 ppm), en contraste con el mismo protón en C3 de un derivado esterificado (aprox. 4.0 ppm) o con un hidroxilo libre (aprox. 3.0 ppm). En el espectro de RMN ^{13}C se observan claramente las dos señales atribuibles a los carbonilos de los sistemas α,β -insaturados (207.3 y 201.0 ppm). Finalmente, en el espectro de HSQC se observa la correlación entre el protón en C4 (6.4 ppm) y su correspondiente carbono en 127.6 ppm.

Con base en las evidencias antes descritas, pudimos confirmar la formación del producto VIIc. Además de probar que la deshidratación del anillo B es factible.

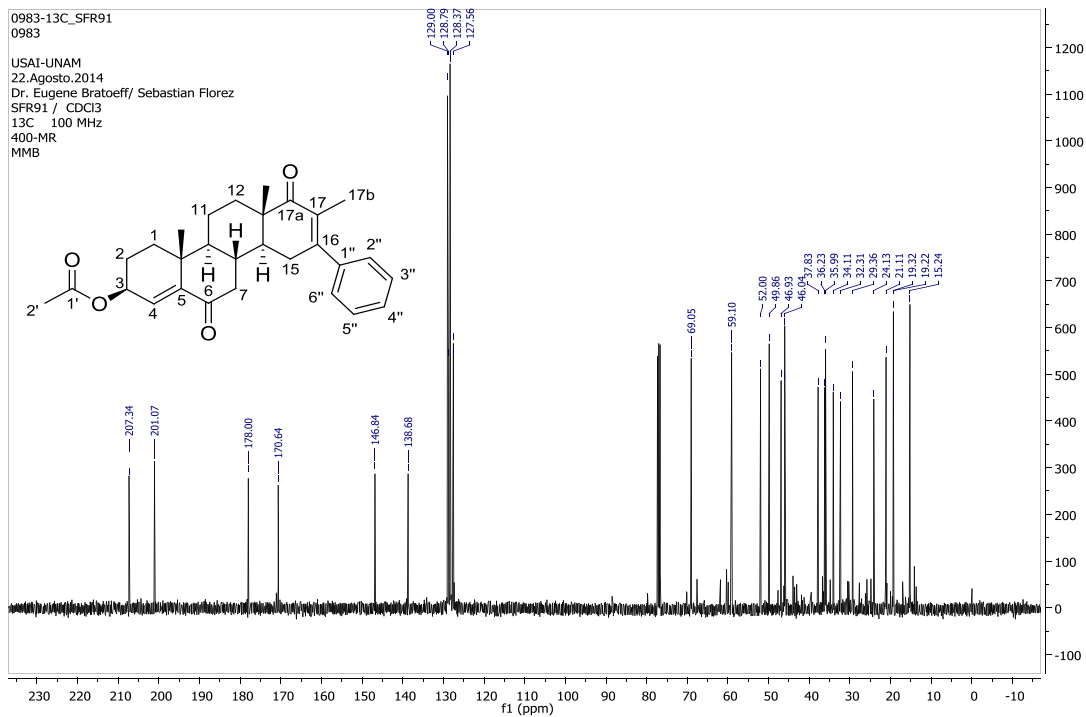


Figura 29. Espectro RMN ¹³C del acetato de 16-fenil-17-metil-6,17a-dioxopregna-4,16-dien-3β-ilo (VIIc).

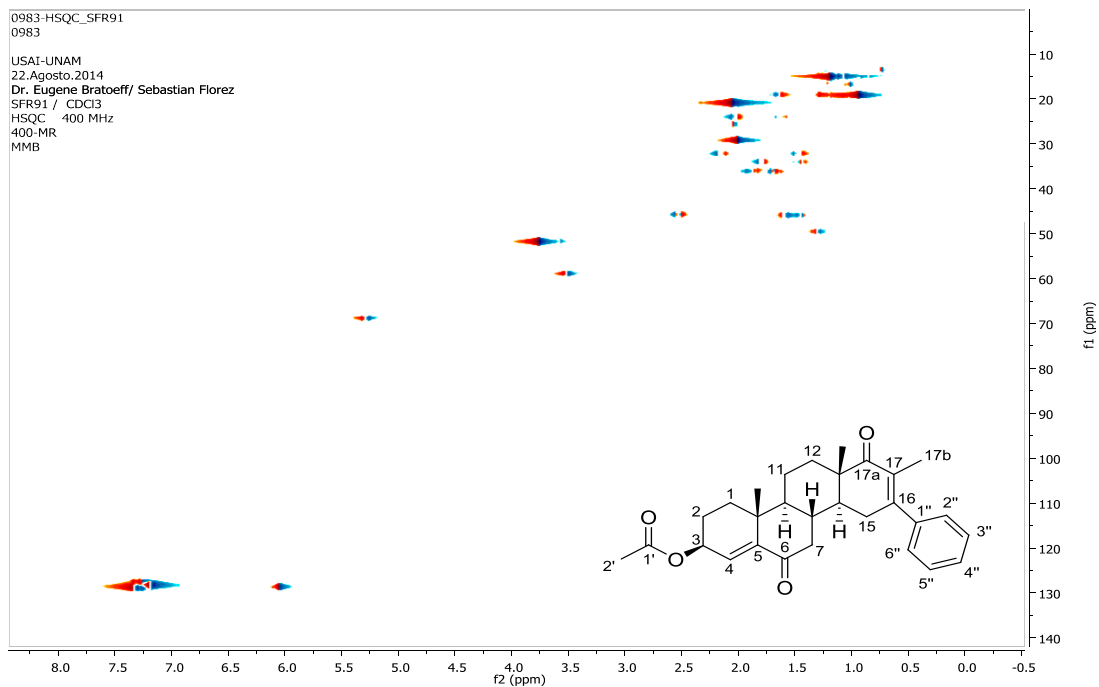


Figura 30. Espectro HSQC 16-fenil-17-metil-6,17a-dioxopregna-4,16-dien-3β-ilo (VIIc).

7. Conclusiones.

La síntesis de nuevos D-homo derivados de la pregnenolona se realizó eficientemente, generando 4 nuevos compuestos: **acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (VIII)**, **16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX)**, **propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xa)**, **butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo(Xb)**.

La ruta sintética lineal desarrollada para la síntesis de estos derivados presenta una eficiencia aceptable, manejando un rendimiento total de 25%, e implementando metodologías sencillas de reacción sin una marcada generación de productos secundarios.

La evaluación de los compuestos en el ensayo de citotoxicidad contra la línea celular PC3 mostró que los D-homo derivados, presentan una fuerte actividad antiproliferativa. Adicionalmente pudimos concluir que la inclusión de ésteres en la posición C3 genera una disminución en la actividad biológica.

8. Referencias.

- (1) World Health Organization: Trends in prostate cancer 1980-1988. *WHO Weekly Epidemiological Records*. **1992**, 67: 281-288.
- (2) Boyle, P. The evolution of an epidemic of unknown origin. *Prostate Cancer, European School of Oncology Monographs*. **2000**: 5-11.
- (3) Garnick, M.; Fair, E. Prostate Cancer: Emerging Concepts. *Ann. Intern. Med.* **1996**, 125: 118-125.
- (4) Naik, H. R.; Choeypunt, N.; Pienta, K. J. Chemoprevention of prostate cancer. *Drugs Today*. **1995**, 31: 537-544.
- (5) Garnick, M. Prostate cancer. Screening, diagnosis and management. *Ann. Intern. Med.* **1993**, 118: 804-814.
- (6) Gittes, R. F. Carcinoma of the prostate. *New Engl. J. Med.* **1991**, 324: 236-245.
- (7) Santen, R. Hormonal Therapy of prostate cancer: Choosing among several available options. *Int. J. of Androl.* **1989**, 12: 165-173.
- (8) Anderson, K.; Liao, S. Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei. *Nature*. **1986**, 219: 277-278.
- (9) Wakeling, A. Antihormones and other steroid analogues. *Steroid hormones, a Practical Approach*. IRL Press, Washington. **1987**, 219-236.
- (10) Bratoeff, E.; Flores, G.; Ramírez, E.; Valencia, C. The pharmacology of the antiandrogens. *Chimica OGGI*. **1977**, 8:67-69.
- (11) Calderon, D.; Bratoeff, E.; Ramírez, E. Antiandrógenos más usuales, reflexiones sobre la síntesis orgánica. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **1997**, 28: 24-29.
- (12) Brueggemeier, R. W. Male sex hormones, analogs and antagonists. *Burguer's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. John Wiley Inc., 5th ed. USA. **1966**. Cap. 42.

- (13) Fieser, L. F.; Fieser, M.; *Steroids*. Reinhold Publishing Corporation, New York. **1983**.
- (14) Frairia, R.; Bradlow, H. L.; Gaidano, G. Steroid-Protein interactions: basic aspects. *Ann. NY Acad. Sci.* **1988**, 538.
- (15) Clark, J. H.; Shrader, W. T.; O'Malley, B. W. Mechanisms of steroid hormone action. Wilson, J. D.; Foster, D. W. *Williams Textbook of Endocrinology*, 7th ed. Philadelphia: W. B. Saunders. **1985**: 33-75.
- (16) Schulster, D.; Burstein, S.; Cooke, B. A. *Molecular Endocrinology of Steroids Hormones*, Wiley, London **1976**.
- (17) Miller, W. L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* **1988**, 9: 295.
- (18) Lieberman, S.; Prasad, V. V. K. Heterodox notions on pathways of steroidogenesis. *Endocr. Rev.* **1990**, 11: 469.
- (19) Cadepond F., Schweizer-Groyer, G.; Segard-Maurel, I. Heat Shock protein 90 as a critical factor in monitoring glucocorticoid receptor in a nonfunctional state. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266: 5834-5841.
- (20) Russell, D. W.; Wilson, J. D. Steroid 5 α -reductase: Two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63: 25-61.
- (21) Schulman, C.; Lunenfeld, B. The ageing male. *World J. Urol.* **2002**, 20: 4.
- (22) Dorfman, R. I.; Ungar, F. *Metabolism of steroid hormones*, 2nd ed.; *Academic Press*: New York, **1965**.
- (23) Verderame, M. *CRC handbook of hormones, vitamins, and radiopaques*; *CRC Press*: Boca Ratón, FL, **1986**
- (24) Thingpen, A. E.; Silver, R. I.; Guileyardo, J. M.; Casey, M. L.; McConell, J. D.; Russell, D. W. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 α -reductase isozyme expression. *J. Clin. Invest.* **1993**, 92: 903.
- (25) Russell, D. W.; Berman, D. M.; Bryant, J. T.; Cala, K. M.; Davis, D. L.; Landrum, C. P.; Prhoda, J. S.; Silver, R. I.; Thingpen, A. E.; Wigley, W. C. The molecular genetics of steroid 5 alpha-reductases. *Recent Prog. Horm. Res.* **1994**, 49: 275.
- (26) Vermeulen, A.; Kaufman, J. M.; Goemaere, S.; van Pottelberg, I. Estradiol in elderly men. *Aging Male.* **2002**, 5: 98.

- (27) Fotherby, K.; James, F.; Atkinson, L.; Dumasia, M. Studies on the aromatization of a synthetic progestin. *J. Endocrinol.* **1972**, 52.
- (28) Belanger, A.; Pelletier, G.; Labrie, F.; Barbier, O.; Chouinard, S. Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyl transferase enzymes in humans. *Trends Endocrinol. Metab.* **2003**, 14: 473.
- (29) Carlson, K. E.; Katzenellenbogen, J. A. A comparative study of the selectivity and efficiency of target tissue uptake of five tritium labeled androgens in the rat. *J. Steroid Biochem.* **1990**, 36: 549.
- (30) Oettel, M. Testosterone metabolism, dose-response relationships and receptor polymorphisms: selected pharmacological/toxicological considerations on benefits versus risks of testosterone therapy in men. *Aging Male.* **2003**, 6: 230.
- (31) Oettel, M. Is there a role for estrogens in the maintenance of men's health? *Aging Male.* **2002**, 5: 248.
- (32) De Ronde, W.; Pols, H. A.; van Leeuwen, J. P.; de Jong, F. H. The importance of oestrogens in males. *Clin. Endocrinol.* **2003**, 58: 529.
- (33) Barret-Connor, E.; Goodman-Gruen, D.; Patay, B. Endogenous sex hormones and cognitive function in older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, 84: 3681.
- (34) Van Pottelbergh, I.; Braeckman, L.; De Bacquer, D.; De Backer, G.; Kaufman, J. M. Differential contribution of testosterone and estradiol in the determination of cholesterol and lipoprotein profile in healthy middle-aged men. *Atherosclerosis*, **2003**, 166: 95.
- (35) Toda, K.; Okada, T.; Takeda, K.; Akira, S.; Saibara, T.; Shiraishi, M.; Onishi, S.; Shizuta, Y. Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17beta-oestradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. *J. Endocrinol.* **2001**, 168: 455.
- (36) Freedman, L. P. Molecular biology of steroid and nuclear hormone receptors. *Birkhauser*: Boston, MA, **1998**.
- (37) Migeon, B.R.; Brown, T.R.; Axelman, J.; Migeon, C. J. Studies of the locus for androgen receptor: localization on the human X chromosome and evidence for homology with the Tfm locus in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, 78: 6339–6343.

- (38) Lubahn, D. B.; Joseph, D. R.; Sullivan, P. M.; Willard, H. F.; French, F. S.; Wilson, E. M. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science*. **1988**, 240: 327.
- (39) Chang, C. S.; Kokontis, J.; Liao, S. T. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science*. **1988**, 240: 324.
- (40) Lubahn, D. B.; Joseph, D. R.; Sar, M.; Tan, J.; Higgs, H. N.; Larson, R. E.; French, F. S.; Wilson, E. M. The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol. Endocrinol.* **1988**, 2: 1265.
- (41) Trapman, J.; Klaassen, P.; Kuiper, G.G.; van der Korput, J.A.; Faber, P. W.; van Rooij, H. C.; Geurts van Kessel, A.; Voorhorst, M. M.; Mulder, E.; Brinkmann, A. O. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* **1988**, 153: 241.
- (42) McEwan, I. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *J. Endocr. Relat. Cancer.* **2004**, 11: 281.
- (43) Fang, H.; Tong, W.; Branham, W. S.; Moland, C. L.; Dial, S. L.; Hong, H.; Xie, Q.; Perkins, R.; Owens, W.; Sheehan, D. M. Study of 202 Natural, Synthetic, and Environmental Chemicals for Binding to the Androgen Receptor. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, 16:1338.
- (44) Burger, A.; Abraham, D. J. Burger's medicinal chemistry and drug discovery, 6th ed.; *Wiley*: Hoboken NJ, **2003**.
- (45) Foye, W. O.; Williams, D.A.; Lemke, T. L. Foye's principles of medicinal chemistry, 5th ed.; *Lippincott Williams & Wilkins*: Philadelphia, PA, **2002**.
- (46) Keller, E. T.; Ershler, W. B.; Chang, C. The androgen receptor: a mediator of diverse responses. *Front. Biosci.* **1996**, 1:59.
- (47) Goodman, L. S.; Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G. Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics, 10th ed.; *McGraw-Hill Medical Pub. Division*: New York, **2001**.
- (48) Johansen, K. L. Testosterone metabolism and replacement therapy in patients with end-stage renal disease. *Semin. Dial.* **2004**, 17: 202.

- (49) Evans, R. M. The steroid and tyroid hormone receptor superfamily. *Science*. **1988**, 240: 889.
- (50) Bishop, J. M. The molecular genetics of cancer. *Science*. **1987**, 235: 305.
- (51) Sager, R. Tumor suppressor genes, the puzzle and the promise. *Science*. **1989**, 246: 1406.
- (52) Eric, R.; Fearon, F. Human cancer syndromes: clues to the origin and Nature of cancer. *Science*. **1997**, 279: 1043.
- (53) Imperato-McGinley, J.; Guerrero, L.; Gautier, T.; Peterson, R. E. Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: An inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*. **1974**, 186: 1213.
- (54) Krieg, M.; Bartsch, W.; Janssen, W. A comparative study of binding metabolism and endogenous levels of androgens in normal, hyperplasic and carcinomatous human prostate. *J. Steroid. Biochem.* **1979**, 11: 615.
- (55) Klein H.; Bressel, M.; Kastendieck, H.; Voigt, K. D. Quantitative assessment of endogenous testicular and adrenal sex steroids and steroid metabolizing enzymes in untreated human prostatic cancerous tissue. *J. Steroid. Biochem.* **1988**, 30: 119.
- (56) Bruchovsly, N.; Sadar, M. D.; Akakura, K.; Goldenberg, S. L.; Matsuoka, K.; Rennie, P. S. Characterization of 5 alpha-reductase gene expression in stroma and epithelium of human prostate. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **1996**, 59: 397-404.
- (57) Jenkins, E. P.; Andersson, S.; Imperato-McGinley, J.; Wilson, J. D.; Russell, D. W. Genetica and pharmacological evindence for more than one human steroid 5alpha-reductase. *J. Clin. Invest.* **1992**, 89: 293-300.
- (58) Bartsch, G.; Rittmaster, R. S.; Klocker, H. Dihydrotestosterone and the concept of 5alpha-reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia. *World J. Urol.* **2002**, 19: 413-425.
- (59) Thingpen, A. E.; Cala, K. M.; Russell, D. W. Characterization of chinese hamster ovary cell lines expressing human steroid 5 alpha reductase isoenzymes. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268: 17404-17412.

- (60) Wilson, J. D.; Griffin, J. E.; Russell, D. W. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocr. Rev.* **1993**, 14: 577-593.
- (61) Wigley, W. C.; Prihoda, J. S.; Mowszowicz, I.; Mendonca, B. B.; New, M. I.; Wilson, J. D.; Russell, D. W. Natural mutagenesis study of the human steroid 5 alpha-reductase 2 isozyme. *Biochemistry.* **1994**, 33: 1265–1270.
- (62) Andersson, S.; Berman, D. M.; Jenkins, E. P.; Russell, D. W. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature.* **1991**, 354: 159-161.
- (63) Harris, G.; Azzolina, B.; Baginsky, W.; Cimis, G.; Rasmusson, G. H.; Tolman, R. L.; Raetz, C. R. H.; Ellsworth, K. Identification and selective inhibition of an isozyme of steroid 5 α -reductase in human scalp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89: 10787-10791.
- (64) Faller, B.; Farley, D.; Nick, H. Finasteride: a slow-binding 5 alpha-reductase inhibitor. *Biochemistry.* **1993**, 32: 5705-5710.
- (65) Tian, G.; Stuart, D. N.; Patel, I. R.; Kadwell, S.; Overton, L. K.; Kost, T. A.; Mook, R.; Frye, S- V.; Batchelor, K. W.; Wiseman, J. 17 β -(N-tert-Butylcarbonyl)-4-aza-5 α -androstane-1-en-3-one Is an Active Site-Directed Slow Time-Dependent Inhibitor of Human Steroid 5alpha-Reductase 1. *Biochemistry.* **1994**, 33: 2291-2296.
- (66) Morrison, J. F.; Walsh, C. T. The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1988**, 61: 201-301.
- (67) Tian, G.; Chen, S. Y.; Facchine, K. L.; Prakash, S. R. Chemical mechanism of the covalent modification of 5 α -reductase by finasteride as probed by secondary tritium isotope effects. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117: 2369-2370.
- (68) Bull, H. G.; Garcia-Calvo, M.; Andersson, S.; Baginsky, W. F.; Chan, H. K.; Ellsworth, D. E.; Miller, R. R.; Stearns, R. A.; Bakshi, R. K.; Rasmusson, G. H.; Tolman, R. L.; Myers, R. W.; Kozarich, J. W.; Harris, G. S. Mechanism-based inhibition of human steroid 5 α -reductase by finasteride: enzyme-catalyzed formation of NADP-Dihydrofinasteride, a potent bisubstrate analog inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118: 2359-2365.

- (69) Neumann, F.; Topert, M. Pharmacology of antiandrogens. *J. Steroid Biochem.* **1986**, 25: 885-895.
- (70) Neumann, F. The antiandrogen cyproterone acetate: Discovery, chemistry, basic pharmacology, clinical use and tool in basic research. *Clin. Exp. Endocrinol.* **1994**, 102: 1-32.
- (71) Mangan, F. R.; Mainwaring, I. P. An explanation of the antiandrogenic properties of 6 -bromo-17 -hydroxy-17-methyl-4-oxa-5 -androstane-3-one. *Steroids.* **1972**, 20: 331.
- (72) Neumann, F.; Berswordt-Wallrabe, R. V. Effects of the androgen antagonist cyproterone acetate on the testicular structure, spermatogenesis and accessory sexual glands of testosterone-treated adult hypophysectomized rats. *J. Endocrinol.* **1966**, 35: 363.
- (73) Peets, E. A.; Henson, M. F.; Neri, R. On the mechanism of the anti-androgenic action of flutamide (alpha-alpha-trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide) in the rat. *Endocrinol.* **1974**, 94: 1205.
- (74) Eri, L. M.; Tveter, K. J. A prospective, placebo-controlled study of the luteinizing hormone-releasing hormone agonist leuprolide as treatment for patients with benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* **1993**, 150: 90.
- (75) Eli, C. Ketonazole binds to the human androgen receptor. *Hormone Metab. Res.* **1992**, 34: 367-370.
- (76) Espada, M.; Avendaño, C. Inhibidores enzimáticos como farmacodinámicos. Introducción a la química farmacéutica. *Interamericana McGraw-Hill*, Madrid, España. **1996**, 10: 292-295.
- (77) Brodgen, R. N.; Chrisp, P. Flutamide: A review of its pharmacokinetic properties and therapeutic use in advanced prostatic cancer. *Drugs & Aging.* **1991**, 1: 104-115.
- (78) Kaisary, A. V. Current clinical studies with a new nonsteroidal androgen, Casodex. *The prostate.* **1994**, 5: 27-33.

9. Anexos.

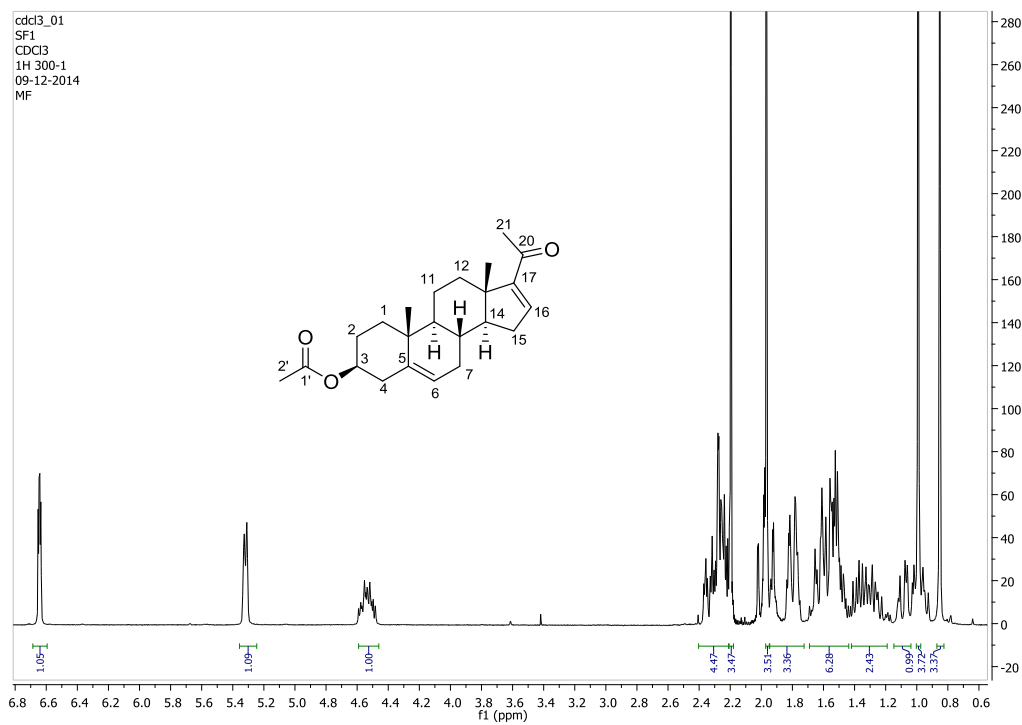


Figura A1. Espectro RMN ^1H del acetato de 16,17-dihidropregnenonona (I)

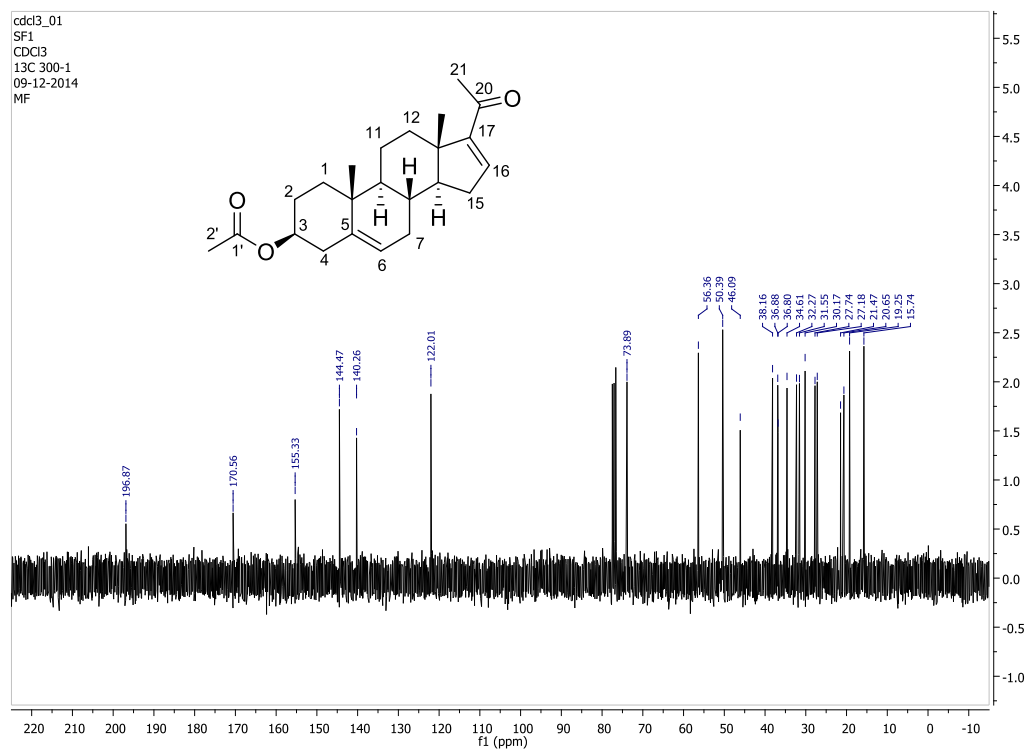


Figura A2. Espectro RMN ^{13}C del acetato de 16,17-dihidropregnenonona (I)

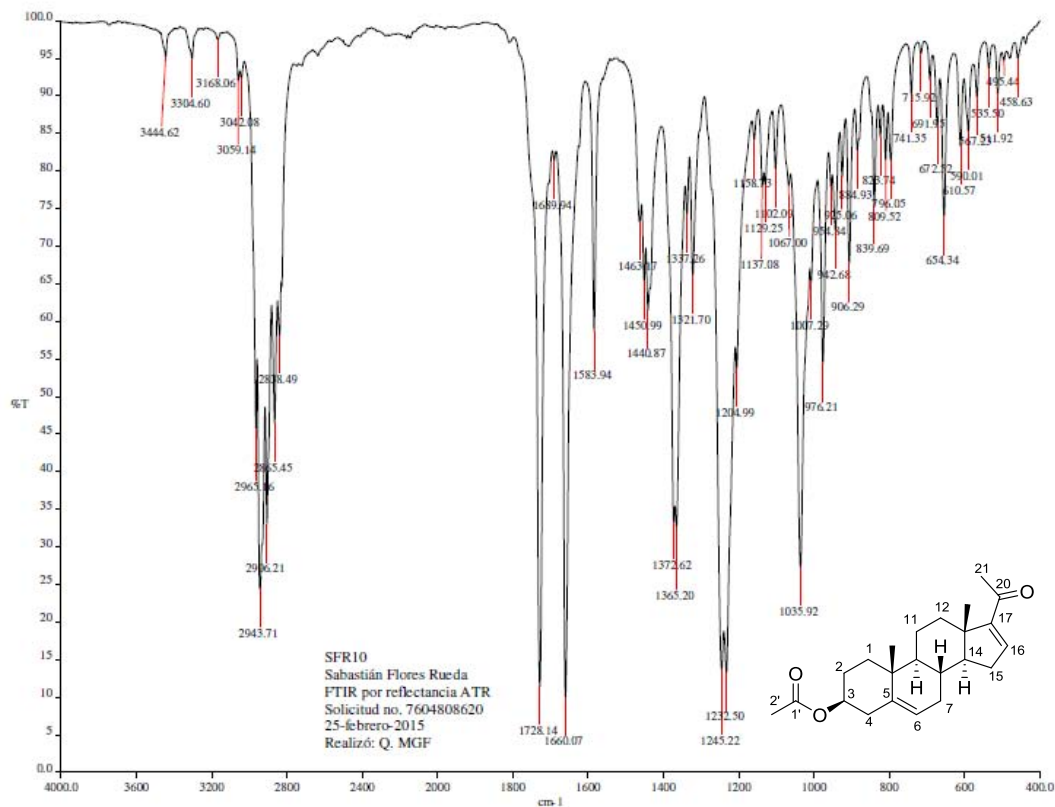


Figura A3. Espectro IR de acetato de 16,17-dedihidropregnenlonona (I).

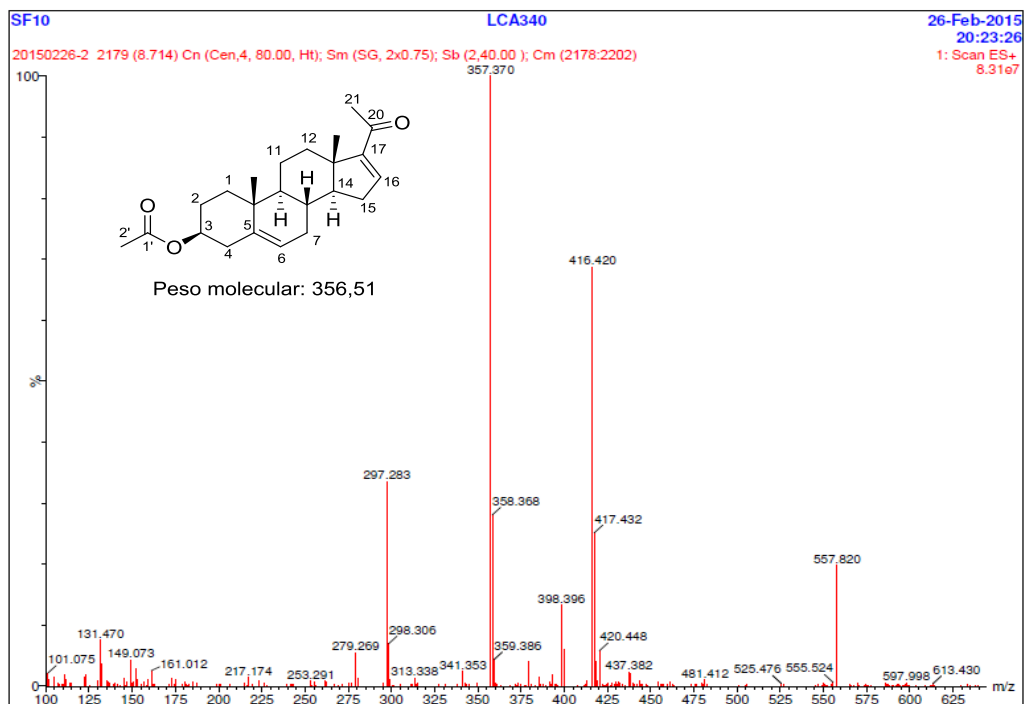


Figura A4. Espectro de masas del acetato de 16,17-dedihidropregnenlonona (I).

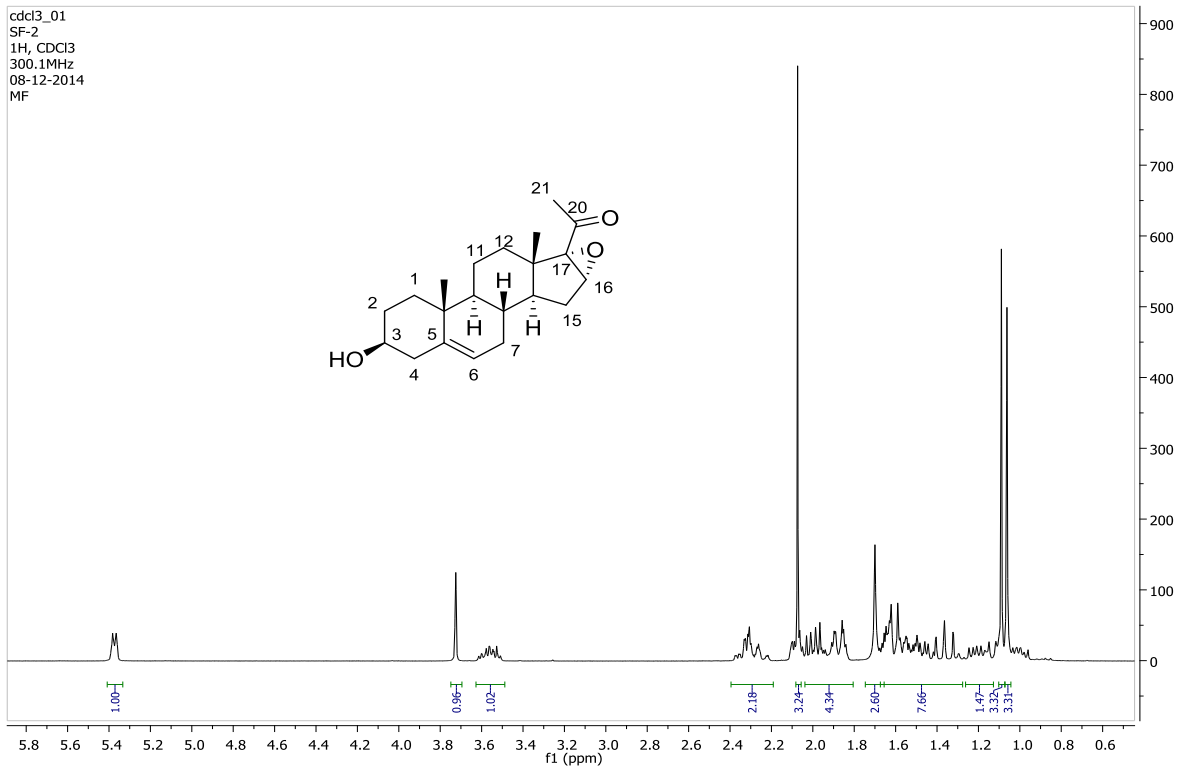


Figura A5. Espectro RMN ^1H de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregna-5-en-20-ona (II).

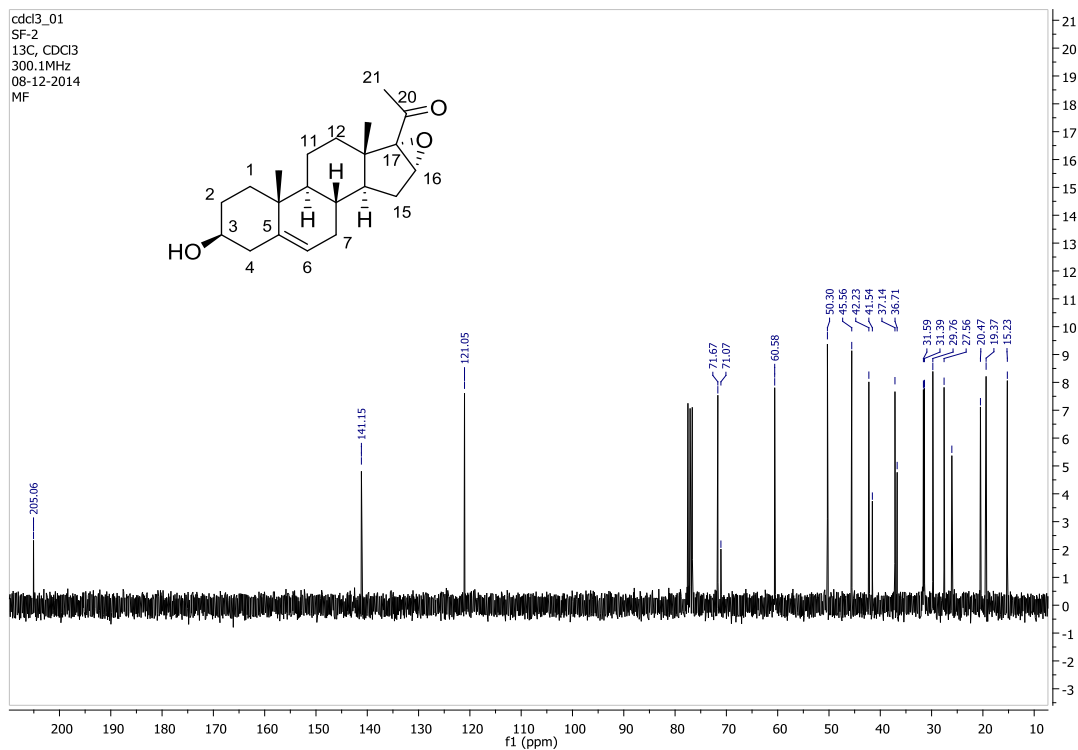


Figura A6. Espectro RMN ^{13}C de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregna-5-en-20-ona (II).

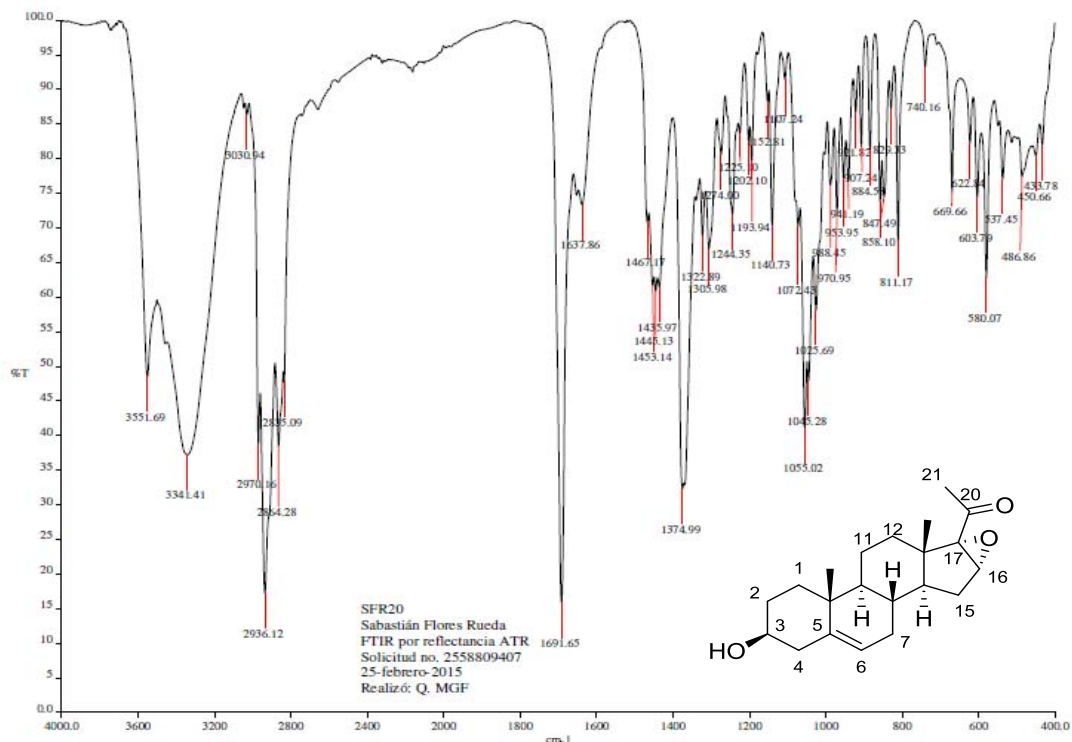


Figura A7. Espectro IR de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-pregna-5-en-20-ona (II).

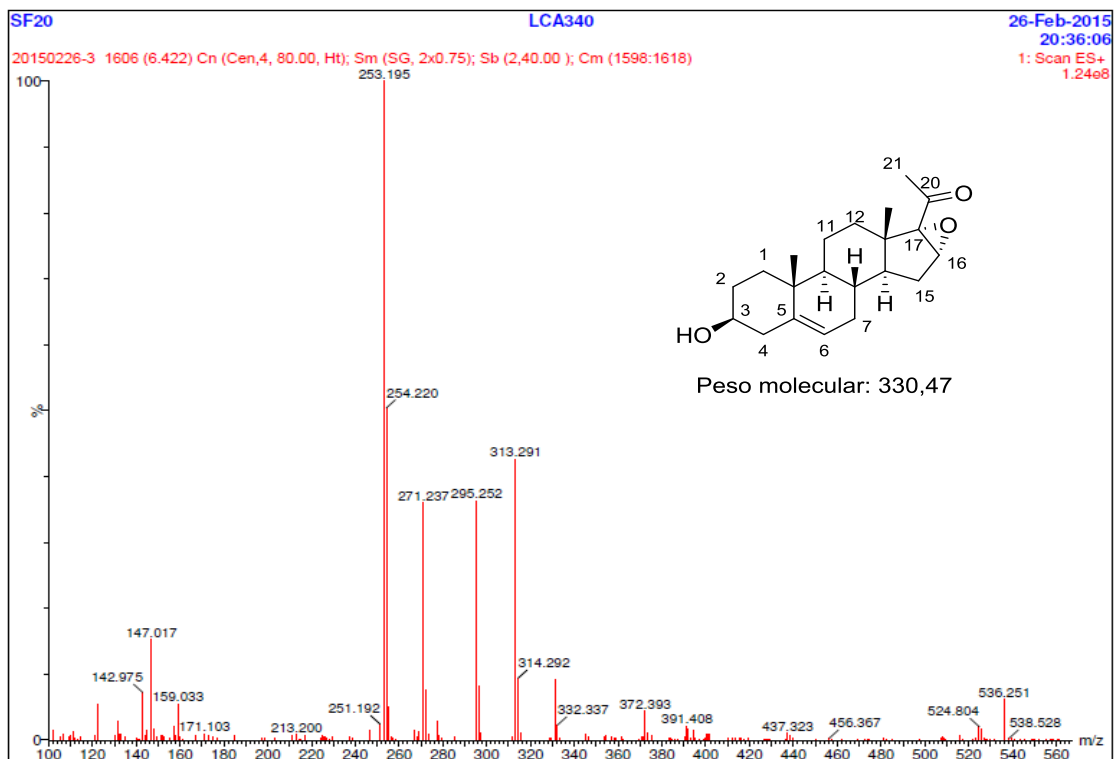


Figura A8. Espectro de masas de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-pregna-5-en-20-ona (II).

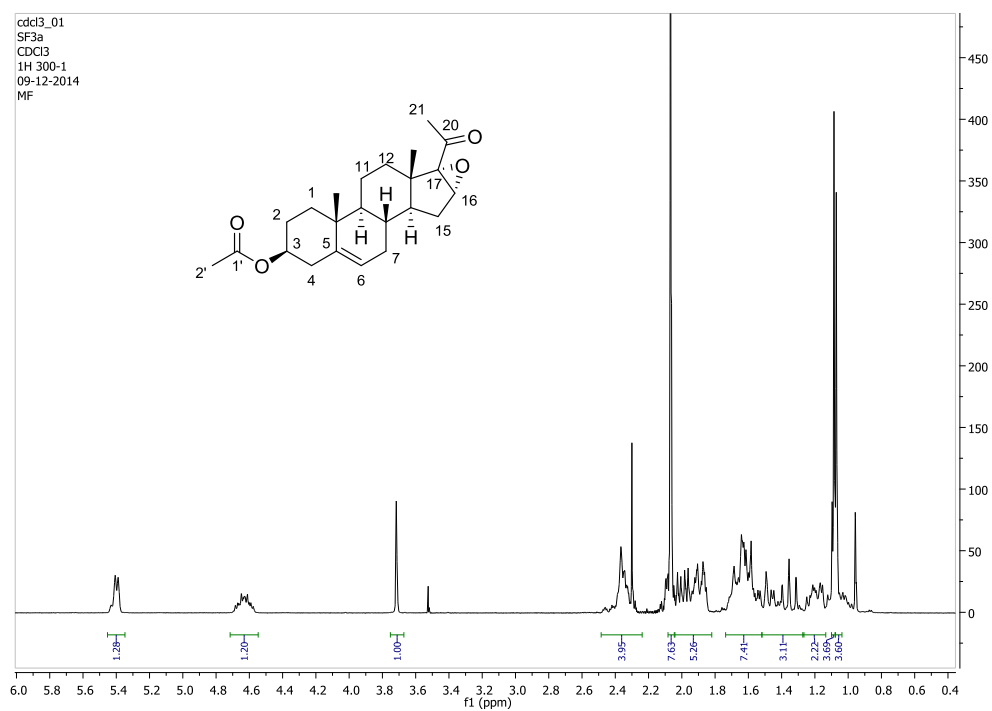


Figura A9. Espectro RMN ^1H del acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20-oxopregna-5-en-3 β -ilo (III).

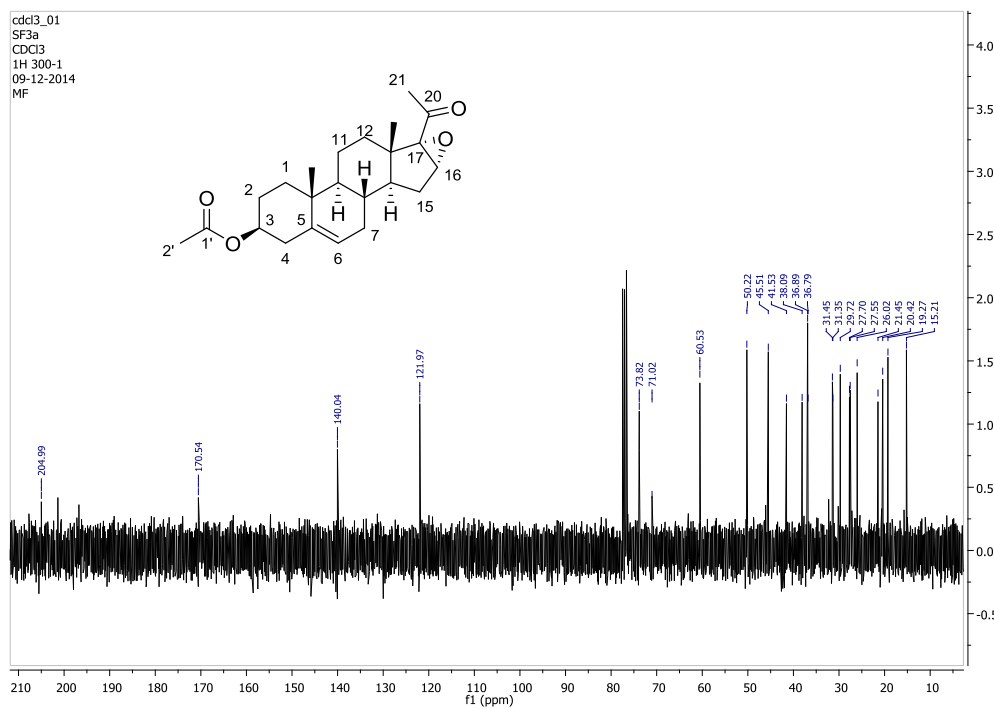


Figura A10. Espectro RMN ^{13}C de acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20-oxopregna-5-en-3 β -ilo (III).

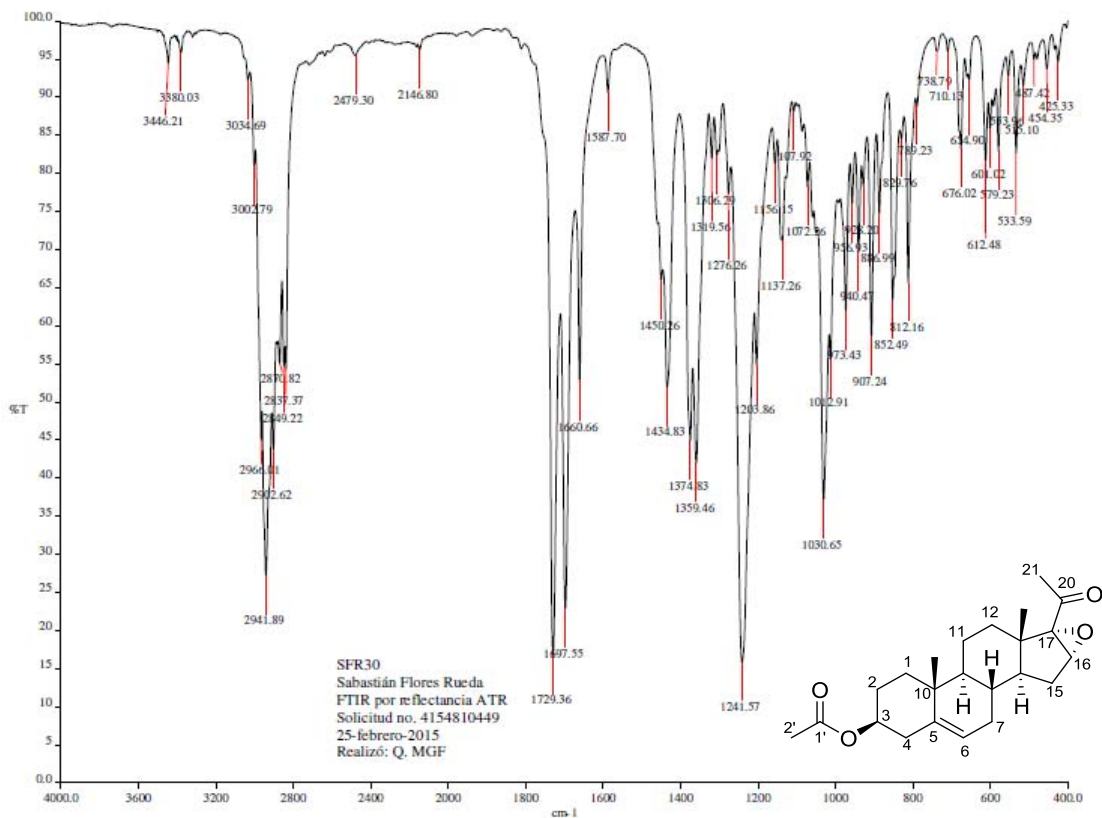


Figura A11. Espectro IR del acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20-oxopregna-5-en-3 β -ilo (III).

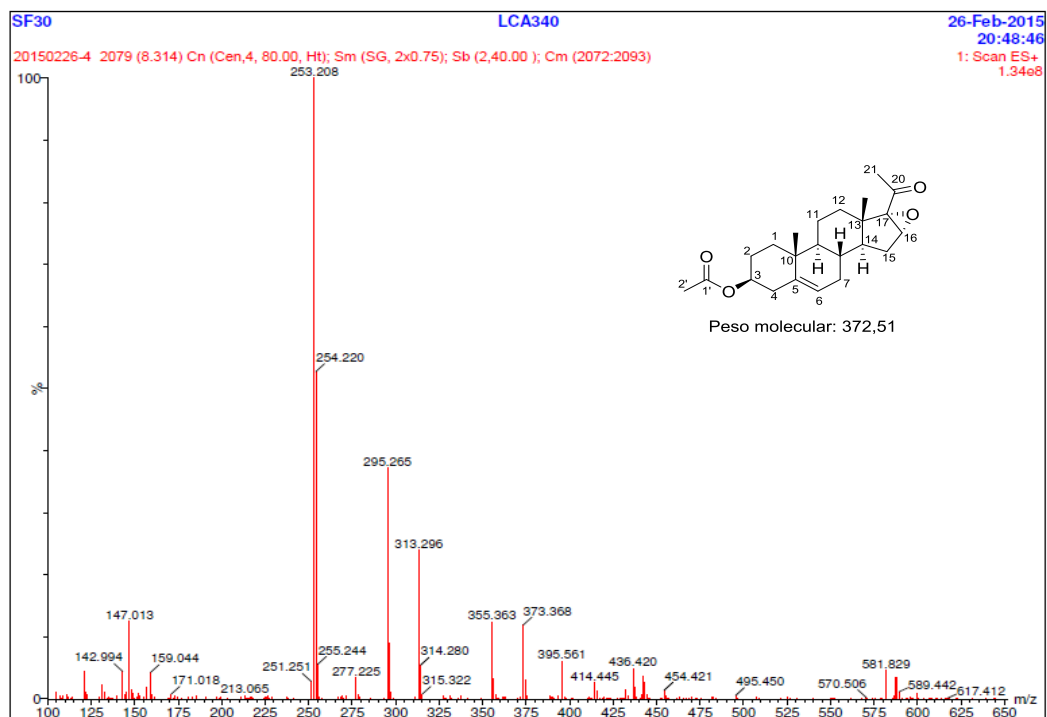


Figura A12. Espectro de masas del acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20-oxopregna-5-en-3 β -ilo (III).

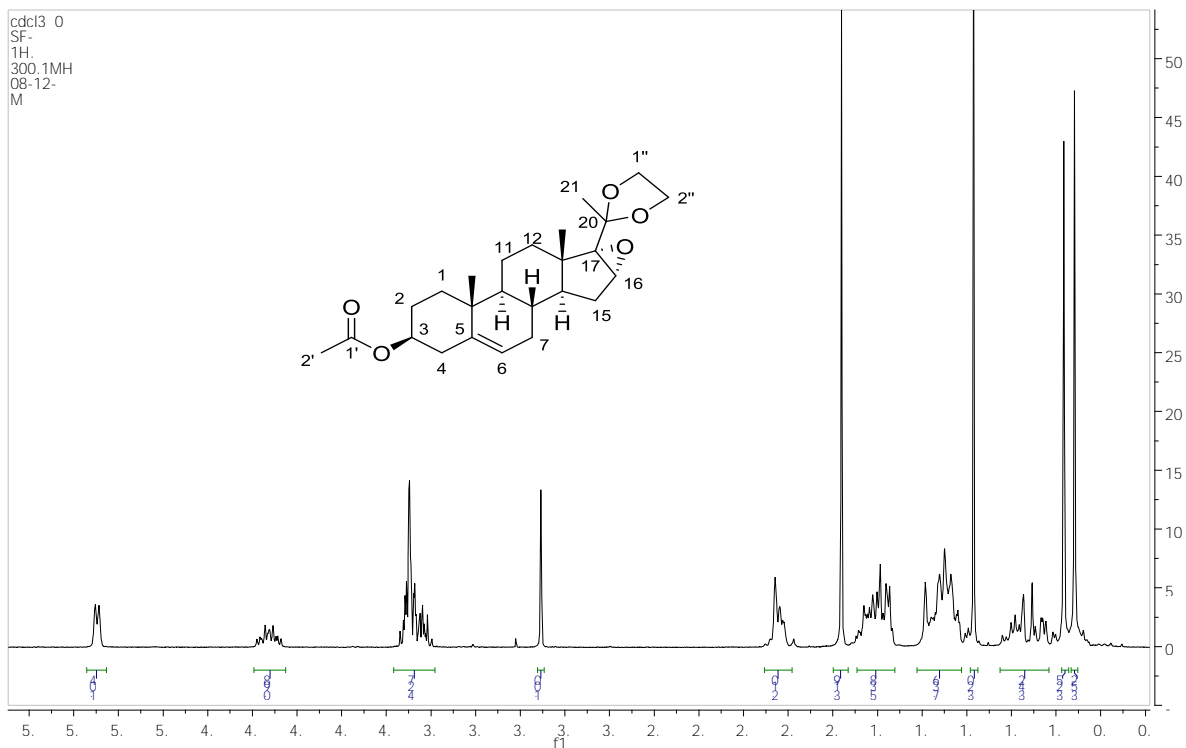


Figura A13. Espectro RMN ^1H del acetato de $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en- 3β -ilo (IV).

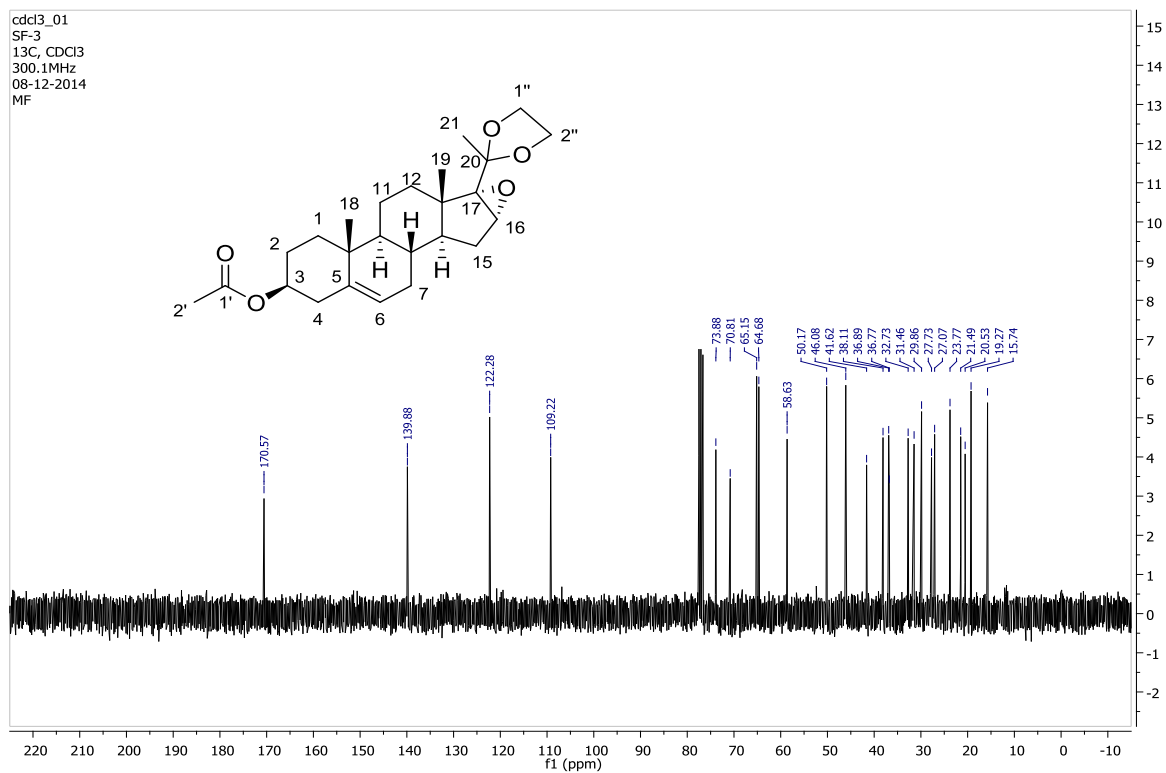


Figura A14. Espectro RMN ^{13}C del acetato de $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en- 3β -ilo (IV).

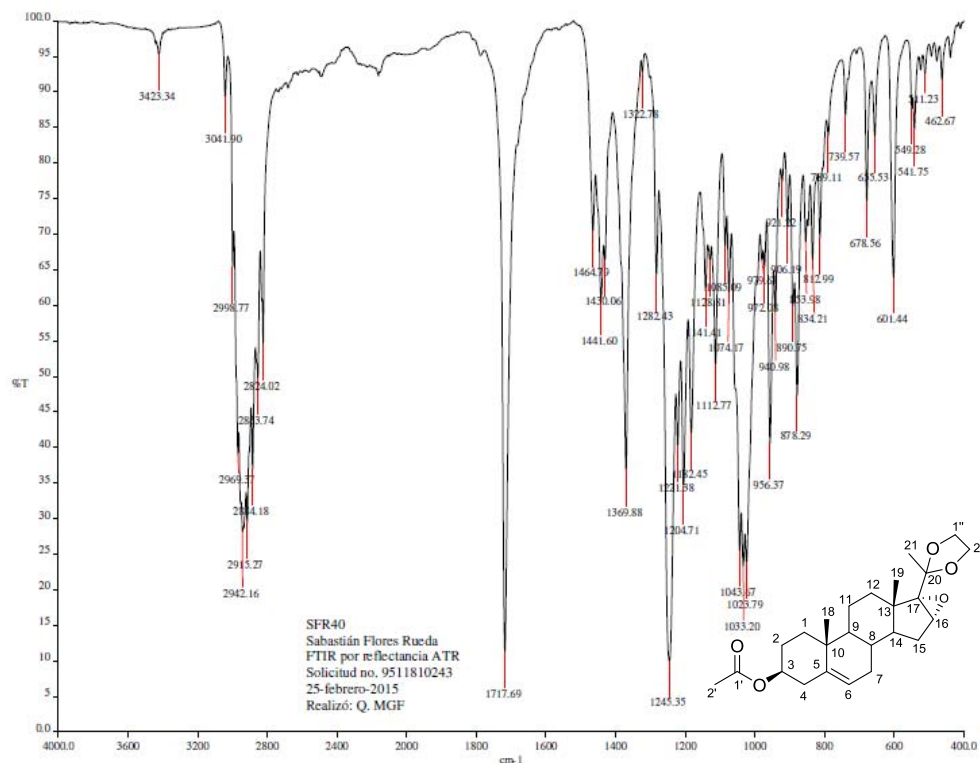


Figura A15. Espectro IR de acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3 β -ilo (IV).

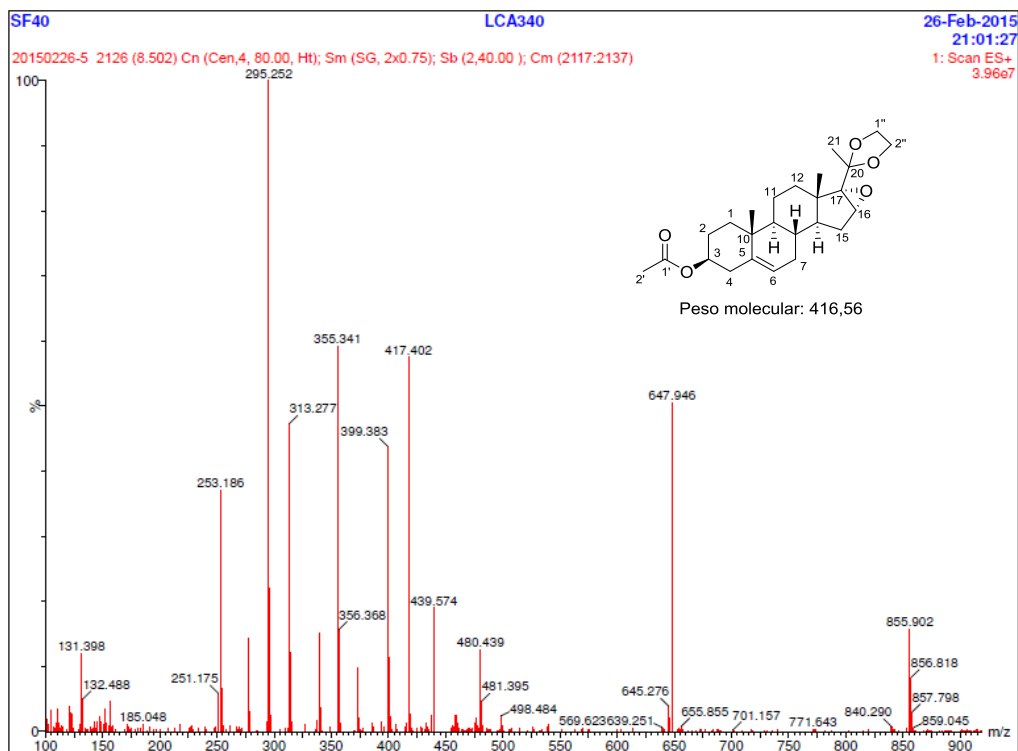


Figura A16. Espectro de masas del acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20,20-(etilendioxi)-pregna-5-en-3 β -ilo (IV).

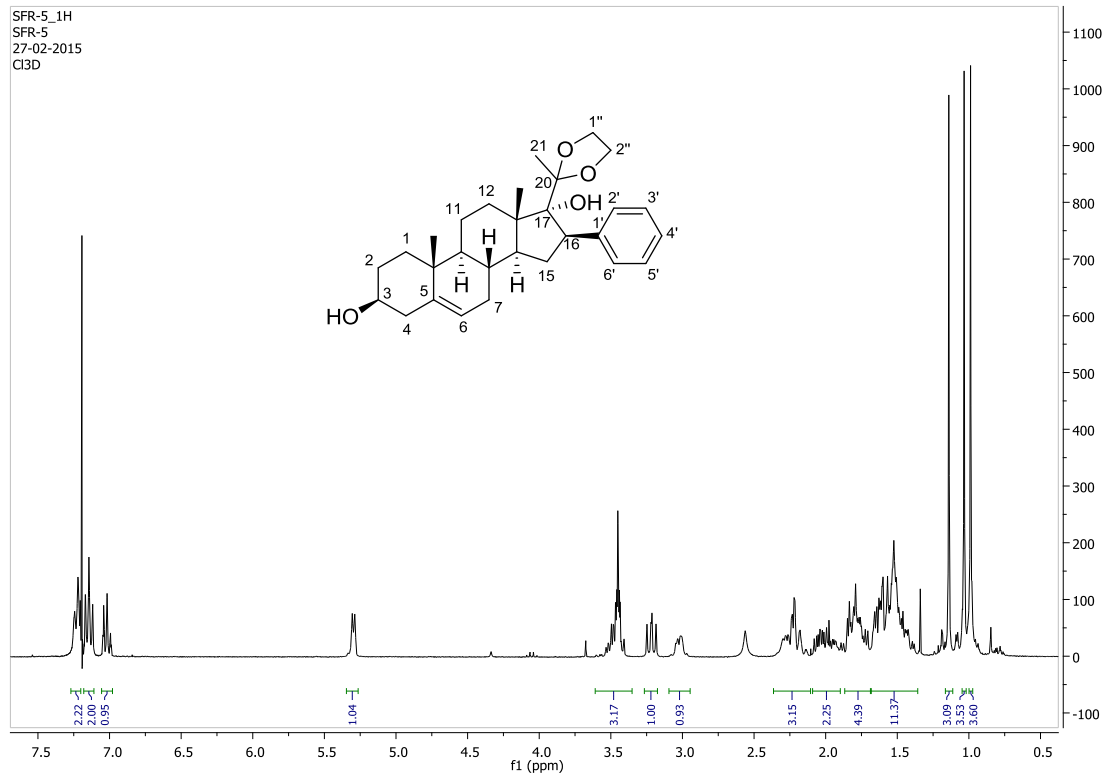


Figura A17. Espectro RMN ^1H de 20,20-(etilendioxi)-16β-fenilpregna-5-en-3β,17α-diol (V).

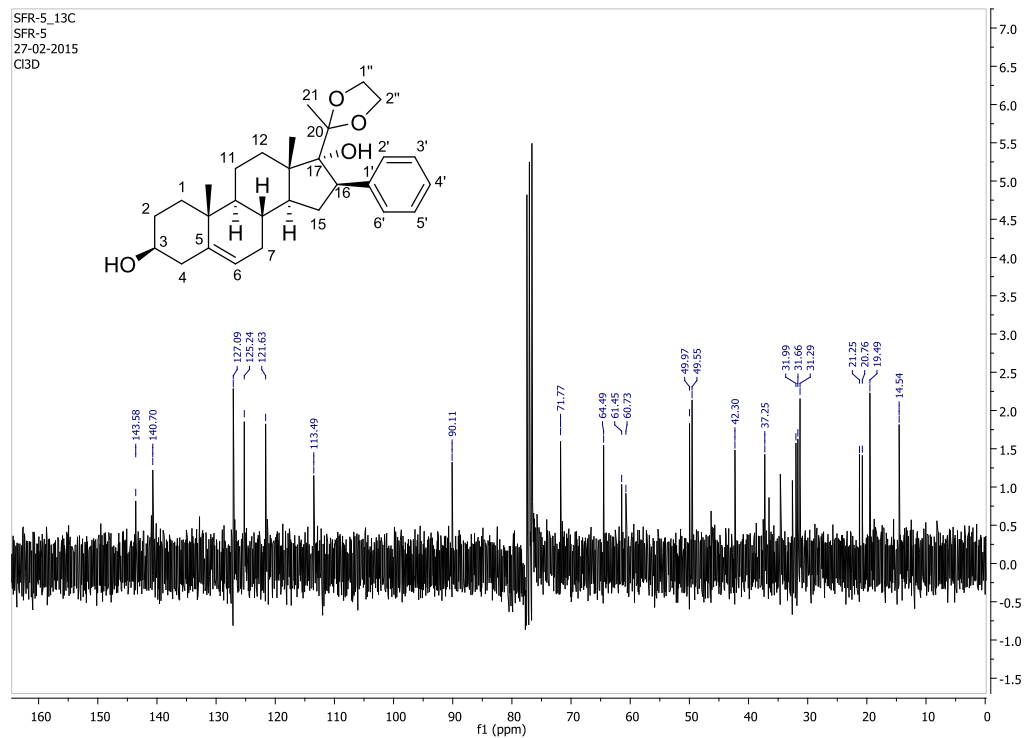


Figura A18. Espectro RMN ^{13}C de 20,20-(etilendioxi)-16β-fenilpregna-5-en-3β,17α-diol (V).

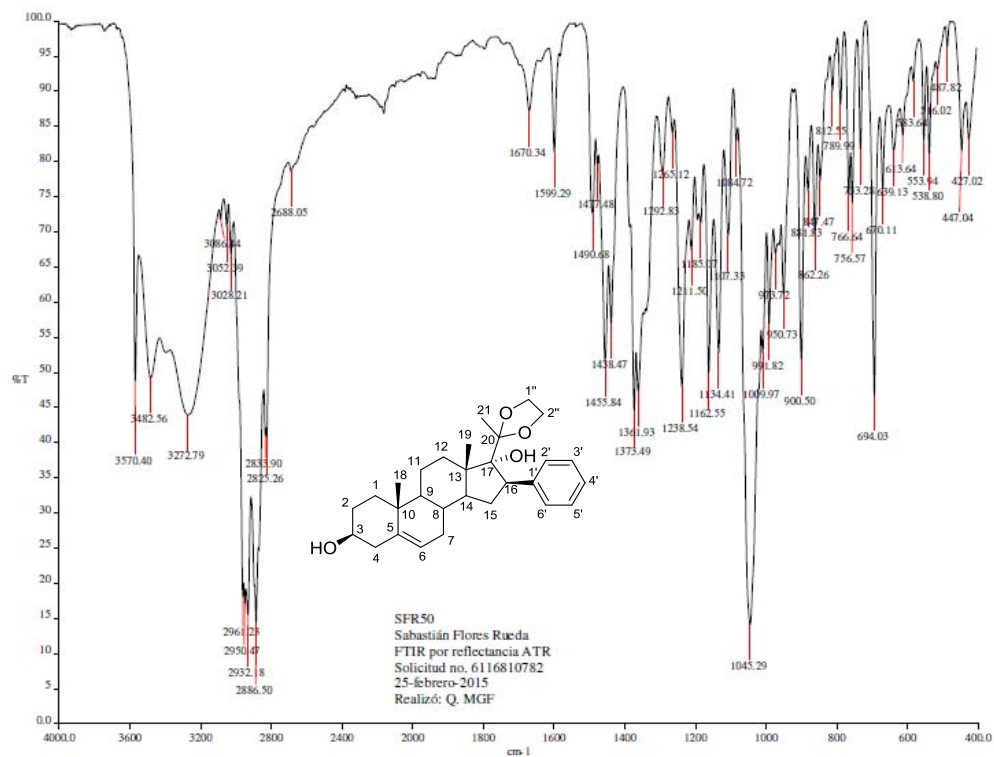


Figura A19. Espectro IR de 20,20-(etilendioxo)-16β-fenilpregna-5-en-3β,17α-diol(V).

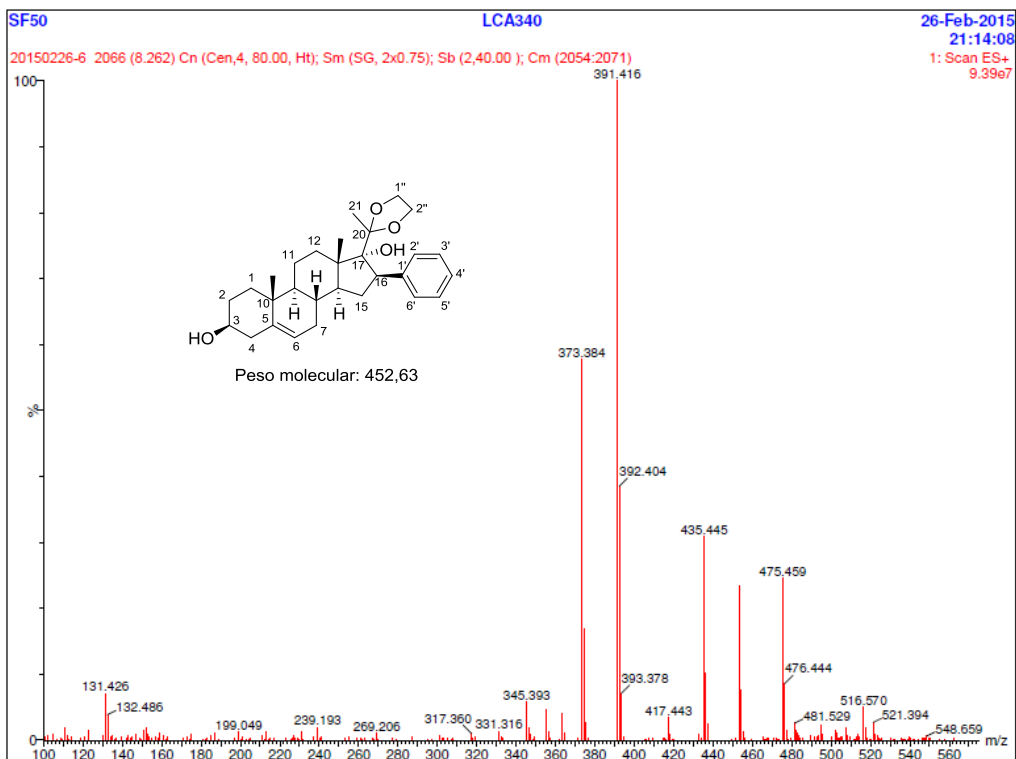


Figura A20. Espectro de masas de 20,20-(etilendioxo)-16β-fenilpregna-5-en-3β,17α-diol (V).

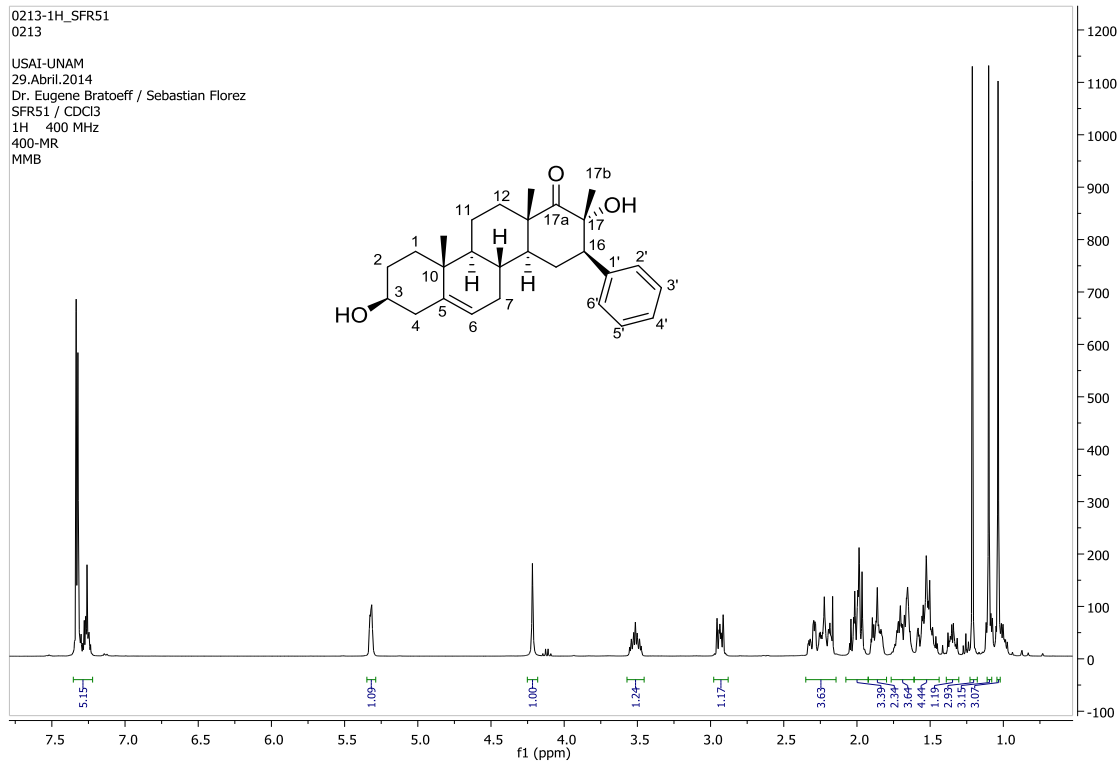


Figura A21. Espectro RMN ^1H de 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VI)

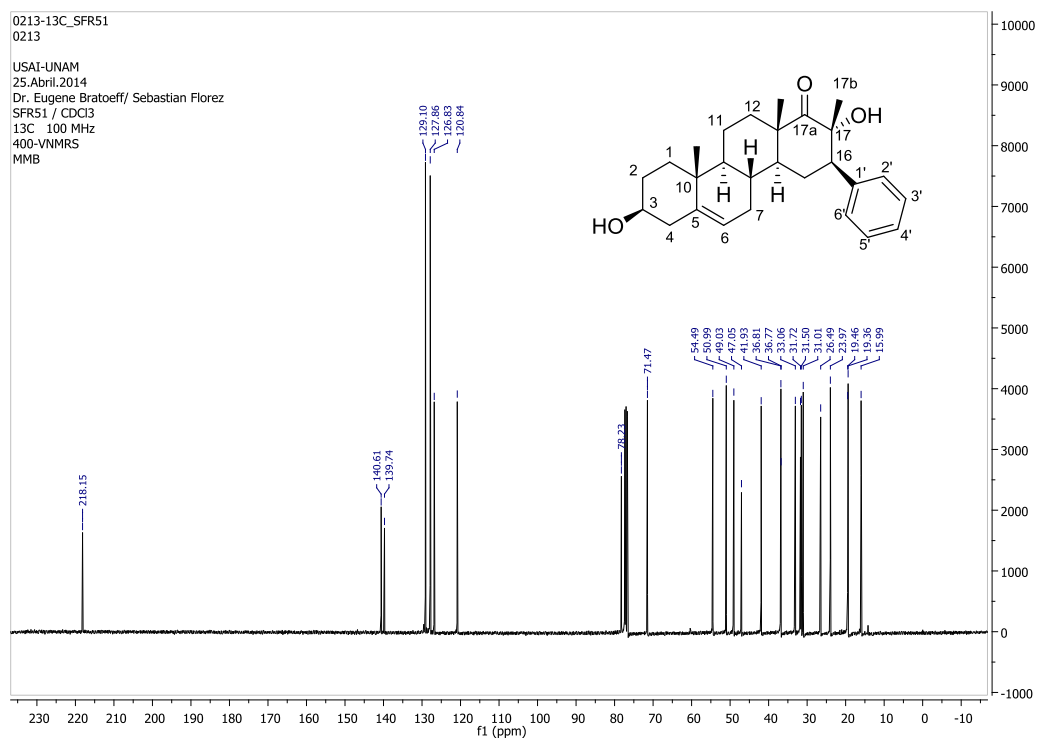


Figura A22. Espectro RMN ^{13}C de 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VI).

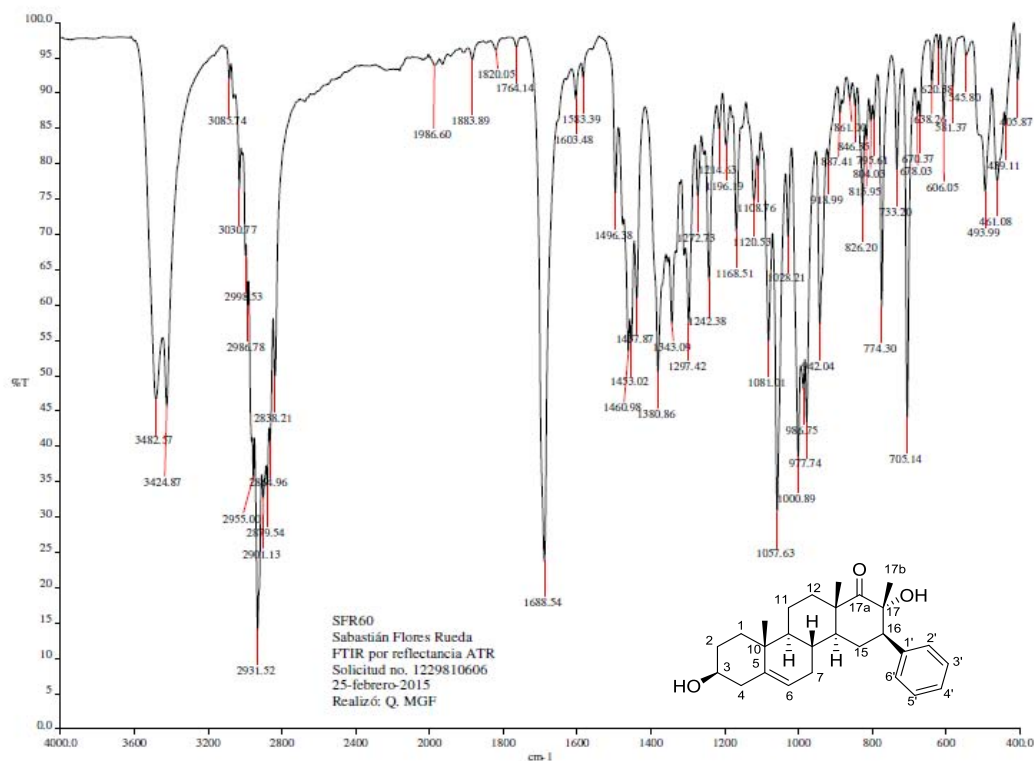


Figura A22. Espectro IR de 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VI).

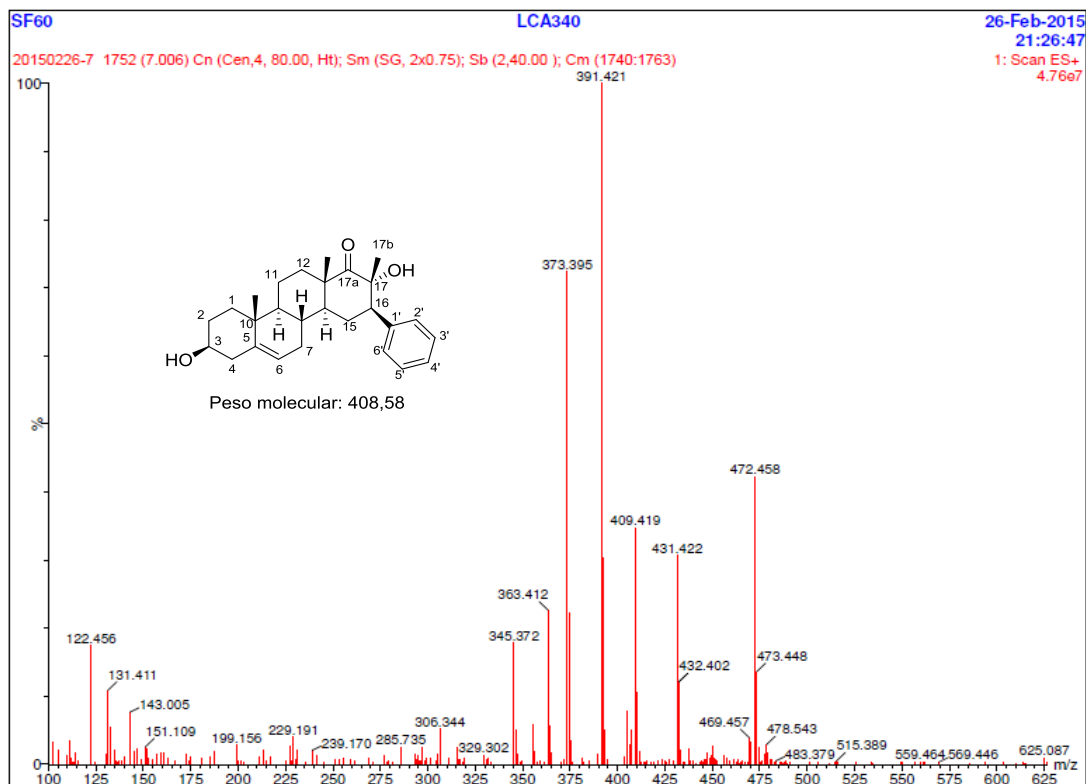


Figura A23. Espectro de masas de 16β-fenil-17β-metil-17a-oxo-D-homopregna-5-en-3β,17α-diol (VI).

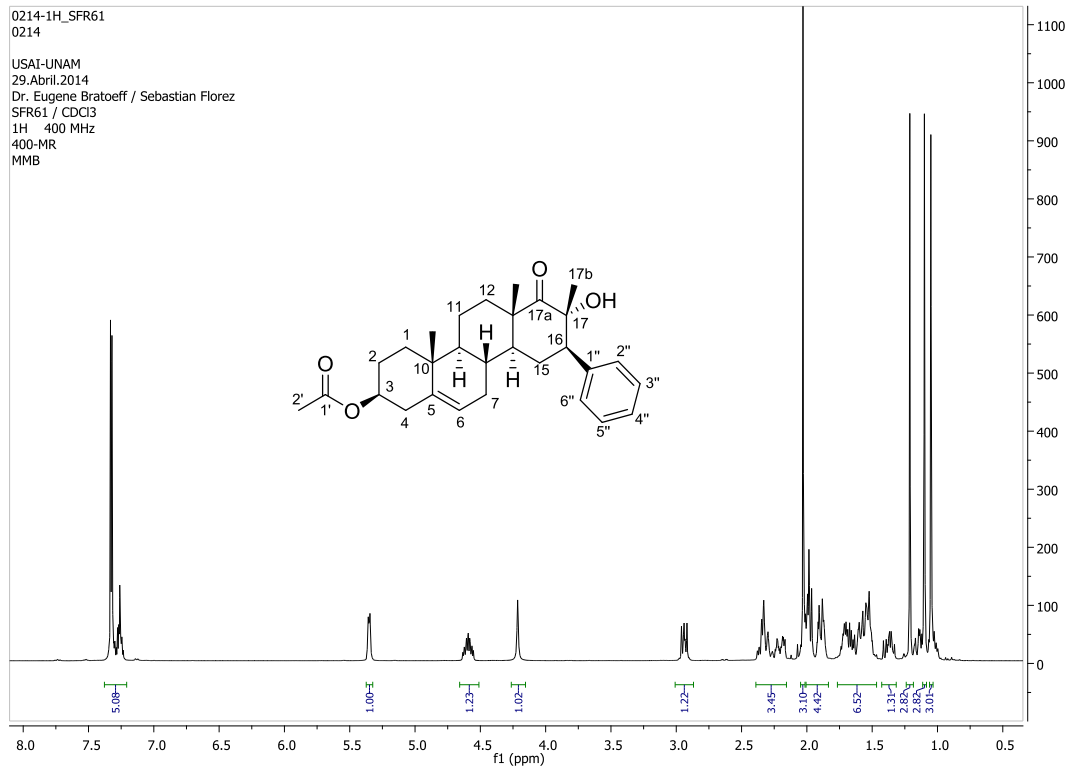


Figura A24. Espectro RMN ^1H del acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo (VII).

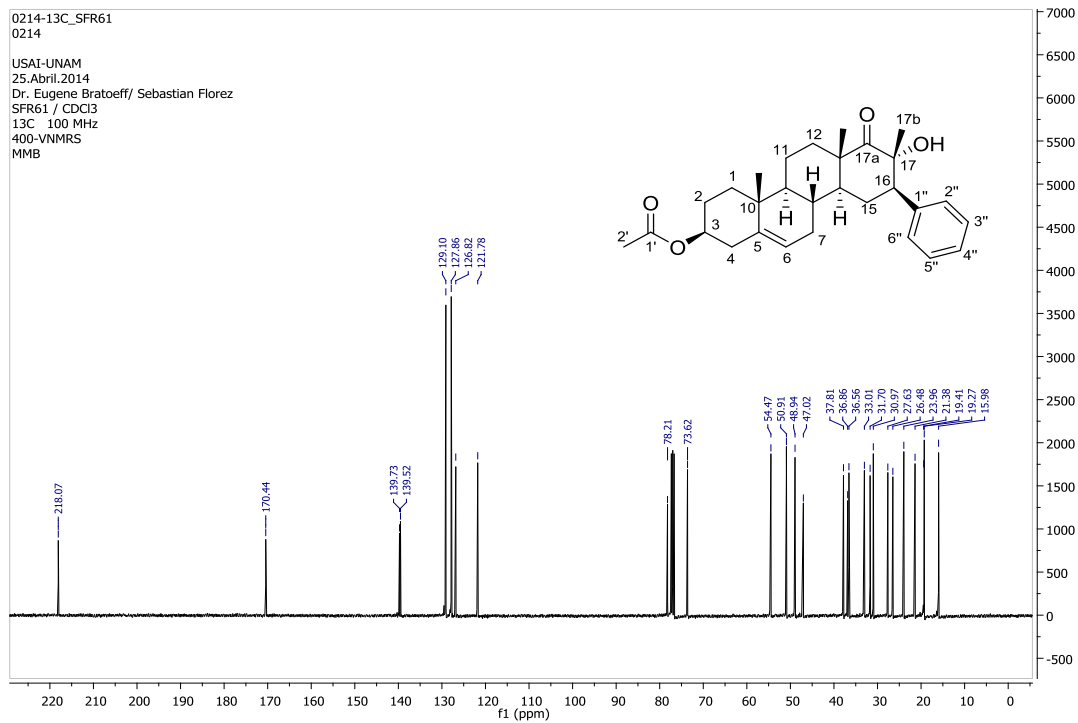


Figura A25. Espectro RMN ^{13}C de acetato de 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3 β -ilo (VII).

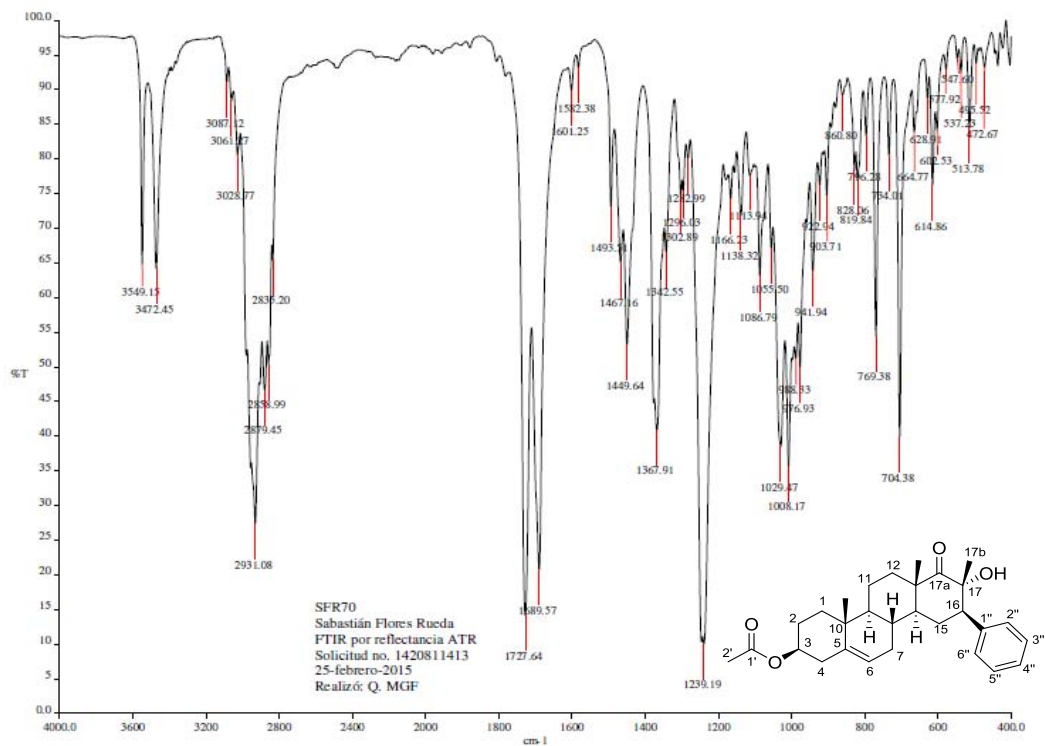


Figura A26. Espectro IR de acetato de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3β-ilo (VII).

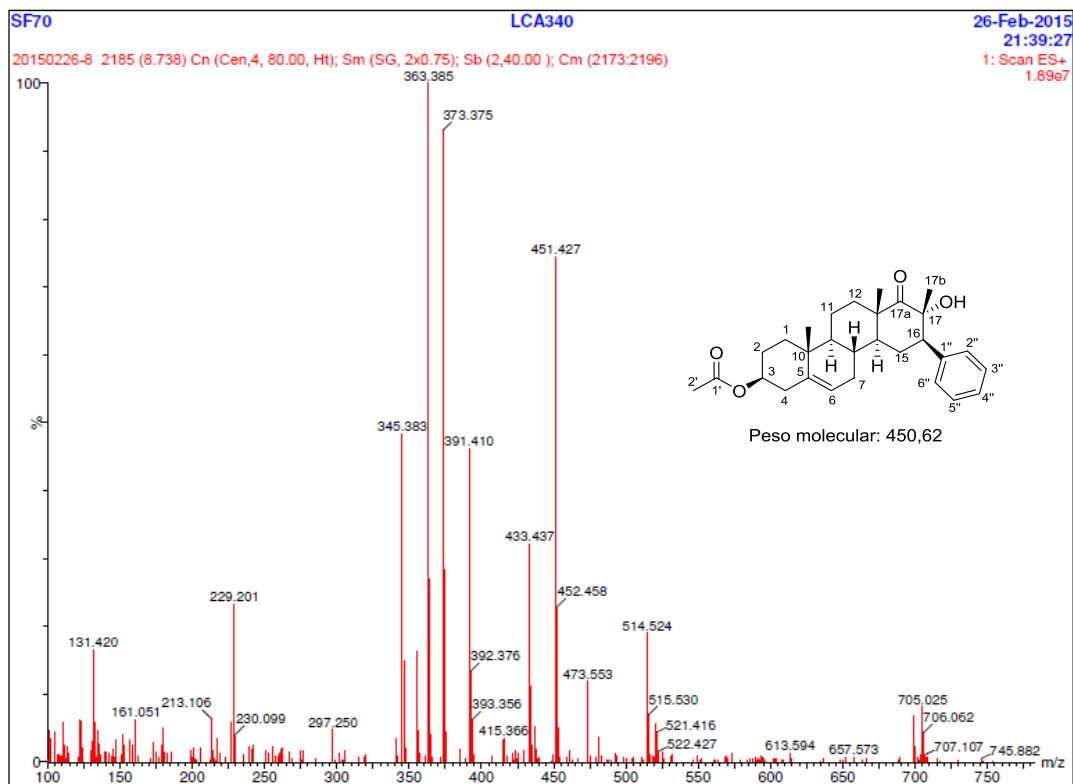


Figura A27. Espectro de masas de acetato de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-17a-oxa-D-homopregna-5-en-3β-ilo (VII).

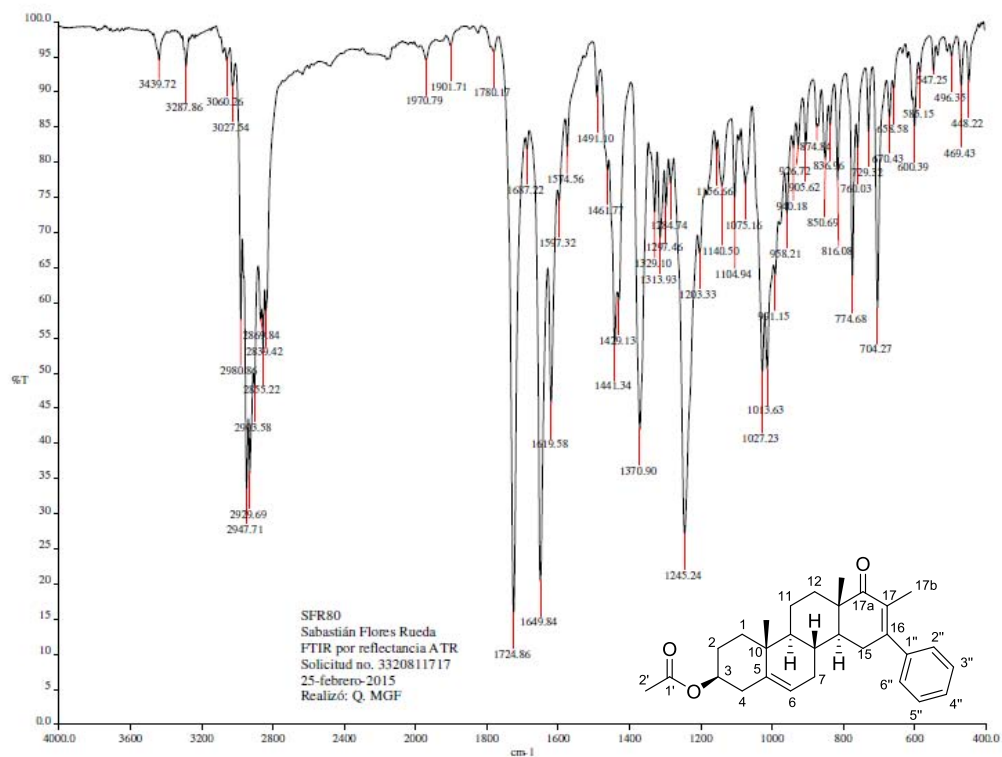


Figura A28. Espectro IR del acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (VIII).

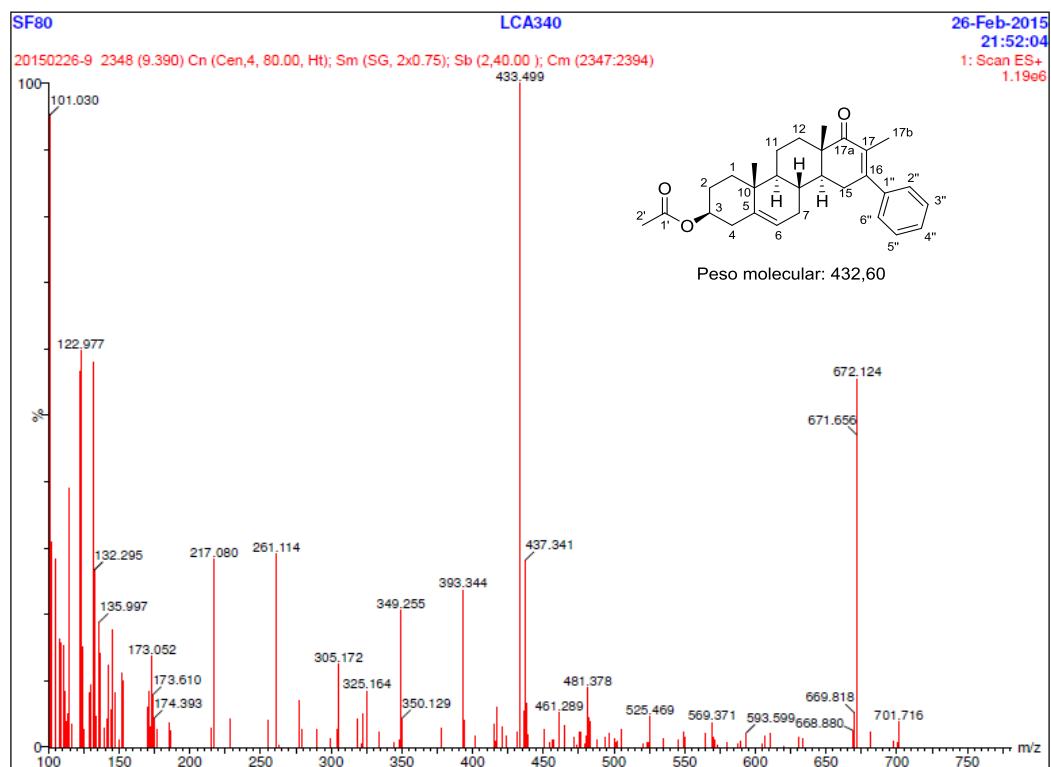


Figura A29. Espectro de masas del acetato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (VIII).

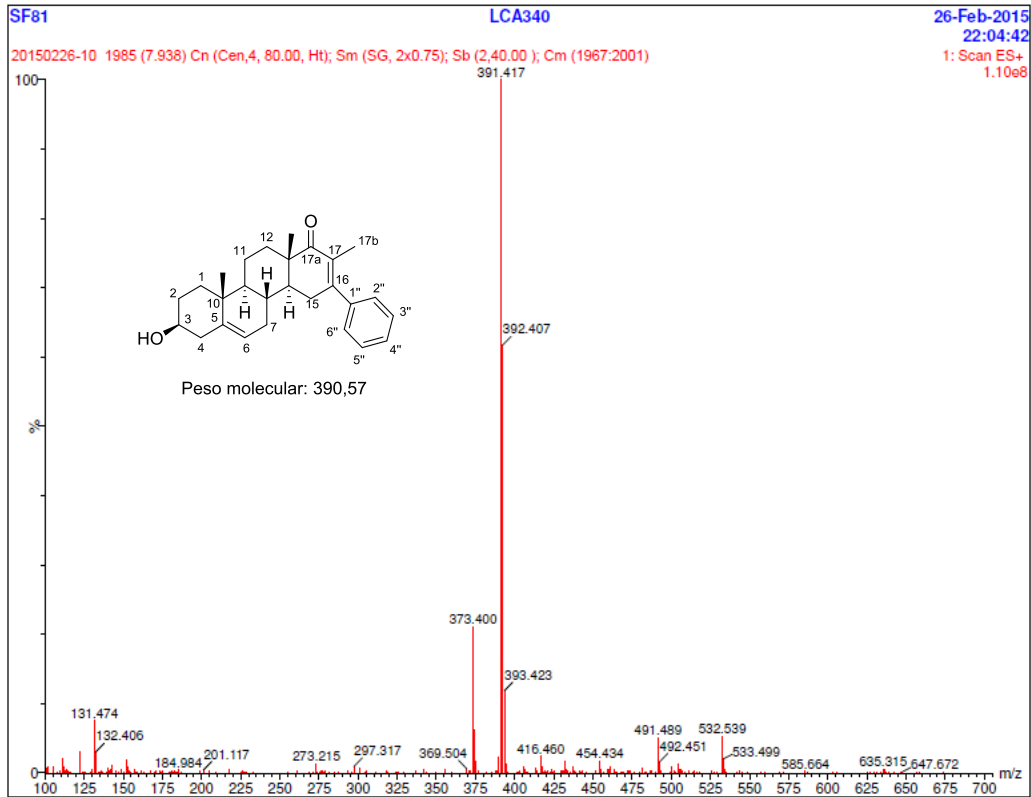


Figura A30. Espectro de masas de la 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).

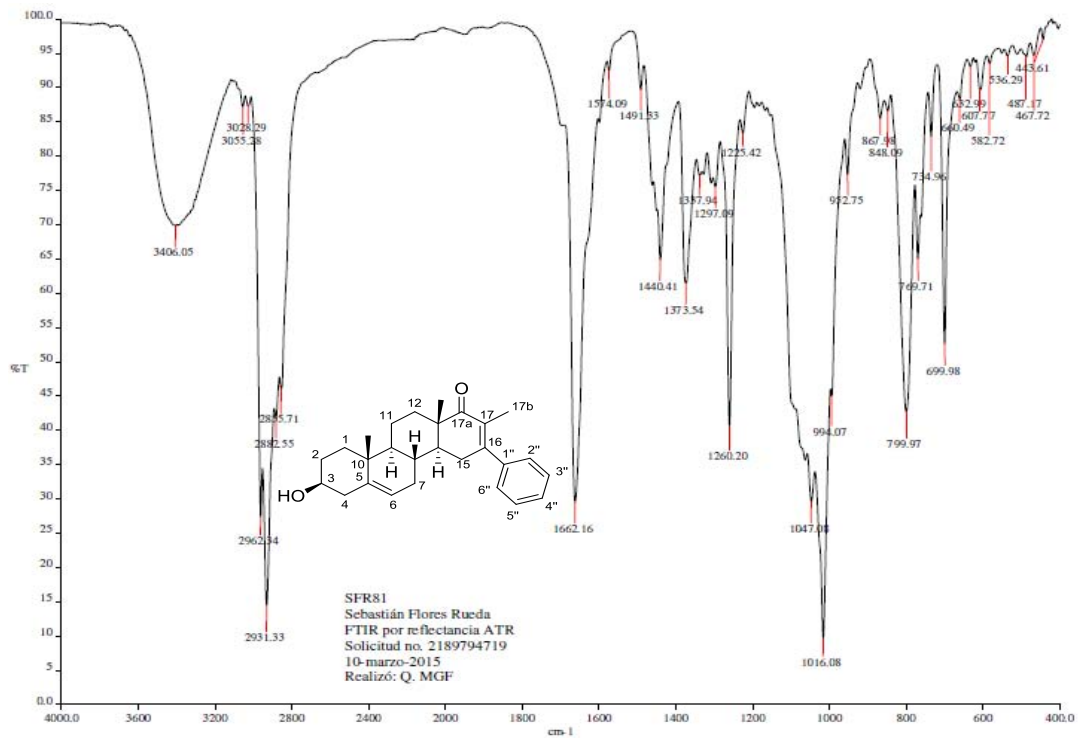


Figura A31. Espectro de IR de la 16-fenil-3 β -hidroxi-17-metil-D-homopregna-5,16-dien-17a-ona (IX).

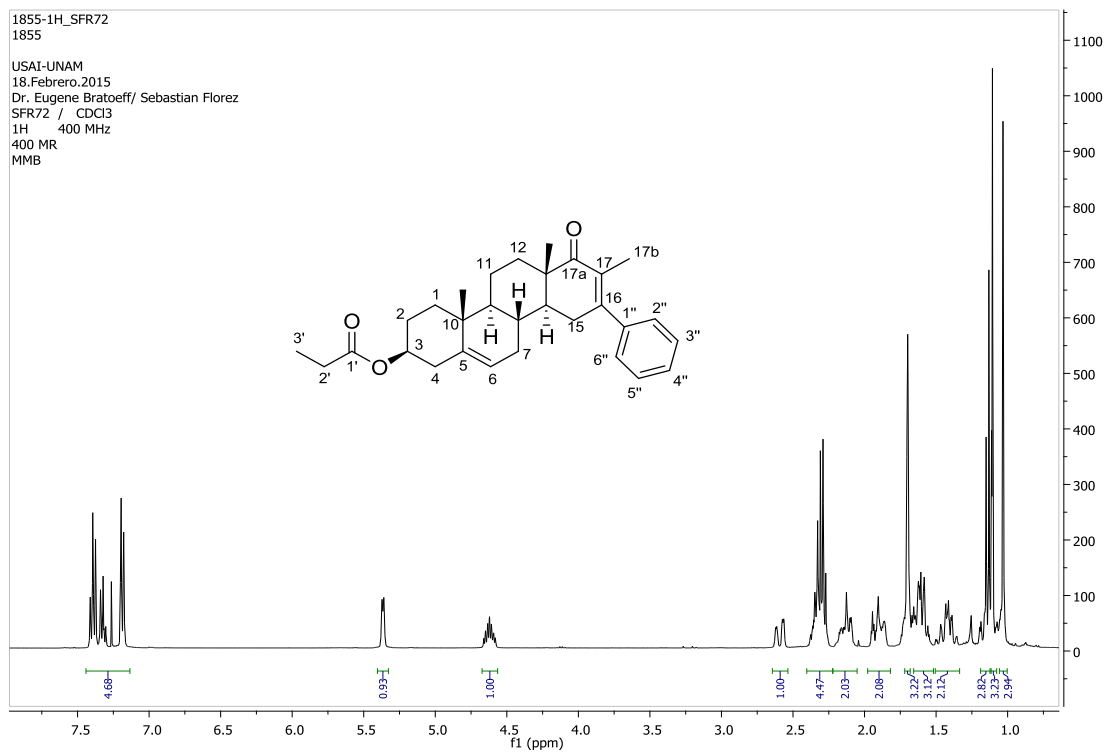


Figura A32. Espectro RMN ^1H del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xa).

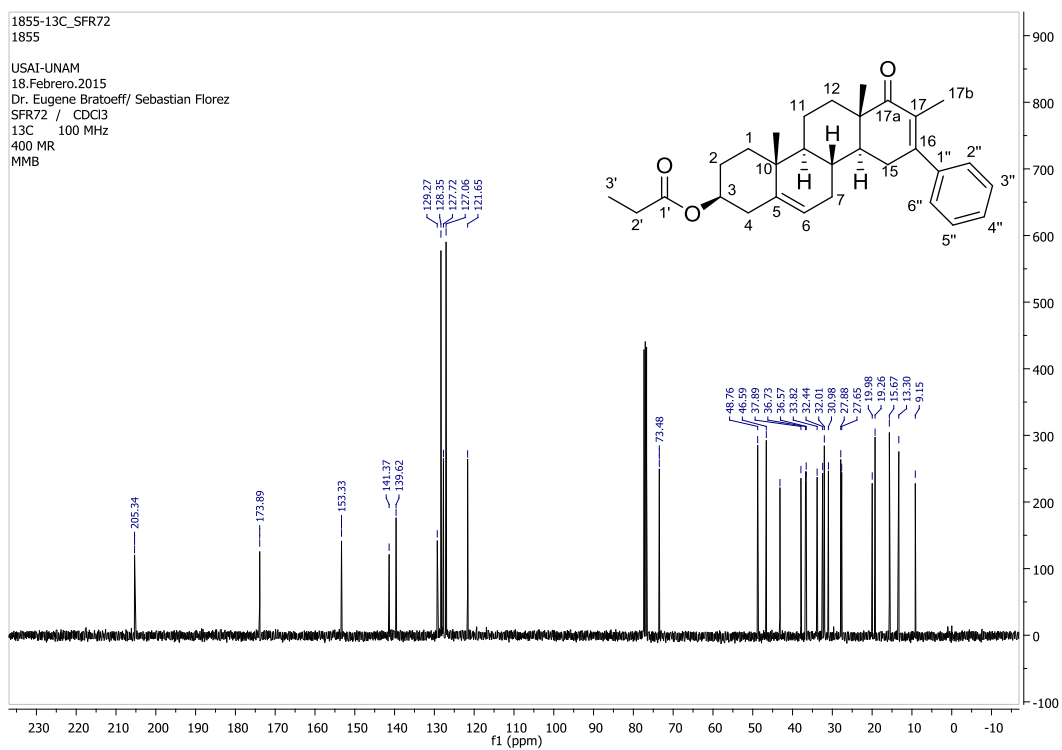


Figura A33. Espectro RMN ^{13}C del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xa).

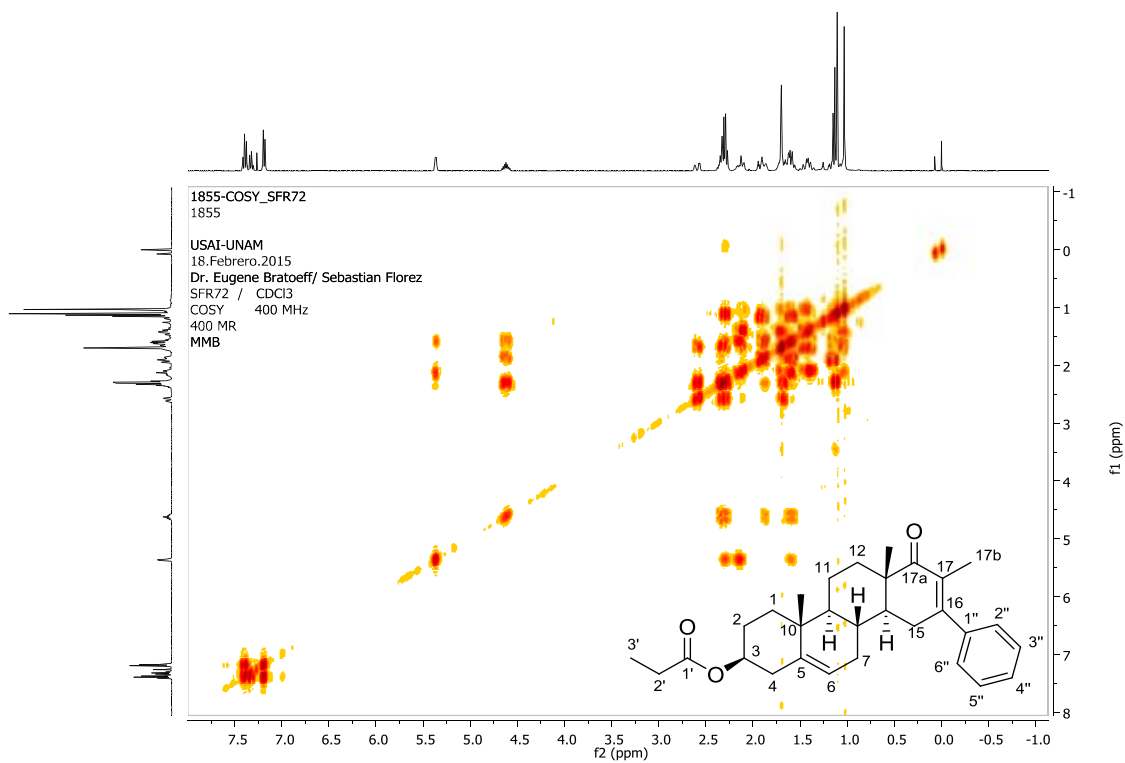


Figura A34. Espectro COSY del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xa).

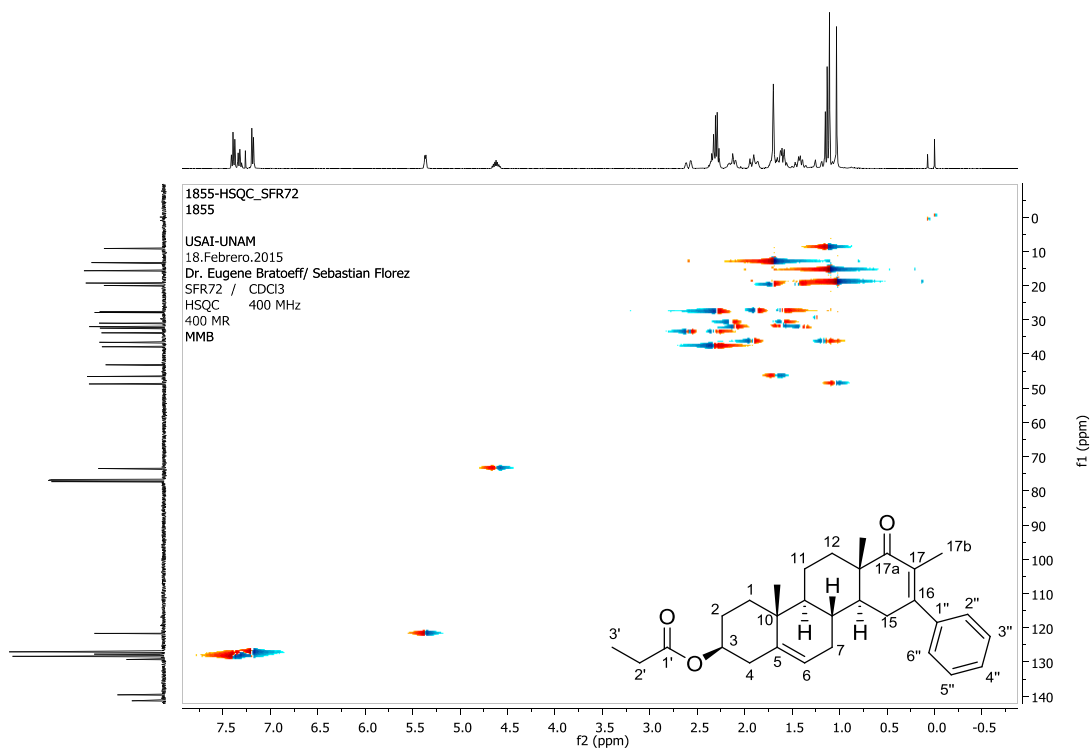


Figura A35. Espectro HSQC del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xa).

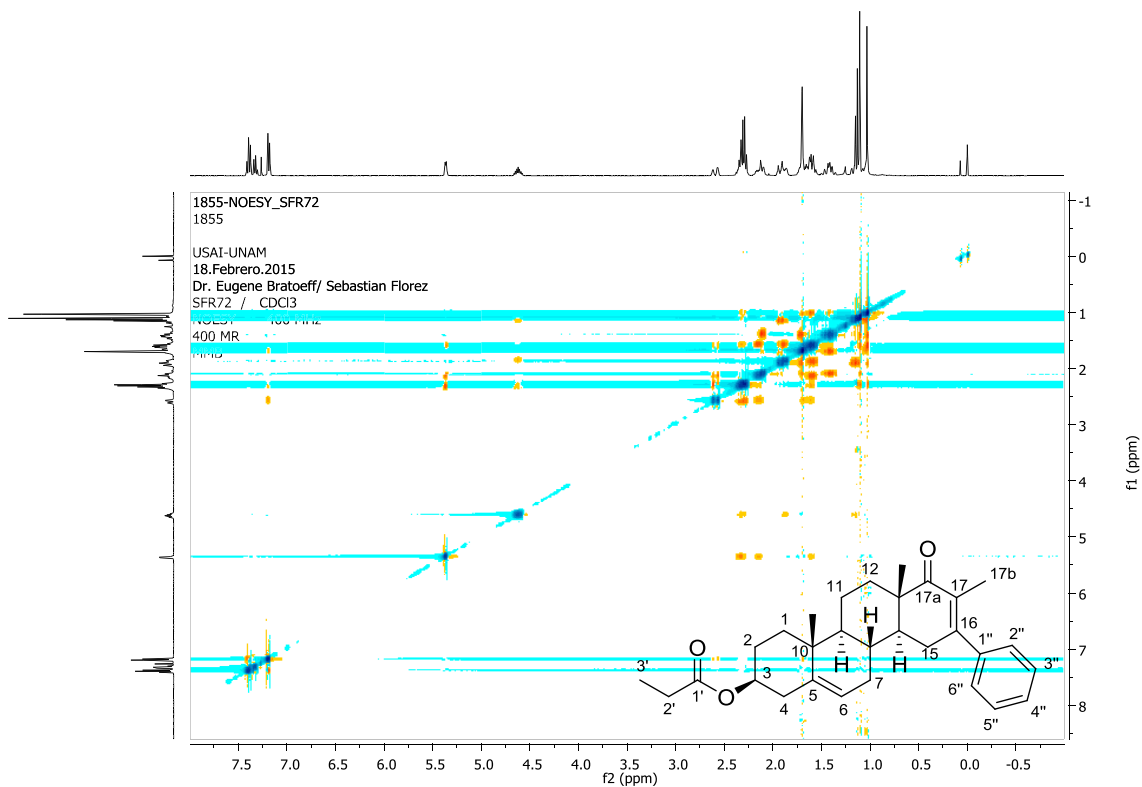


Figura A36. Espectro NOESY del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xa).

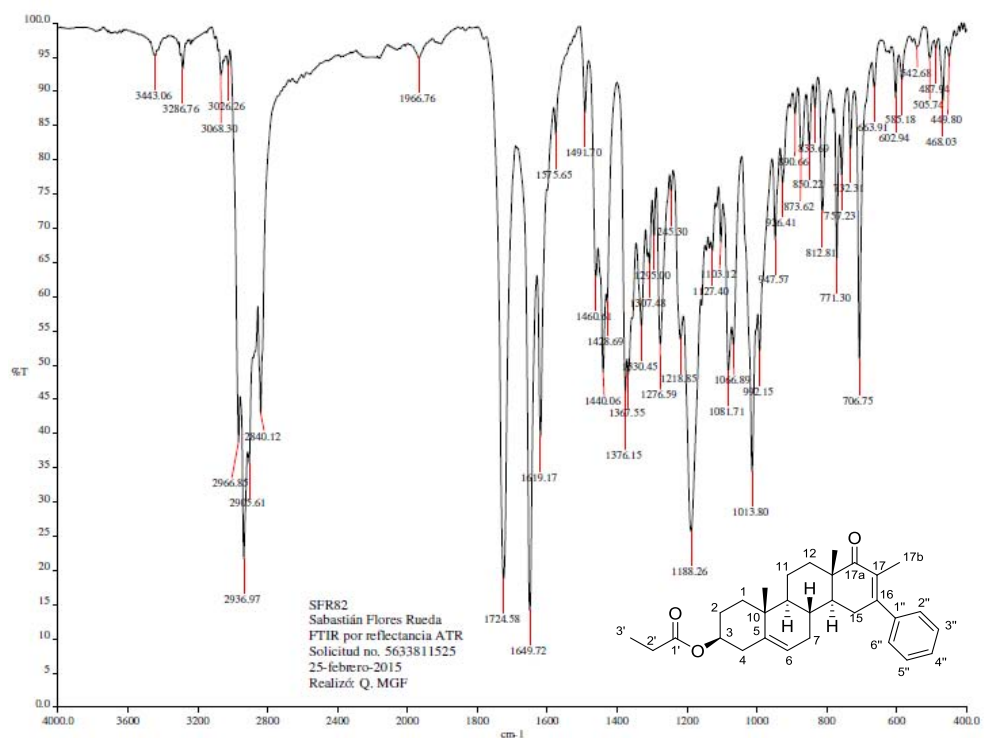


Figura A37. Espectro IR del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xa).

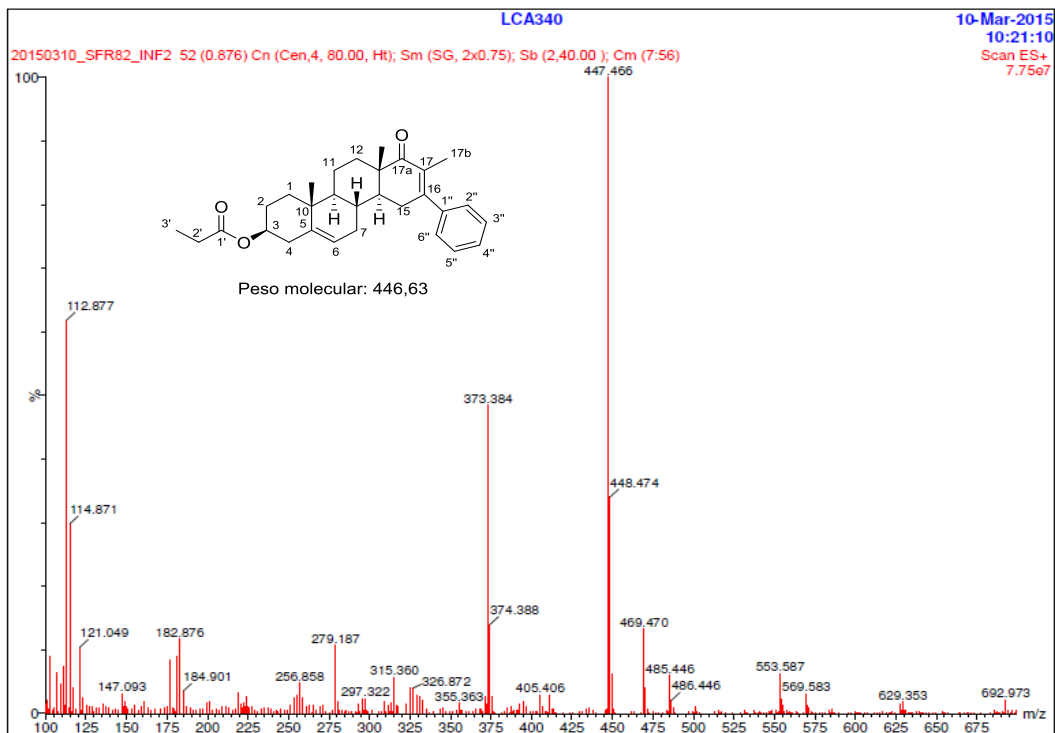


Figura A38. Espectro de masas del propionato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (Xa).

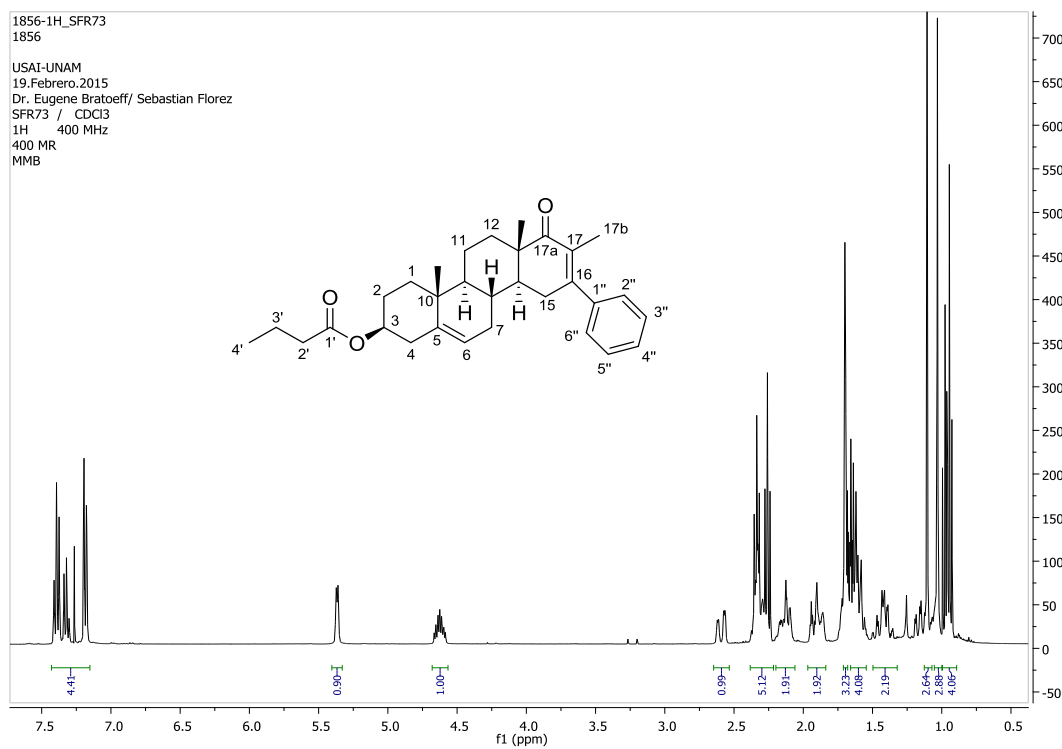


Figura A39. Espectro RMN ^1H del butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (Xb).

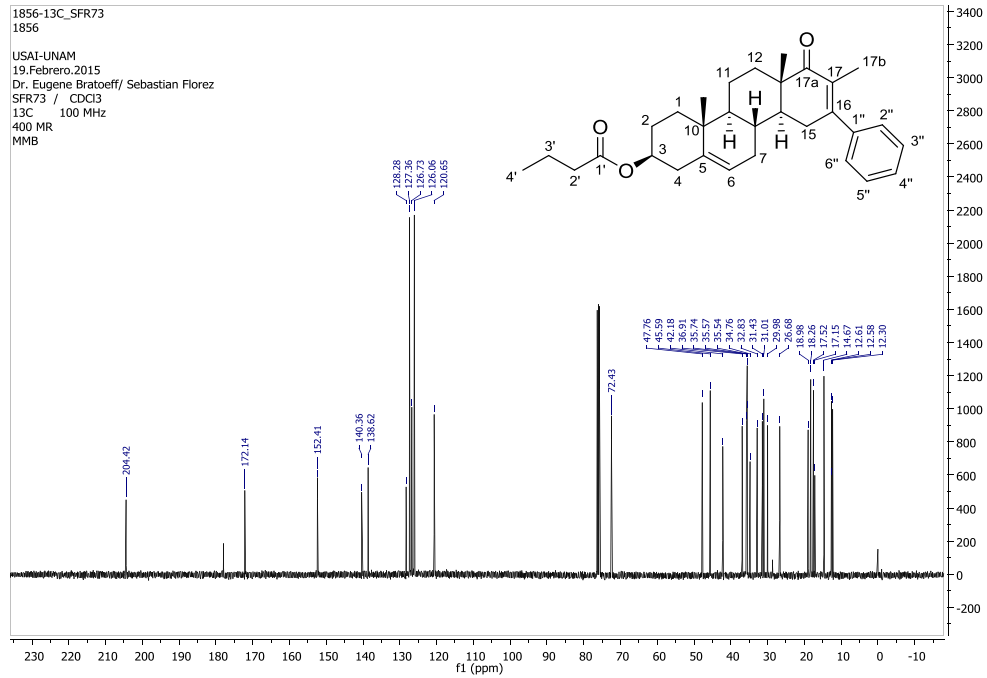


Figura A40. Espectro RMN ^{13}C del butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xb).

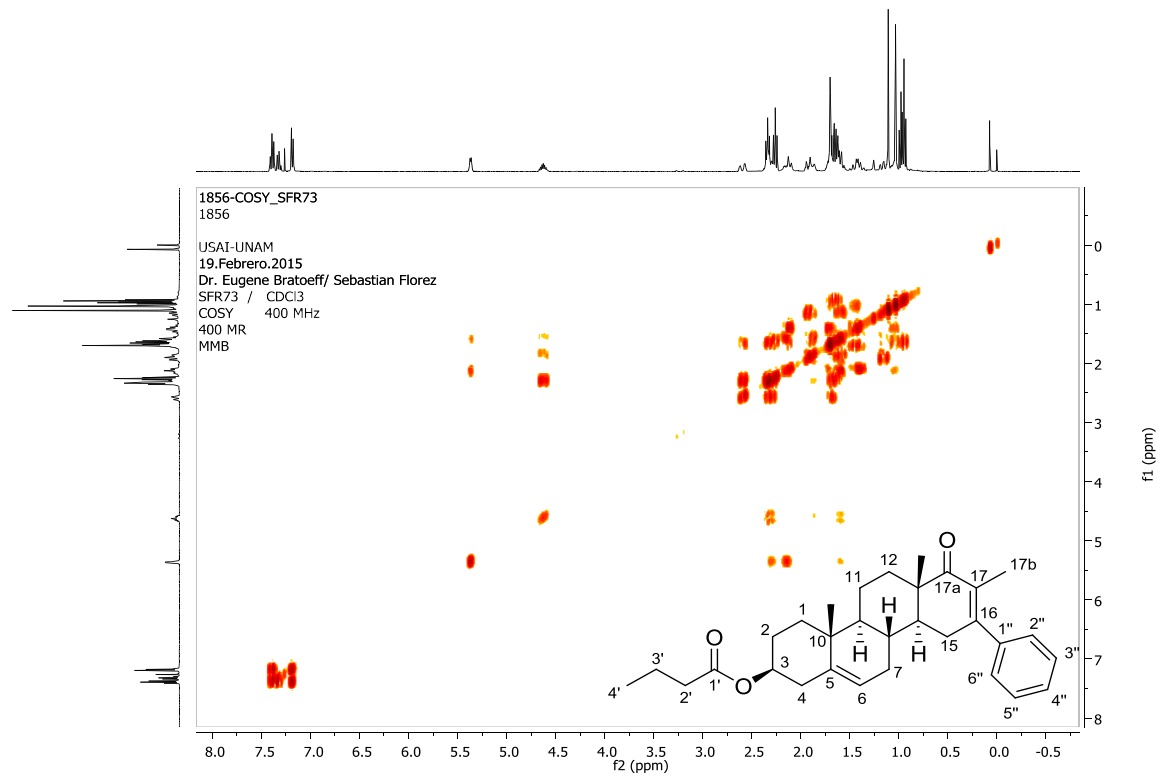


Figura A41. Espectro COSY del butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xb).

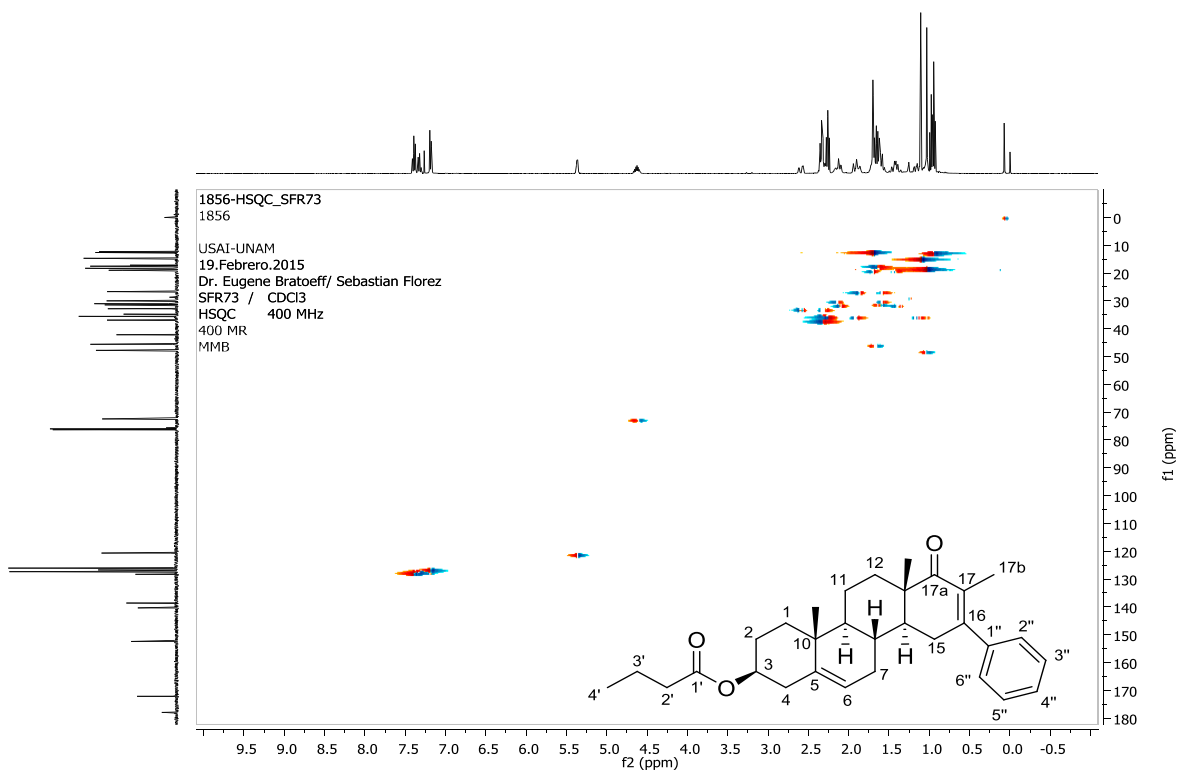


Figura A42. Espectro HSQC del butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xb).

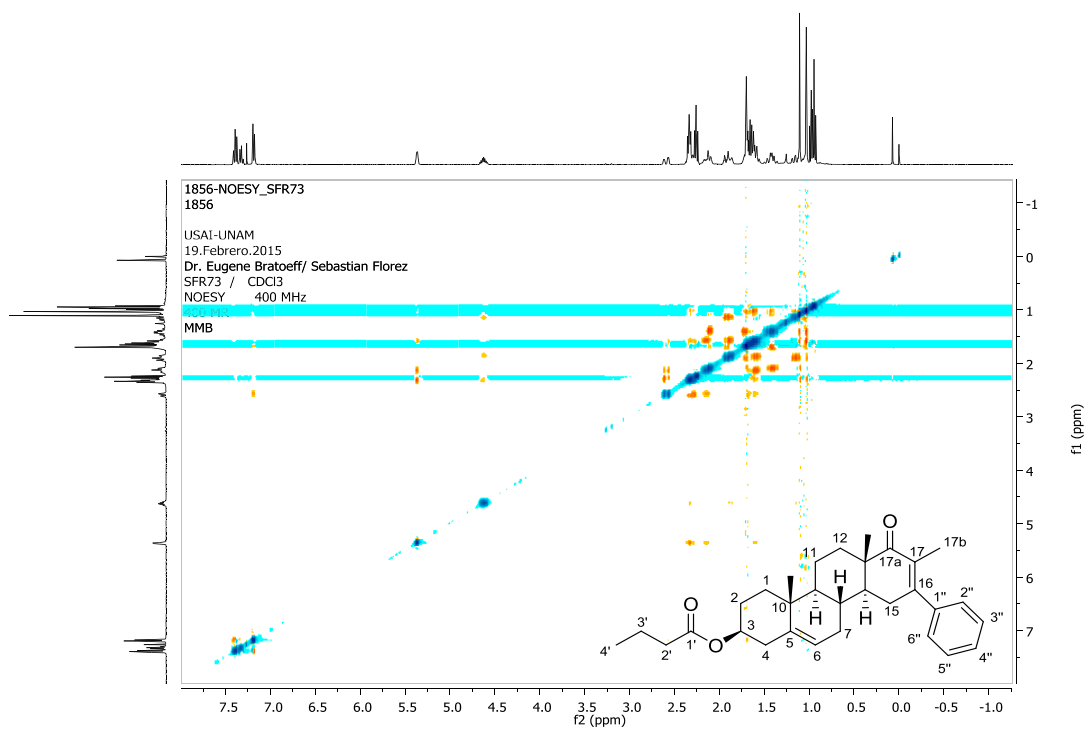


Figura A43. Espectro NOESY del butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3 β -ilo (Xb).

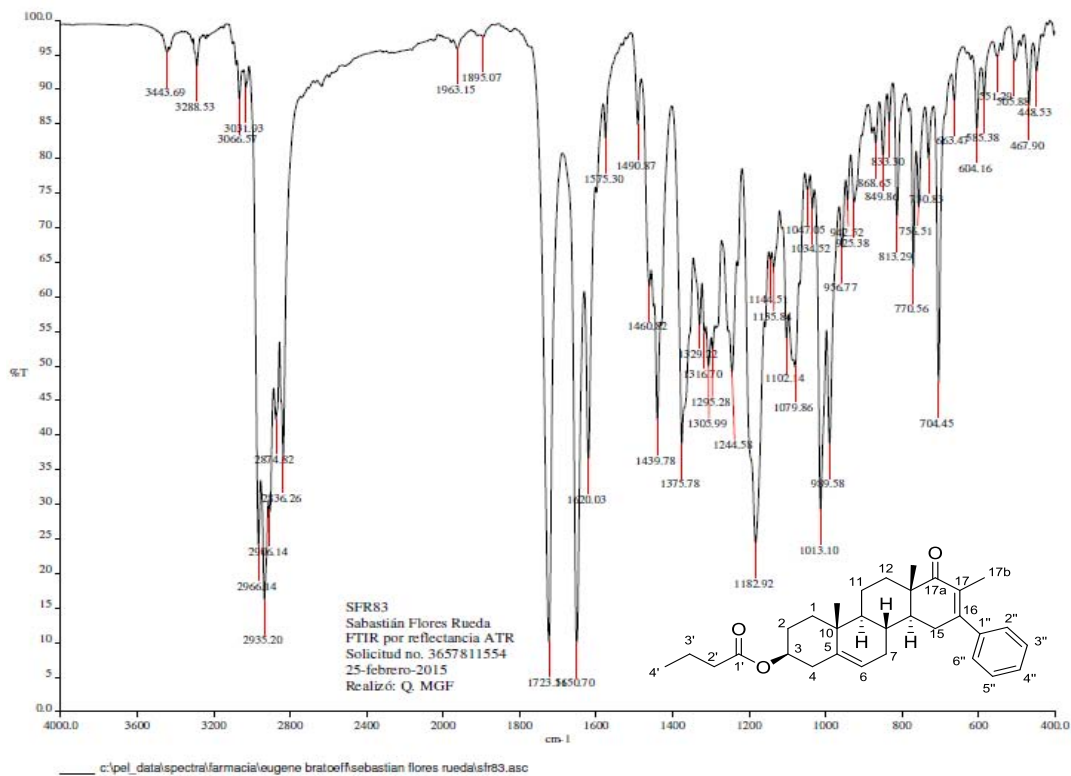


Figura A44. Espectro de IR del Butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (Xb).

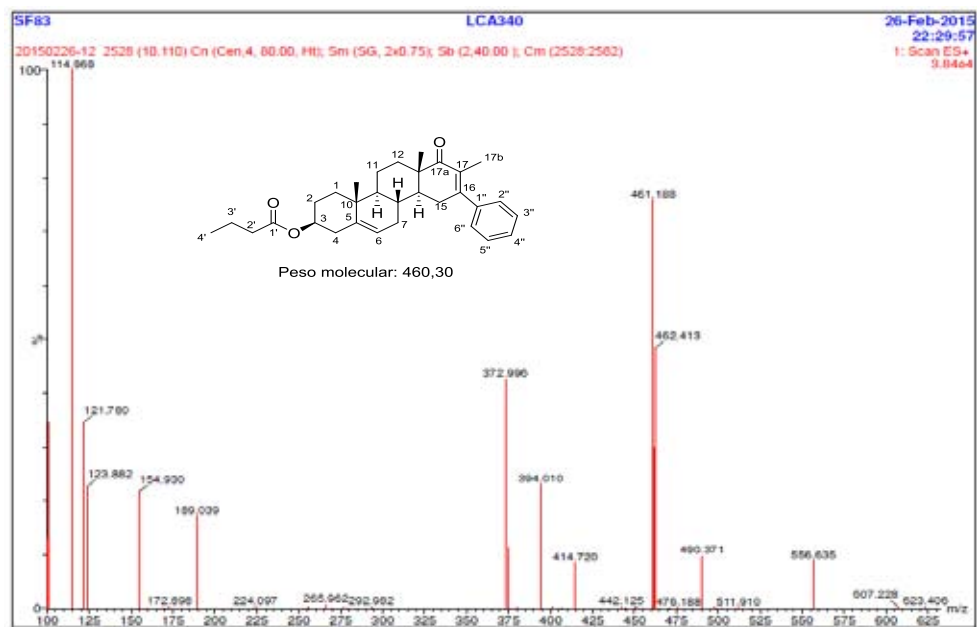


Figura A45. Espectro de masas del Butirato de 16-fenil-17-metil-17a-oxo-D-homopregna-5,16-dien-3β-ilo (Xb).