



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS DEL PREGNANO
CON UN GRUPO ÉSTER EN EL C-21 Y
EVALUACIÓN ANTIPROLIFERATIVA”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

Q.F.B. LEOBARDO IVÁN ACEVEDO HERNÁNDEZ

TUTOR: DR. EUGENE BRATOEFF[†]
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

Dr. Francisco Yuste López	Presidente
Dr. José Guillermo Penieres Carrillo	Vocal
Dr. Héctor García Ortega	Vocal
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	Vocal
Dr. Alejandro Cordero Vargas	Secretario

LUGAR DÓNDE SE LLEVÓ A CABO EL PROYECTO:

Laboratorio 125, edificio E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Unidad de Pruebas Biológicas, Instituto de Química, UNAM.

ASESOR:

Dr. Eugene Athanas Bratoeff Titeff[†]

SUPERVISOR:

Dr. Rafael Castillo Bocanegra

SUSTENTANTE:

Q.F.B. Leobardo Iván Acevedo Hernández

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la Facultad de Química por otorgarme de nueva cuenta, otra valiosa oportunidad para formarme académicamente en sus instalaciones.

Al Posgrado en Ciencias Químicas por darme la oportunidad para superarme académicamente.

Al Dr. Eugene Bratoeff[†] por la oportunidad y confianza que me brindó para pertenecer a su gran equipo de trabajo, por su apoyo y sus grandes y valiosas enseñanzas académicas, que me permitieron desarrollar este proyecto (Q.E.P.D.).

Al Dr. Rafael Castillo y a la Dra. María Alicia Hernández Campos por apoyarme incondicionalmente para poder concluir el trabajo experimental y la tesis, y por sus valiosas aportaciones tanto en el trabajo experimental como en el escrito y por hacerme sentir parte de su familia académica.

A la Dra. Elena Ramírez por toda su enseñanza, apoyo moral, cariño y amistad (aunque a larga distancia, pero ha sido muy significativo), y por creer en mí y motivarme para seguir superándome académicamente.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios para mejorar la calidad del trabajo escrito.

Al personal de USAI por la realización de la espectroscopia de IR, UV y RMN.

A la M. en C. Ma. Teresa Obdulia Ramírez Apan del IQ, por la realización de las pruebas biológicas.

A la Dra. Adela Rodríguez, Coordinadora del Posgrado en Ciencias Químicas y a la Q.F.B. Josefina Tenopala, auxiliar de la Coordinación de Posgrado, por ayudarme a concluir el trabajo de tesis, a través del apoyo brindado para obtener los resultados de espectrometría de masas en el IQ, y al personal del IQ por la realización de los espectros de masas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me brindó durante mis estudios de posgrado (Número de CVU/Becario: 510051/288829).

A los proyectos PAIP (439002) y CONACYT (CB2011/165049) por financiar este proyecto.

A mis padres y hermanos

A Alfonsina

A mis amigos de la prepa y amigos del laboratorio 125

ÍNDICE GENERAL

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE ESQUEMAS	iv
1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Hormonas Esteroideas.....	2
2.1.1. Andrógenos.....	5
2.2. Cáncer de próstata (CaP).....	5
2.3. Tratamiento del cáncer de próstata hormono-dependiente.....	7
2.3.1. Antiandrógenos.....	7
2.3.1.1. Antagonistas del receptor de andrógenos.....	8
2.3.1.2. Inhibidores de la 5 α -reductasa.....	8
2.3.3.3. Inhibidores de la enzima CYP17A1.....	10
2.4. Tratamiento del cáncer de próstata hormono-independiente.....	11
2.5. Isosterismo y Bioisosterismo.....	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
4.1. Hipótesis.....	16
4.2. Objetivos.....	16
4.2.1. Objetivos generales.....	16
4.2.2. Objetivos particulares.....	16
5. DISCUSIÓN	17
5.1. Parte química.....	17
5.1.1. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (II).....	17
5.1.2. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).....	19
5.1.3. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV).....	22
5.1.4. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V).....	24
5.1.5. Síntesis de los ésteres nicotínicos (Vla-VIe) y el éster benzoico (VIf).....	25
5.1.6. Síntesis de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VIIa).....	27
5.2. Parte biológica.....	29

5.2.1. Evaluación de la actividad antiproliferativa sobre líneas celulares de cáncer de próstata y toxicidad en células mononucleares.....	29
6. CONCLUSIONES.....	33
7. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	34
7.1. Métodos y materiales.....	34
7.2. Síntesis química.....	35
7.2.1. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (II).....	36
7.2.2. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).....	38
7.2.3. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV).....	40
7.2.4. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V).....	42
7.2.5. Síntesis de los ésteres nicotínicos (VIa-VIe).....	44
7.2.6. Síntesis de 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VI f).....	48
7.2.7. Síntesis de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VIIa).....	51
7.3. Evaluación biológica.....	54
7.3.1. Evaluación de la actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de próstata.....	54
7.3.2. Evaluación de la toxicidad en células mononucleares.....	55
7.3.3. Resultados de la evaluación de la actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de próstata y toxicidad en células mononucleares.....	56
7.4. Análisis computacional.....	57
7.4.1. Cálculo de descriptores moleculares.....	57
8. REFERENCIAS.....	58
9. ANEXO.....	61
9.1. Lista de espectros de IR, UV, RMN ¹ H, RMN ¹³ C y EM.....	61
Espectros 1-49.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
5 α -R	5 α -reductasa	HPB	Hiperplasia prostática benigna
5 α -R1	5 α -reductasa tipo 1	Hz	Hertz
5 α -R2	5 α -reductasa tipo 2	IR	Infrarrojo
Abs	Absorbancia	LH	Hormona luteinizante
AcOEt	Acetato de etilo	LNCaP	Línea celular de cáncer de próstata andrógeno-dependiente
AcOH	Ácido acético	m	Señal múltiple
CaP	Cáncer de próstata	NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina
CC	Cromatografía en columna	nm	nanómetro
CCF	Cromatografía en capa fina	p.f.	Punto de fusión
CDCl ₃	Cloroformo deuterado	PM	Peso molecular
CLog P	Coeficiente de partición calculado	ppm	partes por millón
CMN	Células mononucleares	PC-3	Línea celular de cáncer de próstata andrógeno-independiente
d	Señal doble	PSA	Área superficial polar
DART	Análisis directo en tiempo real	RA	Receptor de andrógenos
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida	RHEs	Receptores de hormonas esteroideas
DCM	Diclorometano	RMN ¹³ C	Resonancia magnética de carbono 13
DCU	Diciclohexilurea	RMN ¹ H	Resonancia magnética de protón
dd	Señal doble de doble	T	Testosterona
DHT	5 α -dihidrotestosterona	Tris	tris(hidroxitometil)aminometano
DIB	Diacetoxiyodobenceno	s	Señal sencilla
DMAP	4-(dimetilamino)piridina	SA	Sin actividad
DMSO	Sulfóxido de dimetilo	SRB	Sulforrodamina B
DO	Densidad óptica	t	Señal triple
ERA	Elementos de respuesta a andrógenos	TMS	Tetrametilsilano
ERH	Elementos de respuesta a hormonas	UV	Ultravioleta
EM	Espectrometría de masas		
FAB	Bombardeo de átomos rápidos		
FSH	Hormona folículo estimulante		
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina		

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno.....	2
Figura 2. Principales hormonas esteroideas y su clasificación.....	3
Figura 3. Esquema simplificado que muestra el mecanismo general de acción de las hormonas esteroideas.....	4
Figura 4. Biosíntesis de las hormonas esteroideas a partir del colesterol.....	5
Figura 5. Anatomía normal de la próstata.....	6
Figura 6. Mecanismo de acción de los andrógenos (T y DHT) sobre las células epiteliales de próstata.....	7
Figura 7. Antagonistas del RA.....	8
Figura 8. Inhibidores de la 5 α -reductasa.....	10
Figura 9. Inhibidores de la enzima CYP17A1.....	10
Figura 10. Ejemplos de isósteros clásicos.....	12
Figura 11. Ejemplos de especies isósteras según la ley de desplazamiento de “hidruro” de Grimm	12
Figura 12. Derivados de la pregnenolona con un grupo éster en C-3 que representan un ejemplo de bioisosterismo empleando un intercambio de anillos equivalentes.....	13
Figura 13. Características estructurales de los ésteres derivados de la 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona y ácidos nicotínicos sustituidos propuestos para ser sintetizados.....	15
Figura 14. Comparación de los compuestos intermediarios y finales y el compuesto de referencia respecto al porcentaje de inhibición del crecimiento de las líneas celulares de cáncer de próstata y células mononucleares.....	29
Figura 15. Comparación de la actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares de cáncer de próstata de los compuestos III , V y Vla-Vlf respecto al log P calculado.....	32
Figura 16. Estructura y numeración del compuesto II	36
Figura 17. Estructura y numeración del compuesto III	38
Figura 18. Estructura y numeración del compuesto IV	40
Figura 19. Estructura y numeración del compuesto V	42
Figura 20. Estructura general y numeración de los compuestos finales Vla-Vle	44
Figura 21. Estructura y numeración del compuesto Vlf	48
Figura 22. Estructura y numeración del compuesto Vlla	51

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto intermediario II ...	36
Tabla 2. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto intermediario III ..	38
Tabla 3. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto intermediario IV ..	40
Tabla 4. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto intermediario V ...	42
Tabla 5. Constantes físicas de los compuestos Vla-Vie	44
Tabla 6. Señales características de IR de los productos finales Vla-Vie	45
Tabla 7. Señales características de RMN ¹ H de los productos finales Vla-Vie	45
Tabla 8. Señales características de RMN ¹³ C de los productos finales Vla-Vie	46
Tabla 9. Señales características de EM de los productos finales Vla-Vie	47
Tabla 10. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto final Vlf	48
Tabla 11. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto final Vlla	51
Tabla 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las líneas celulares de cáncer de próstata y de células mononucleares por cada compuesto evaluado.....	56
Tabla 13. Descriptores moleculares calculados para los compuestos intermediarios y finales.....	57

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Reacción de reducción de T (7) a DHT (8) catalizada por la enzima 5 α -reductasa (5 α -R).....	8
Esquema 2. Mecanismo de reacción de la 5 α -reductasa para la conversión de T (7) a DHT (8).....	9
Esquema 3. Método general para la síntesis del intermediario II.....	17
Esquema 4. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención del intermediario II.....	18
Esquema 5. Método general para la síntesis del intermediario III.....	19
Esquema 6. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención del intermediario III. A) Oxidación del alcohol en C-3 del esteroide. B) Migración del enlace doble de C-5 y C-6 hacia C-3 y C-4.....	20
Esquema 7. Método general para la síntesis del intermediario IV.....	22
Esquema 8. Mecanismo propuesto para la obtención del intermediario IV.....	23
Esquema 9. Método general para la síntesis del intermediario V.....	24
Esquema 10. Método general para la síntesis de los productos finales Vla-Vlf	25
Esquema 11. Mecanismo propuesto para la obtención de los compuestos finales Vla-Vlf	26
Esquema 12. Método general para la síntesis del producto final Vlla	27
Esquema 13. Mecanismo propuesto para la obtención del compuesto final Vlla	28
Esquema 14. Ruta sintética general para la obtención de los productos finales (Vla-Vlf) y (Vlla).....	35

1. RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo la síntesis de una serie de cinco ésteres derivados del ácido nicotínico y la 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona como 21-(pirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vla**), 21-(6-cloropirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vlb**), 21-(6-bromopirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vlc**), 21-(6-metilpirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vld**), 21-(6-metoxipirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vle**). Adicionalmente, se sintetizó un éster benzoico, bioisómero del compuesto **Vla**, como la 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vlf**) y un derivado de **Vla**: 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (**Vlla**).

Por otro lado, se determinó la actividad antiproliferativa de los compuestos **III,V, Vla-Vlf** y **Vlla** frente a dos líneas celulares de cáncer de próstata humano (PC-3 y LNCaP). Donde se observó que el reemplazo de un hidrógeno por un grupo hidroxilo en C-21 incrementó considerablemente su actividad frente a ambas líneas cancerosas (compuesto **V**). También se observó que el bloqueo del grupo hidroxilo en C-21 por un grupo éster aromático, disminuyó drásticamente la actividad del compuesto **V**. Cabe resaltar que el compuesto **V** exhibió una actividad comparable respecto a la flutamida frente a LNCaP y mucho mayor sobre PC-3. Al comparar los bioisómeros **Vla** y **Vlf**, se observó una mejora en la actividad antiproliferativa sobre PC-3, con base en el reemplazo isostérico del anillo benzoico por el anillo piridínico. Se comparó la actividad entre los ésteres nicotínicos (**Vla-Vle**) y se observó que el compuesto **Vle** resultó tener la mayor actividad frente a ambos tipos celulares, casi comparable con el compuesto **V**. Finalmente, se determinó que al eliminar el grupo epóxido entre C-16 y C-17, se exhibió un incremento considerable en la actividad antiproliferativa.

De forma complementaria, se realizó un estudio de relación estructura-actividad (SAR) y se determinó que el descriptor molecular que más se correlacionó con los resultados biológicos fue el coeficiente de partición calculado (Clog P).

Finalmente, se observó que los compuestos **V** y **Vlla** fueron los más potentes pero no selectivos y los compuestos **Vla** y **Vlb** fueron selectivos frente a PC-3 pero mostraron una baja actividad, lo que da pauta para seguir estudiando este tipo de derivados, con la finalidad de encontrar agentes terapéuticos que puedan ser empleados en el tratamiento de cáncer de próstata hormono-independiente. Además, se observó que ninguno de los compuestos sintetizados mostró toxicidad sobre células sanas (CMN) a una concentración de 50 μ M, lo que corroboró el bajo perfil toxicológico de los compuestos sintetizados basados en el diseño propuesto.

2. ANTECEDENTES

2.1. Hormonas esteroideas

Los esteroides son un grupo de compuestos naturales que son ampliamente utilizados como antiinflamatorios, diuréticos, anabolizantes, anticonceptivos, antiandrogénicos, progestacionales, anticancerígenos, entre otras aplicaciones.¹ El grupo de los esteroides está constituido por una gran variedad de compuestos, entre los cuales destacan los derivados del colesterol y otros esteroides, los ácidos biliares, las hormonas esteroideas y los cardiotónicos (digitalinas), entre otros.²

Los esteroides son moléculas policíclicas complejas, cuyas estructuras están basadas en un sistema tetracíclico comúnmente denominado ciclopentanoperhidrofenantreno. Los cuatro anillos tienen asignadas las letras A, B, C y D, comenzado por el anillo inferior izquierdo; los anillos A, B y C son de seis miembros y el anillo D es de cinco. Los átomos de carbono se numeran a partir del anillo A y terminando con los dos grupos metilos angulares (1).^{3,4} Los esteroides se caracterizan por ser moléculas rígidas que presentan una estereoquímica transoide, cuya conformación de silla es la más estable.³ Si el esteroide presenta en su estructura dos metilos, sobre C-10 y otro en C-13, pertenece al grupo de los *androstanos* (2); si sólo presenta un metilo sobre C-13 y no en C-10, son *estrano*s (3); y si exhibe ambos metilos y una cadena lateral de longitud de dos carbonos sobre C-17, se les denomina como *pregnanos* (4).⁵ (Figura 1)

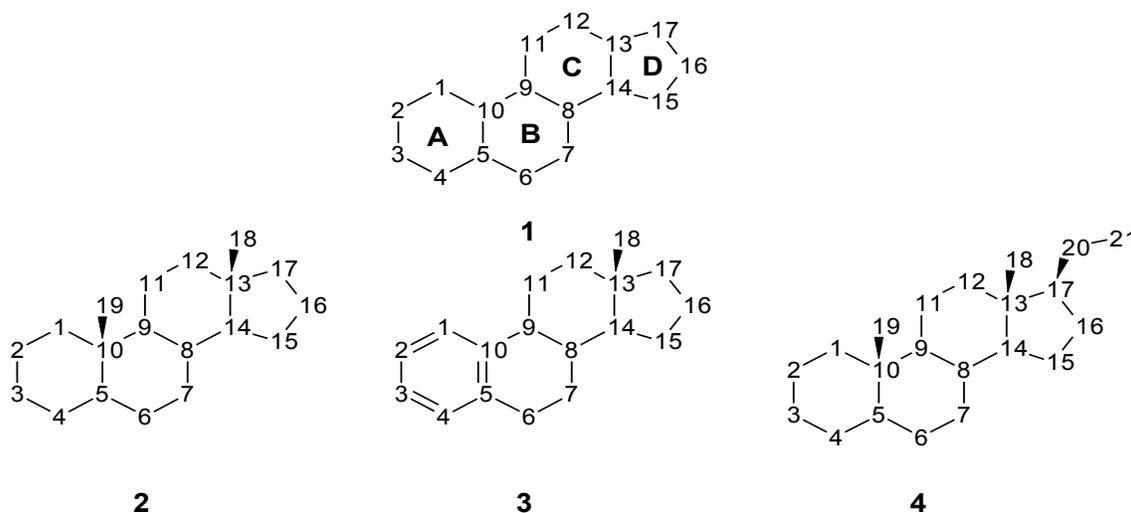


Figura 1. Núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno. Designación general de anillos y numeración de carbonos (1); androstanos (2), estranos (3) y pregnanos (4).

Las hormonas esteroideas (Figura 2) son un conjunto de moléculas sintetizadas por distintas glándulas y transportadas por el torrente sanguíneo hacia sus respectivos tejidos diana, para estimular o inhibir algún proceso. Las hormonas esteroideas cumplen con funciones fisiológicas muy importantes

tales como la regulación de la proliferación celular y la diferenciación de los distintos tejidos, la regulación del equilibrio hidroelectrolítico o el metabolismo, entre otras.⁶

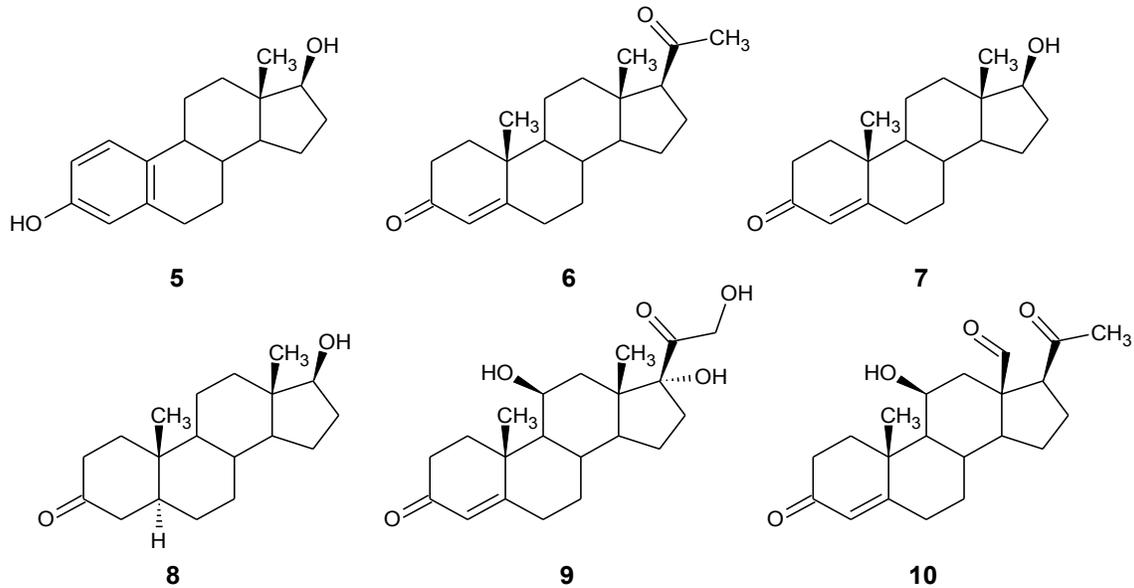


Figura 2. Principales hormonas esteroideas y su clasificación: estradiol (**5**, estrógeno), progesterona (**6**, progestágeno), testosterona (**7**, andrógeno), 5 α -dihidrotestosterona (**8**, andrógeno), cortisol (**9**, glucocorticoide) y aldosterona (**10**, mineralcorticoide).

El mecanismo de acción de las hormonas esteroideas consiste en la regulación de la expresión génica en las células diana a través de la formación de complejos con los receptores de hormonas esteroideas (RHEs), los cuales son proteínas específicas localizadas inicialmente en el citoplasma, cuya asociación con la hormona da lugar a un complejo hormona-receptor, el cual se transloca hacia el núcleo e interacciona con regiones concretas del ADN denominadas elementos de respuesta a hormonas (ERH). Esta interacción activa o inhibe el proceso de transcripción y, como consecuencia, modifica la síntesis de proteínas (Figura 3).⁶⁻⁸

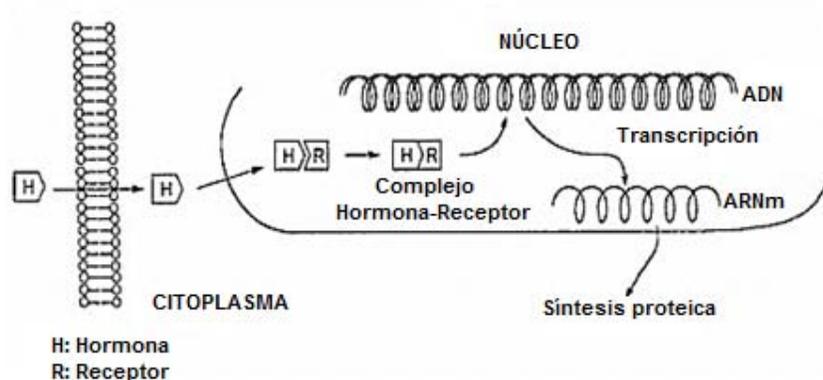


Figura 3. Esquema simplificado que muestra el mecanismo general de acción de las hormonas esteroideas.⁷

Se puede observar que existe una gran similitud estructural entre las diversas hormonas esteroideas, debido a que todas tienen como precursor metabólico al colesterol. La biosíntesis de las hormonas esteroideas se lleva a cabo mediante una serie de reacciones enzimáticas como se muestra en la Figura 4.⁷

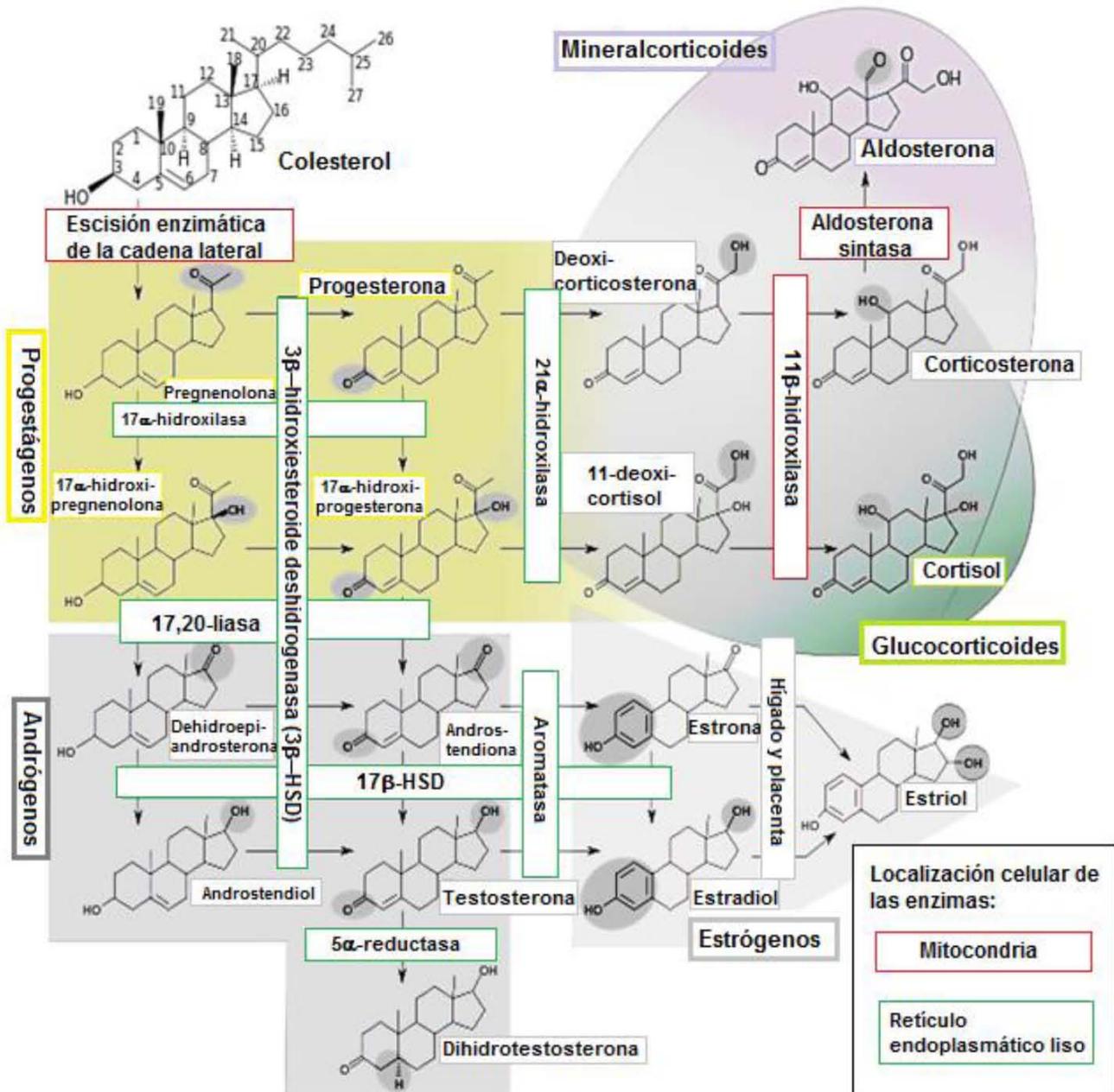


Figura 4. Biosíntesis de las hormonas esteroideas a partir del colesterol.

2.1.1. Andrógenos

Los andrógenos son importantes hormonas esteroidales implicadas en la expresión del fenotipo masculino.⁸ Los andrógenos son producidos en las células de Leydig en el testículo, siendo los más importantes la testosterona (**7**, T) y la 5 α -dihidrotestosterona (**8**, DHT).⁹ La síntesis de los andrógenos se regula por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, donde las señales hormonales procedentes del hipotálamo por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), a través de la secreción hipofisaria de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), estimulan a las células de Leydig para inducir la síntesis de T.^{9,10} La T liberada pasa a la circulación sanguínea, unida a la albúmina o a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), o también en forma libre, para alcanzar sus órganos blancos y ejercer sus efectos.⁹

Los andrógenos, tanto T como DHT, llevan a cabo sus acciones biológicas a través de la unión a los receptores de andrógenos (RA) en los respectivos órganos diana, uno de ellos es la próstata.⁸

2.2. Cáncer de próstata (CaP)

La próstata es una glándula que pertenece al sistema reproductor masculino (Figura 5). El tamaño de la próstata se modifica con la edad donde su crecimiento es rápido durante la pubertad y promovido por el aumento de andrógenos (T y DHT). En los hombres más jóvenes, la próstata es del tamaño aproximado de una nuez mientras que comienza a aumentar lentamente de tamaño después de los 50 años. La función de la próstata consiste en producir el líquido que protege y nutre a los espermatozoides presentes en el semen.^{11,12}

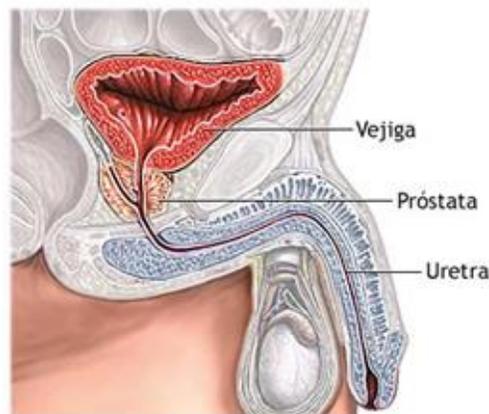


Figura 5. Anatomía normal de la próstata.

La próstata es una glándula cuyo desarrollo y crecimiento depende de la acción de los andrógenos, principalmente de DHT. El efecto de los andrógenos inicia con el transporte de la T desde la circulación hacia la próstata, ahí T es biotransformada a DHT (hormona con mayor potencia y afinidad hacia el RA) en el estroma, por acción de la enzima 5 α -reductasa (5 α -R) y transportada por

difusión pasiva hacia el citoplasma de la célula epitelial. Dentro de las células epiteliales prostáticas, T y DHT (la T también puede ser metabolizada a DHT) se unen al RA, éste sufre un cambio conformacional y el complejo andrógeno-receptor se transloca hacia el núcleo. En el núcleo, el RA se dimeriza y se une a secuencias específicas del ADN conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ERA), para llevar a cabo la transcripción, y posteriormente llevar a cabo la síntesis de las proteínas. El RA también interactúa con co-activadores o co-represores que incrementan o disminuyen su actividad, respectivamente, cuyo resultado es la regulación de la expresión de varios genes que conllevan a la síntesis de proteínas implicadas en el desarrollo y mantenimiento del tamaño y función secretora de la próstata (Figura 6).⁹

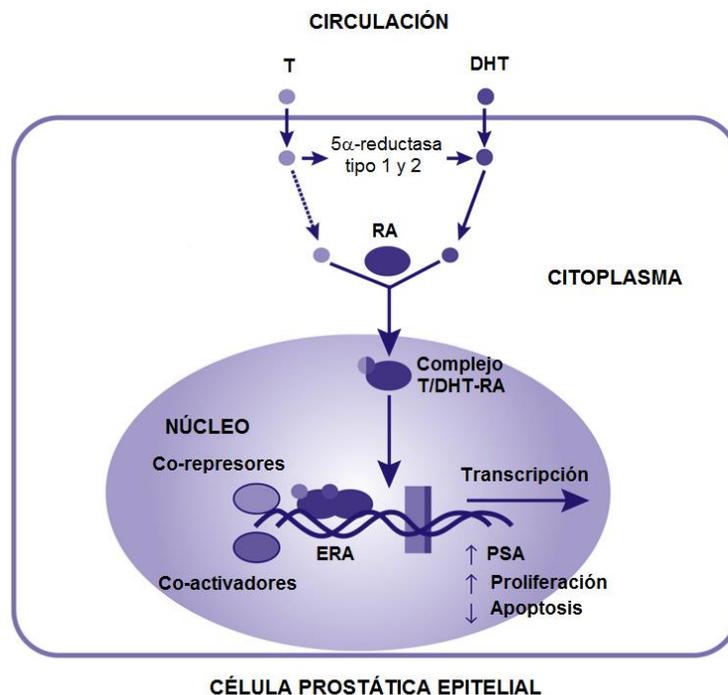


Figura 6. Mecanismo de acción de los andrógenos (T y DHT) sobre las células epiteliales de próstata (Traducido y adaptado de Rittmaster, R. 5α-reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer risk reduction. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008, 22(2), 391).

A pesar de que el RA regula los efectos biológicos de los andrógenos para el desarrollo normal de las células epiteliales de próstata, se ha observado que también participan en el desarrollo y progresión de patologías como la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el cáncer de próstata (CaP).⁹ En dichas patologías, el mecanismo de balance entre el crecimiento y apoptosis de las células epiteliales está alterado y la expresión de andrógenos causa el crecimiento desproporcionado de las mismas.¹³

Desde el punto de vista epidemiológico, es de gran interés el estudio del CaP debido a que es una de las principales causas de muerte en varones mayores de 50 años.⁹ De acuerdo a estadísticas de nuestro país, en el 2009 el 9.3% de los pacientes con dicho padecimiento tenían entre 70 y 74 años de edad, mientras que el 19.7% era mayor de 80. En el 2012, el CaP ocupó el segundo lugar con 7.6% del total de defunciones y representó la primer causa de muerte en varones con el 15.3% de defunciones.^{14,15}

2.3. Tratamiento del cáncer de próstata hormono-dependiente

El CaP es muy sensible a la privación androgénica en su fase inicial (fase andrógeno-dependiente), debido a que las células prostáticas requieren del estímulo de los andrógenos (T y DHT) para su crecimiento y diferenciación.¹⁶ Debido a esta hormono-dependencia, en etapas tempranas, se recurre a la cirugía (castración quirúrgica) o la *terapia hormonal (terapia de privación de andrógenos)*. El objetivo de estos tratamientos es reducir los niveles de andrógenos o bloquear la acción de los mismos sobre las células cancerosas.^{16,17} Aunque la cirugía representa el tratamiento más aceptable para el CaP, ésta produce una gran aprensión entre la población masculina, por lo que se han desarrollado otros tratamientos para este padecimiento.¹⁸

Los métodos farmacológicos más importantes disponibles en nuestros días son el empleo de inhibidores de la producción de andrógenos producida por agonistas del factor liberador de gonadotropinas hipotalámico y los antiandrógenos.¹⁸

En este trabajo se profundizará sobre el estudio de los antiandrógenos debido a que son de gran interés en nuestro laboratorio.

2.3.1. Antiandrógenos

Los antiandrógenos son aquellos que contrarrestan la acción de los andrógenos al interferir con la síntesis de los mismos o al bloquear su acción sobre las células prostáticas. El uso de antiandrógenos como tratamiento para el CaP representa una alternativa importante para competir con la cirugía de próstata, la cual está asociada a varios efectos colaterales y es considerada como la cirugía más temida por los hombres. Existen tanto compuestos esteroideos como no esteroideos que muestran efectos antiandrogénicos como: a) antagonistas del receptor de andrógeno, b) inhibidores de la conversión de T a DHT por la enzima 5 α -reductasa e c) inhibidores de la enzima CYP17-A1.^{10,18}

2.3.1.1. Antagonistas del receptor de andrógenos

Los antagonistas de andrógenos ofrecen una herramienta potencialmente útil para el tratamiento del CaP e HPB. El mecanismo de acción consiste en la competencia con los andrógenos, por los sitios de unión a la molécula receptora (RA).^{10,18}

Los antiandrógenos pueden ser de origen esteroideo como el acetato de ciproterona (**11**) y no esteroideo como la flutamida (**12**), bicalutamida (**13**), nilutamida (**14**) y enzalutamida (**15**) (Figura 7). El acetato de ciproterona (**11**) es una progestina modificada con potente actividad antiandrogénica, debido a que ha mostrado que compite con la DHT por el RA, por el que tiene una alta afinidad.¹⁸

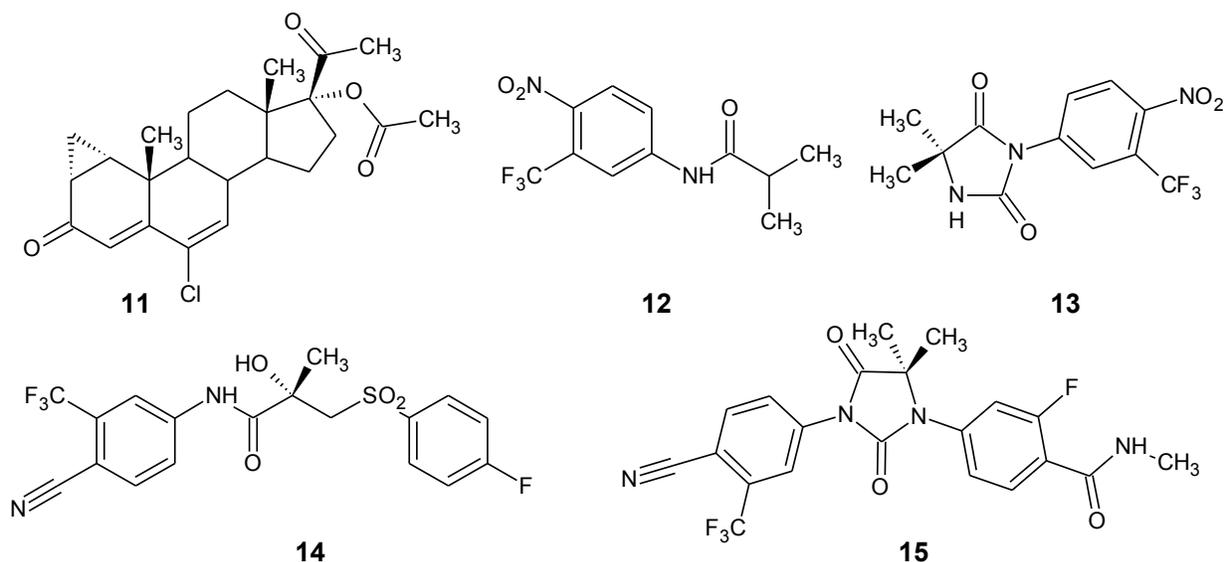
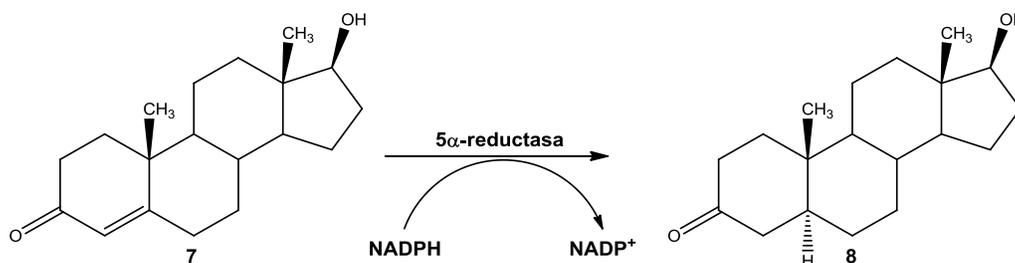


Figura 7. Antagonistas del RA: acetato de ciproterona (**11**), flutamida (**12**), nilutamida (**13**), bicalutamida (**14**) y enzalutamida (**15**).¹⁸

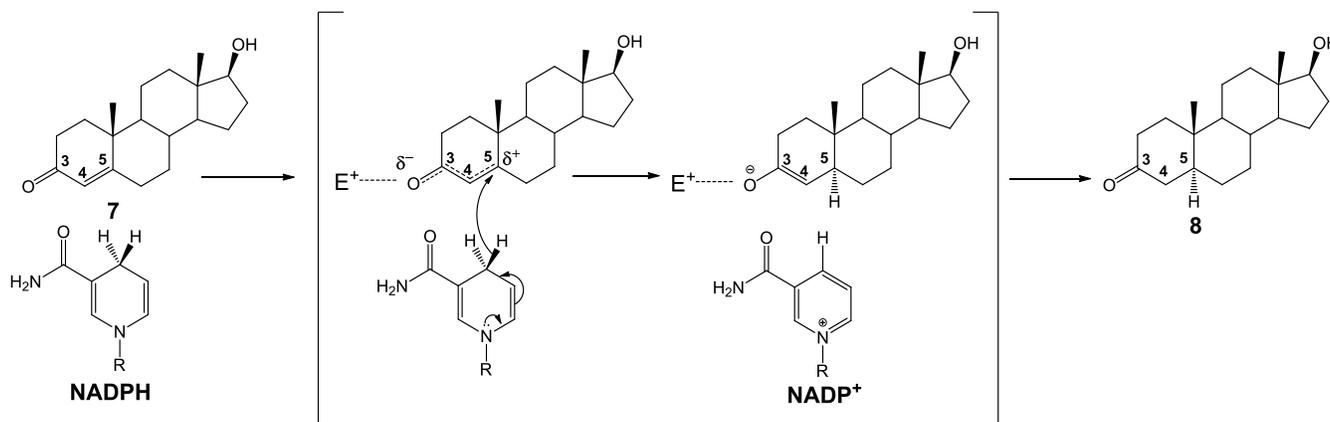
2.3.1.2. Inhibidores de la 5 α -reductasa

La enzima microsomal 5 α -reductasa (3-oxo-esteroide-4-eno-deshidrogenasa) cataliza la reducción dependiente de NADPH de una variedad de 3-oxo- Δ^4 esteroides, principalmente, cataliza la conversión de T (**7**) a DHT (**8**) (Esquema 1).^{18,19}



Esquema 1. Reacción de reducción de T (**7**) a DHT (**8**) catalizada por la enzima 5 α -reductasa (5 α -R).

El mecanismo de reacción de la 5 α -R involucra la donación directa de un hidruro del NADPH a la posición 5 α de la T, lo que permite la formación del enolato en C-3 y C-4. El enolato podría ser estabilizado por algún residuo electrofílico (E^+) en el sitio activo. Este proceso podría visualizarse como la activación de la enona por el E^+ permitiendo la aparición de una especie polarizada la cual acepta el hidruro procedente del NADPH en C-5. La enzima permite la formación del producto, la DHT, con la liberación del $NADP^+$ (Esquema 2).¹⁸



Esquema 2. Mecanismo de reacción de la 5 α -reductasa para la conversión de T (7) a DHT (8) (Adaptado de Liu, J.; Kurashiki, K.; Shimizu, K.; Kondo, R. Structure–activity relationship for inhibition of 5 α -reductase by triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8657).

En la actualidad se ha demostrado que existen 2 tipos de isoenzimas: la 5 α -reductasa tipo 1 (5 α -R1) y la 5 α -reductasa tipo 2 (5 α -R2). La 5 α -R1 predomina en tejidos como el hígado, riñón, cerebro, pulmón y piel, mientras que la 5 α -R2 es más abundante en tejidos genitales como la próstata.^{18,19}

En la próstata humana, la 5 α -R1 se expresa principalmente en las células epiteliales, mientras que la 5 α -R2 se localiza en el compartimiento estromal.^{18,19} En el CaP avanzado (se caracteriza por una proliferación anormal de células epiteliales), la 5 α -R1 es la responsable del metabolismo de andrógenos. Por otro lado, diversos estudios han exhibido que la actividad de la 5 α -R1 es tres a cuatro veces mayor en CaP que en HPB, pero la actividad de la 5 α -R2 es similar en ambos tipos de enfermedades.¹⁹

Los inhibidores de la 5 α -R más estudiados son los 4-azaesteroides, los cuales incluyen a la finasterida (16) y la dutasterida (17) (Figura 8). La finasterida (16) inhibe principalmente a la 5 α -R2 (IC₅₀ de 4.2 nM), disminuye los niveles séricos de DHT al 70% y reduce el tamaño de la próstata.^{18,19} La dutasterida (17) es el más eficiente inhibidor dual y disminuye los niveles séricos de DHT al 90%.¹⁹

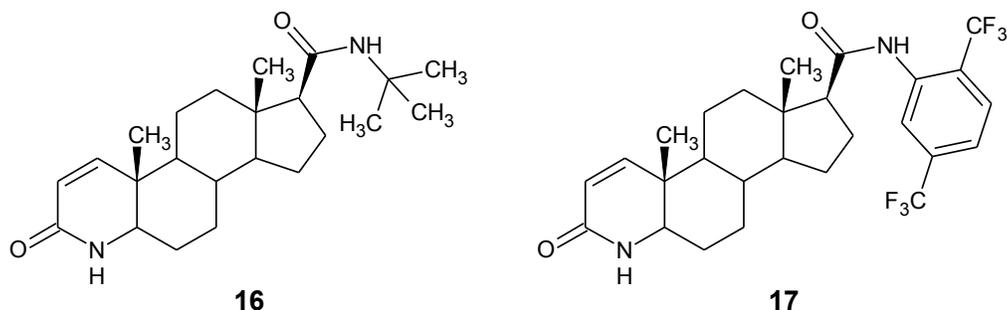


Figura 8. Inhibidores de la 5 α -reductasa: finasterida (**16**) y dutasterida (**17**).¹⁸

2.3.1.3. Inhibidores de la enzima CYP17A1

La enzima esteroideogénica CYP17A1 se encuentra en el retículo endoplásmico de la glándula adrenal, testículos, placenta y ovarios y presenta dos actividades catalíticas diferentes: 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa; su actividad 17 α -hidroxilasa cataliza la producción de glucocorticoides, mientras que su actividad 17,20-liasa permite la biosíntesis de los esteroides sexuales (Figura 4). A partir de pregnenolona y progesterona, la actividad de 17 α -hidroxilasa produce 17 α -hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesterona y posteriormente, la actividad 17,20-liasa los transforma en deshidroepiandrosterona y androstenediona.²⁰ Debido a la importancia que tiene esta enzima en la producción de andrógenos, resulta ser un blanco de interés para el tratamiento de CaP.

Los inhibidores de la CYP17A1 más empleados en el tratamiento de CaP son el ketoconazol (**18**) y la abiraterona (**19**) (Figura 9). El ketoconazol (**18**) es un inhibidor no selectivo de CYP17A1 que se usa limitadamente, debido a que también inhibe a otras enzimas del citocromo P450 (CYP3A y CYP24A1). La abiraterona (**19**) es un fármaco más reciente y que muestra un mejor perfil farmacodinámico debido a que exhibe selectividad hacia la CYP17A1.^{10,20,21}

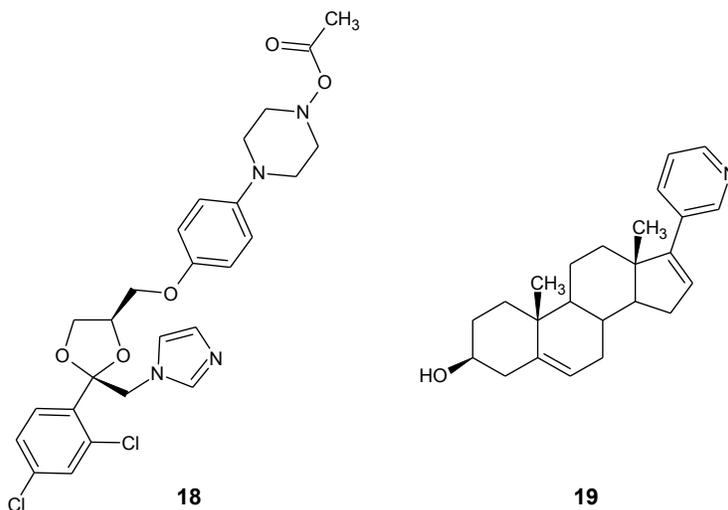


Figura 9. Inhibidores de la enzima CYP17A1: ketoconazol (**18**) y abiraterona (**19**).

2.4. Tratamiento del cáncer de próstata hormono-independiente

La mayoría de pacientes con CaP andrógenos-dependiente y que reciben terapia de privación de andrógenos, exhiben resultados positivos; sin embargo, en determinado tiempo éstos llegan a no responder a la terapia y se convierte en un cáncer andrógeno-independiente. Esto significa que la presencia de los andrógenos para estimular la proliferación de las células cancerosas ya no es determinante, permitiendo que la enfermedad reaparezca de forma más agresiva pudiendo derivarse en metástasis. Cabe mencionar que además no hay tratamiento efectivo para el CaP andrógeno-independiente.¹³

Hasta la fecha se han realizado diversos ensayos *in vitro* donde se determina la citotoxicidad o inhibición del crecimiento de la línea celular de cáncer de próstata humano PC-3 (RA-), como un modelo de CaP independiente de andrógenos, de diversos compuestos naturales o sintéticos.

Algunos estudios publicados han demostrado que dos flavonoides comúnmente encontrados en bayas, frutas y plantas medicinales como la miricetina y la miricitrina inducen la apoptosis de células cancerosas PC-3 y dicha combinación muestra un efecto sinérgico.¹³ Otros dos flavonoides, que se obtienen de la raíz seca de la planta *Scutellia baicalensis*-Georgi (ampliamente empleada en la medicina herbolaria china), son la baicaleina y la baicalina, los cuales mostraron que inhiben el crecimiento de la línea celular PC-3.²²

En cuanto a los compuestos sintéticos que han exhibido actividad antiproliferativa adecuada frente a PC-3, están los 1,2,4-oxadiazoles²³ y un derivado híbrido de isotiocianato-progesterona coordinado con cobre (II), que mostró su acción al inducir la apoptosis de las células PC-3.²⁴

2.5. Isosterismo y Bioisosterismo

Los isómeros han sido frecuentemente empleados en el diseño de fármacos para modificar las propiedades de las moléculas de una manera racional con respecto a características tales como tamaño, polaridad y distribución electrónica, entre otras.³

Las moléculas isómeras clásicas son aquellas que resultan de la sustitución de un átomo o de un grupo de átomos en una molécula activa, por otro átomo o grupo de átomos con una misma distribución electrónica (mismo número de electrones en la capa de valencia) y similares propiedades fisicoquímicas (Figura 10).^{25,27}

En 1919, Langmuir introdujo el concepto de isosterismo y propuso que la semejanza en las propiedades fisicoquímicas que presentaban ciertas moléculas, se debía a que poseían el mismo número de átomos y electrones de valencia.^{26,27}

Átomos y grupos monovalentes		Bivalentes	
A. $-\text{CH}_3$; $-\text{NH}_2$; $-\text{OH}$; $-\text{F}$; $-\text{Cl}$		A. $-\text{CH}_2-$; $-\text{NH}-$; $-\text{O}-$; $-\text{S}-$; $-\text{Se}-$	
B. $-\text{Cl}$; $-\text{PH}_2$; $-\text{SH}$		B. $-\text{COCH}_2-$; $-\text{CONH}-$; $-\text{COO}-$; $-\text{COS}-$	
C. $-\text{Br}$; $-\text{Pr}$			
D. $-\text{I}$; $-\text{Bu}$			
	Trivalentes		Tetravalentes
	A. $-\text{CH}=\text{}$; $-\text{N}=\text{}$		A. C ; Si
	B. $-\text{P}=\text{}$; $-\text{As}=\text{}$		B. $=\text{C}=\text{}$; $=\text{N}=\text{}$; $=\text{P}=\text{}$
Equivalentes cíclicos			
A. $-\text{CH}=\text{CH}-$; $-\text{S}-$		(p. ej.: benceno, tiofeno)	
B. $-\text{CH}=\text{}$; $-\text{N}=\text{}$		(p. ej.: benceno, piridina)	
C. $-\text{O}-$; $-\text{S}-$; $-\text{CH}_2-$; $-\text{NH}-$		(p. ej.: tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, ciclopentano, pirrolidina)	

Figura 10. Ejemplos de isósteros clásicos.

Más tarde, en 1925, Grimm propuso la llamada “Ley de desplazamiento de hidruro”, que extendió el concepto a especies que, teniendo diferentes número de átomos, poseen el mismo número de electrones de valencia. Por ejemplo, hipotéticamente, si se parte del ion O^{2-} y se añade un protón (partícula subatómica que posee una carga positiva y una masa de 1 uma) a su núcleo, resulta el anión F^- ; por otra parte, si se une un ion hidrógeno (H^+) a la capa de electrones de valencia, resulta el anión OH^- . Ambas especies son isoelectrónicas y muestran una considerable semejanza en sus propiedades químicas, por lo que pueden considerarse isósteras. La comparación de los aniones F^- y OH^- sugiere que un átomo es isótero de la especie que resulta al añadir un protón y dos electrones (hidruro) al átomo que le precede en el sistema periódico (Figura 11).²⁶

C	N	O	F	Ne
	CH	NH	OH	FH
		CH_2	NH_2	H_2O
			CH_3	NH_3
				CH_4

Figura 11. Ejemplos de especies isósteras según la ley de desplazamiento de “hidruro” de Grimm.²⁶

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de próstata representa una de las principales causas de muerte en hombres mayores de 50 años. La terapia hormonal con antiandrógenos ha sido una herramienta útil para el tratamiento de dicho padecimiento; sin embargo, los problemas de potencia y selectividad de algunos antiandrógenos que se emplean actualmente en el área clínica, han promovido el diseño y desarrollo de nuevas moléculas con estructura esteroidea.

Diversos trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que algunos ésteres aromáticos derivados de la pregnenolona, deshidroepiandrosterona o progesterona presentan actividad antiproliferativa sobre líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 o LNCaP).^{20,29-31} Por otro lado, existen reportes en la literatura que demuestran que la progesterona y la desoxicorticosterona inhiben la formación de DHT por competir con el sitio Δ^4 -3-ceto de T por la enzima 5α -R;¹⁸ y un estudio computacional encontrado en la bibliografía, demostró que la presencia de grupos voluminosos en C-17 (anillo D) y grupos electronegativos en C-3 y C-6 (baja densidad electrónica en el anillo A ó B) favorecen la actividad antiandrogénica (inhibitoria sobre la enzima 5α -reductasa tipo 2) de diferentes derivados del pregnano y androstano.²⁰

De acuerdo a lo anterior, se decidió emplear el núcleo de la desoxicorticosterona y esterificar ácidos carboxílicos aromáticos en C-21. Además, se propusieron algunas características adicionales para mejorar las propiedades farmacológicas y fisicoquímicas de las moléculas. Se propuso un reemplazo isostérico de anillos equivalentes, es decir, en lugar de emplear derivados del ácido benzoico se emplearían derivados del ácido nicotínico, esto con la finalidad de incrementar la solubilidad del esteroide por introducción de un grupo hidrofílico y básico,²⁶ sin desfavorecer las interacciones hidrofóbicas que ofrece un anillo aromático en los respectivos sitios de unión.²⁵ También se propuso adicionar sustituyentes en el anillo de piridina en C-6, para observar la influencia de los efectos electrónicos o estéricos en dicha región. Finalmente, se propuso la introducción de un epóxido entre C-16 y C-17, con el propósito de favorecer la planaridad y rigidez del esteroide en dicha región, sin exhibir los efectos tóxicos relacionados con este grupo funcional, basado en un trabajo previo donde no se observó toxicidad sobre macrófagos murinos (células sanas) de derivados de la pregnenolona con un epóxido en la misma región del esteroide.²⁹ (Figura 13)

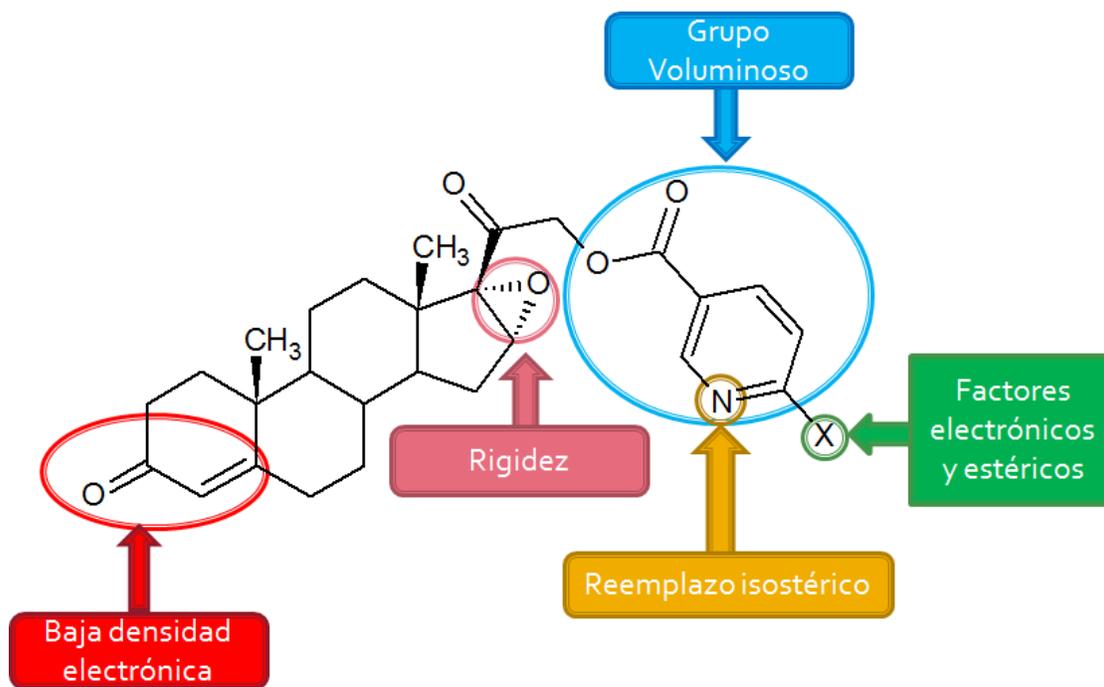


Figura 13. Características estructurales de los ésteres derivados de la 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona y ácidos nicotínicos sustituidos propuestos para ser sintetizados.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. HIPÓTESIS

Si se sintetizan ésteres derivados de la 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona con diferentes ácidos nicotínicos sustituidos en la posición 6 del anillo aromático y se comparan frente a su bioisómero, el éster derivado del ácido benzoico, entonces se obtendrá una mejora en la actividad antiproliferativa y un bajo perfil de toxicidad.

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. Objetivo general

Sintetizar y evaluar la actividad antiproliferativa de una serie de nuevos derivados del pregnano con un grupo funcional éster piridínico en el C-21.

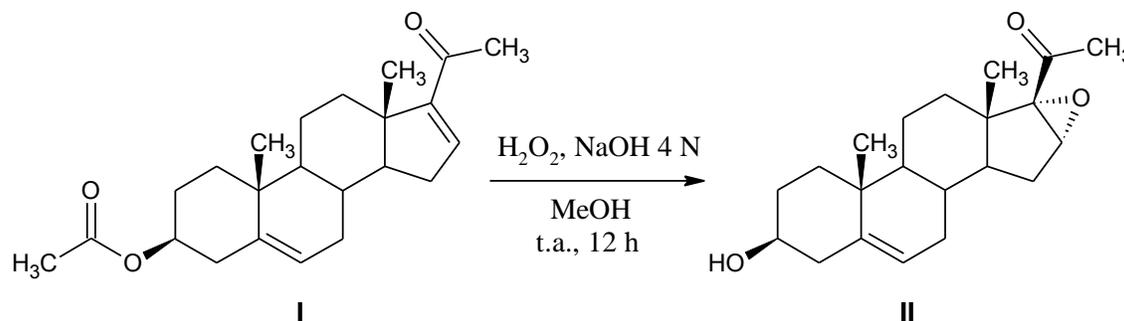
4.2.2. Objetivos particulares

- Sintetizar una serie de derivados de la 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona como: 21-(pirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vla**), 21-(6-cloropirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vlb**), 21-(6-bromopirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vlc**), 21-(6-metilpirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vld**), 21-(6-metoxipirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vle**) y 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vlf**).
- Sintetizar un derivado de la 21-hidroxipregna-4,16-dieno-3,20-diona: 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (**Vlla**).
- Caracterizar mediante métodos espectroscópicos (IR, UV, RMN ^1H , RMN ^{13}C) y espectrométricos (EM) y determinar el punto de fusión de los productos intermediarios y finales.
- Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos intermediarios (**III** y **V**) y todos los productos finales mediante ensayos de inhibición del crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata como PC-3 (independiente de andrógenos) y LNCaP (dependiente de andrógenos).
- Evaluar la toxicidad *in vitro* de los compuestos intermediarios (**III** y **V**) y los productos finales, mediante ensayos de inhibición del crecimiento de células mononucleares con un modelo de células sanas.
- Realizar un estudio de relación estructura-actividad (SAR) de los compuestos evaluados biológicamente (**III**, **V**, **Vla-Vlf** y **Vlla**).

5. DISCUSIÓN

5.1. Parte química

5.1.1. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (II)



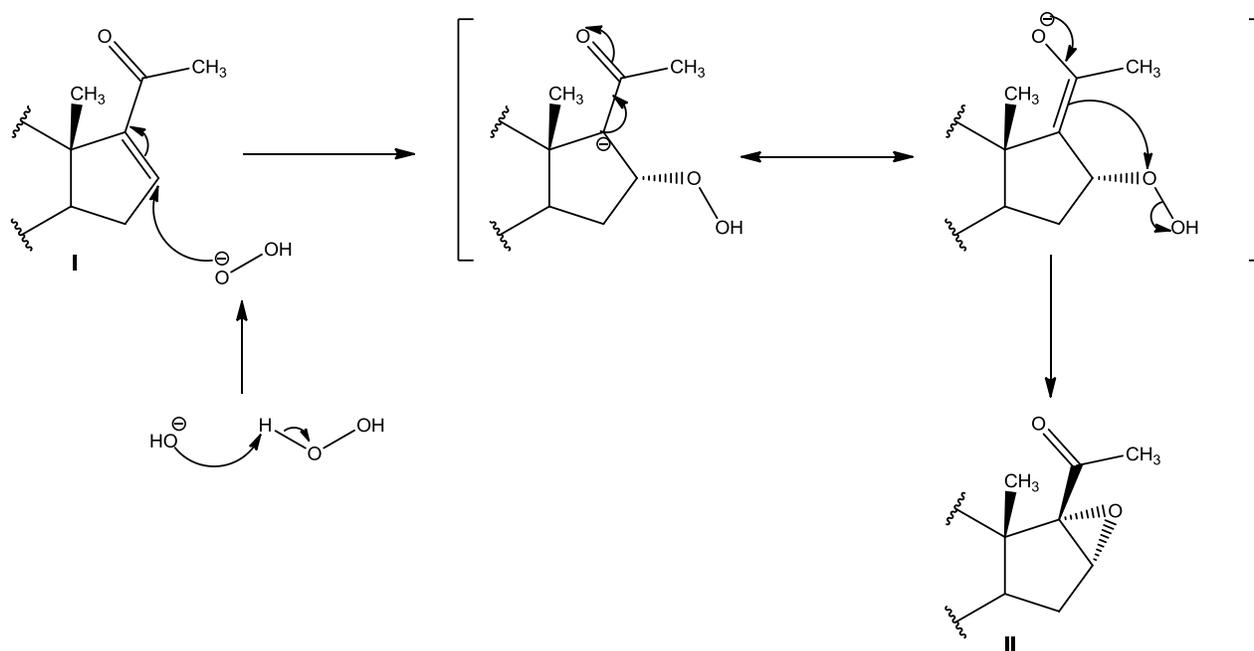
Esquema 3. Método general para la síntesis del intermediario II.

La síntesis del intermediario II se llevó a cabo mediante una reacción de epoxidación sobre el sistema carbonílico α,β -insaturado en el anillo D del pregnano, empleando como reactivos H₂O₂ y NaOH. Se decidió emplear este tipo de reacción debido a su quimioselectividad, dado que en la estructura del esteroide están presentes dos enlaces dobles con distintas propiedades electrónicas, y es útil para epoxidar olefinas deficientes de electrones.

El mecanismo propuesto para la reacción de epoxidación consiste en la formación del anión hidroperóxido (HOO⁻). Enseguida, el anión hidroperóxido realiza una adición 1,4 tipo Michael sobre la cetona α,β -insaturada, donde los electrones del sistema se deslocalizan entre el oxígeno del carbonilo (enolato) y el carbono α (carbanión). Posteriormente, se lleva a cabo un ataque nucleofílico (S_N2) del enolato sobre el oxígeno del peróxido, que resulta en la formación del anillo de oxirano. Cabe destacar que para explicar la obtención del epóxido en posición α , se sugirió que el ataque nucleofílico se llevó a cabo, preferentemente, sobre la cara α del anillo D del esteroide; esto debido a que la cara β se encuentra impedida estéricamente por el metilo angular de C-18, por lo que se obtuvo como producto mayoritario al epóxido en posición α (Esquema 4). Adicionalmente, se llevó a cabo la hidrólisis del acetilo en C-3 promovida por una base fuerte y nucleofílica.

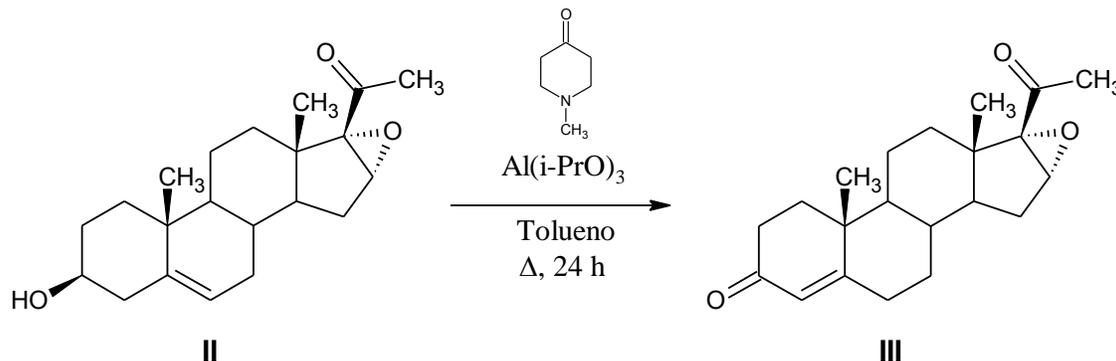
La obtención del compuesto II (Espectros 1-4), a partir de la materia prima (acetato de 16-deshidropregnenolona), se comprobó mediante la espectroscopia de IR, con una banda ancha e intensa en 3343 cm⁻¹ debida al estiramiento O-H y otra banda intensa en 1055 cm⁻¹ por el estiramiento C-O, ambas producidas por la presencia del alcohol, y también se determinó la presencia del epóxido mediante una banda débil en 1243 cm⁻¹ producida por el estiramiento C-O-C. La espectroscopia de RMN ¹H exhibió tres señales simples correspondientes a los metilos en C-18 (1.02), C-19 (1.04) y C-21 (2.03), una señal múltiple con un desplazamiento de 3.51 ppm correspondiente al protón en C-3 y una

señal simple en 3.67 ppm (H-16) que comprobó la presencia del epóxido entre C-16 y C-17. La espectroscopia de RMN ^{13}C presentó las señales de los carbonos C-16 (60.7) y C-17 (71.2) correspondientes al epóxido y la señal del carbono que se encuentra unido al hidroxilo en C-3 (71.8). La espectrometría de masas confirmó la identidad del producto **II** mediante el ion molecular $[\text{M}+1]^+$ en m/z 331.



Esquema 4. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención del intermediario **II**.

5.1.2. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III)



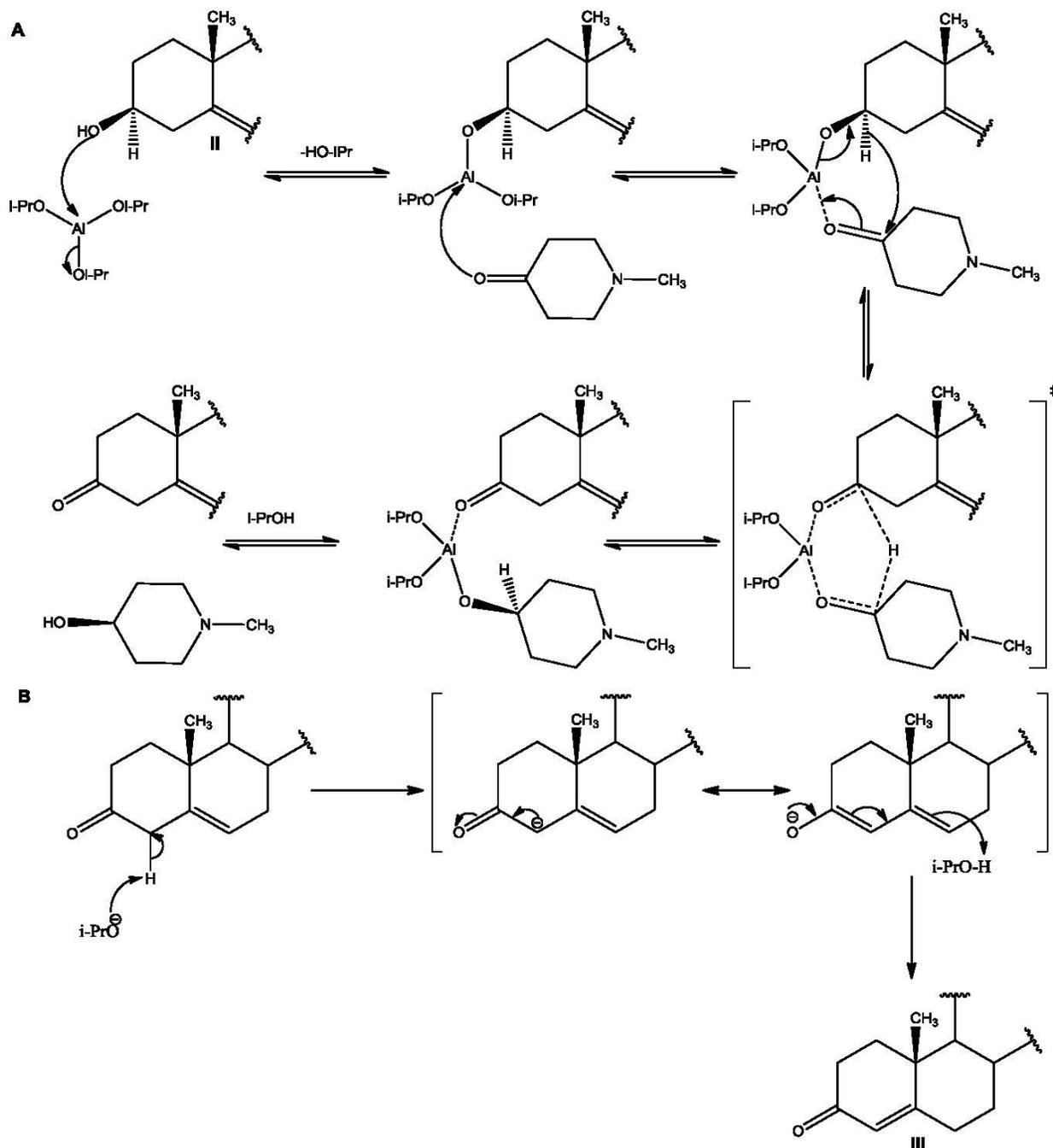
Esquema 5. Método general para la síntesis del intermediario III.

La síntesis del intermediario III se llevó a cabo mediante una reacción de oxidación de Oppenauer para la conversión del alcohol en C-3 en cetona, a través del empleo de reactivos como *N*-metil-4-piperidona (aceptor de hidruro) e isopropóxido de aluminio (catalizador) y en un medio no polar y anhidro. Se recurrió a la reacción de oxidación de Oppenauer debido a que es muy útil para oxidar alcoholes secundarios en los esteroides y que una de sus reacciones secundarias es requerida en el producto deseado, tal como la migración de un enlace doble β,γ hacia las posiciones α,β respecto al carbonilo en C-3.³²

En esta reacción se decidió emplear *N*-metil-4-piperidona sobre otros reactivos como la 1,1,1-trifluoroacetona y la ciclohexanona, debido a que no exhibieron resultados óptimos. Adicionalmente, una consideración muy importante fue mantener el medio de reacción libre de humedad, antes de adicionar el isopropóxido de aluminio, debido a que es susceptible a hidrolizarse en presencia de la misma, fue necesario retirar dicha humedad a través de una destilación azeotrópica.

El mecanismo propuesto para la reacción de Oppenauer consiste en dos etapas: la oxidación del alcohol en C-3 del esteroide y la migración del enlace doble de C-5 y C-6 hacia C-3 y C-4 del esteroide. Inicialmente, se lleva a cabo un ataque nucleofílico del alcohol hacia el aluminio y la pérdida de isopropanol (*i*-PrOH) del compuesto de aluminio. Enseguida, el carbonilo de la *N*-metil-4-piperidona se coordina con el complejo de aluminio/alcohol. Una vez formado el complejo alcohol/cetona/aluminio, la reacción de oxidación procede a través de un mecanismo concertado (estado de transición de seis miembros), donde se transfiere un hidruro de C-3 hacia el carbonilo de la *N*-metil-4-piperidona, mientras se forma un enlace doble en C-3 (Esquema 6A). Posteriormente, se propone que se lleva a cabo la migración del enlace doble β,γ , debido a la condiciones fuertemente básicas en el medio de reacción, lo que favorece la formación de un carbanión en C-4, estabilizado por dos sistemas π vecinos (el carbonilo en C-3 y el enlace doble en C-5,C-6). Finalmente, se produce el movimiento de los electrones desde el enolato y la consecuente protonación del carbanión alílico en C-6 (Esquema

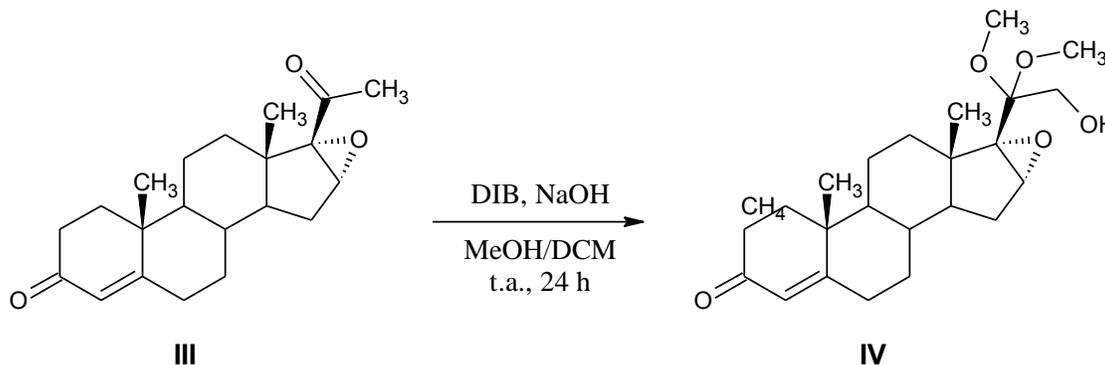
6B).^{33,34} La migración del enlace doble se ve favorecida, dada la estabilidad del sistema α,β -insaturado que se produce (incremento en la energía de resonancia del compuesto).



Esquema 6. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención del intermediario **III**. **A)** Oxidación del alcohol en C-3 del esteroide. **B)** Migración del enlace doble de C-5 y C-6 hacia C-3 y C-4.

La obtención del compuesto **III** (Espectros 5-9) se determinó mediante la espectroscopia de IR, donde se observó la ausencia de las bandas características del alcohol y la presencia de una banda intensa en 1659 cm^{-1} producida por el estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de una cetona α,β -insaturada. La espectroscopia de UV comprobó la formación del sistema conjugado mediante un máximo de absorción igual a 240 nm , cuyo valor se comparó con el valor calculado mediante las reglas de Woodward-Fieser ($\lambda_{\text{máx}} = 244\text{ nm}$). La espectroscopia de RMN ^1H exhibió la formación del sistema carbonílico α,β -insaturado con base en la ausencia de una señal múltiple asignada al protón en C-3, y a su vez, se determinó la isomerización del doble enlace mediante una señal simple en 5.72 ppm correspondiente al protón vinílico en C-4, en lugar de la señal doble en 5.33 ppm asignada al protón en C-6. La espectroscopia de RMN ^{13}C demostró la formación de la cetona α,β -insaturada mediante el desplazamiento de la señal de C-3 hacia campo bajo (de 71.3 a 199.5 ppm). La espectrometría de masas comprobó la identidad del compuesto **III** a partir del ion molecular $[\text{M}+1]^+$ observado en $m/z\ 329$.

5.1.3. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV)



Esquema 7. Método general para la síntesis del intermediario IV.

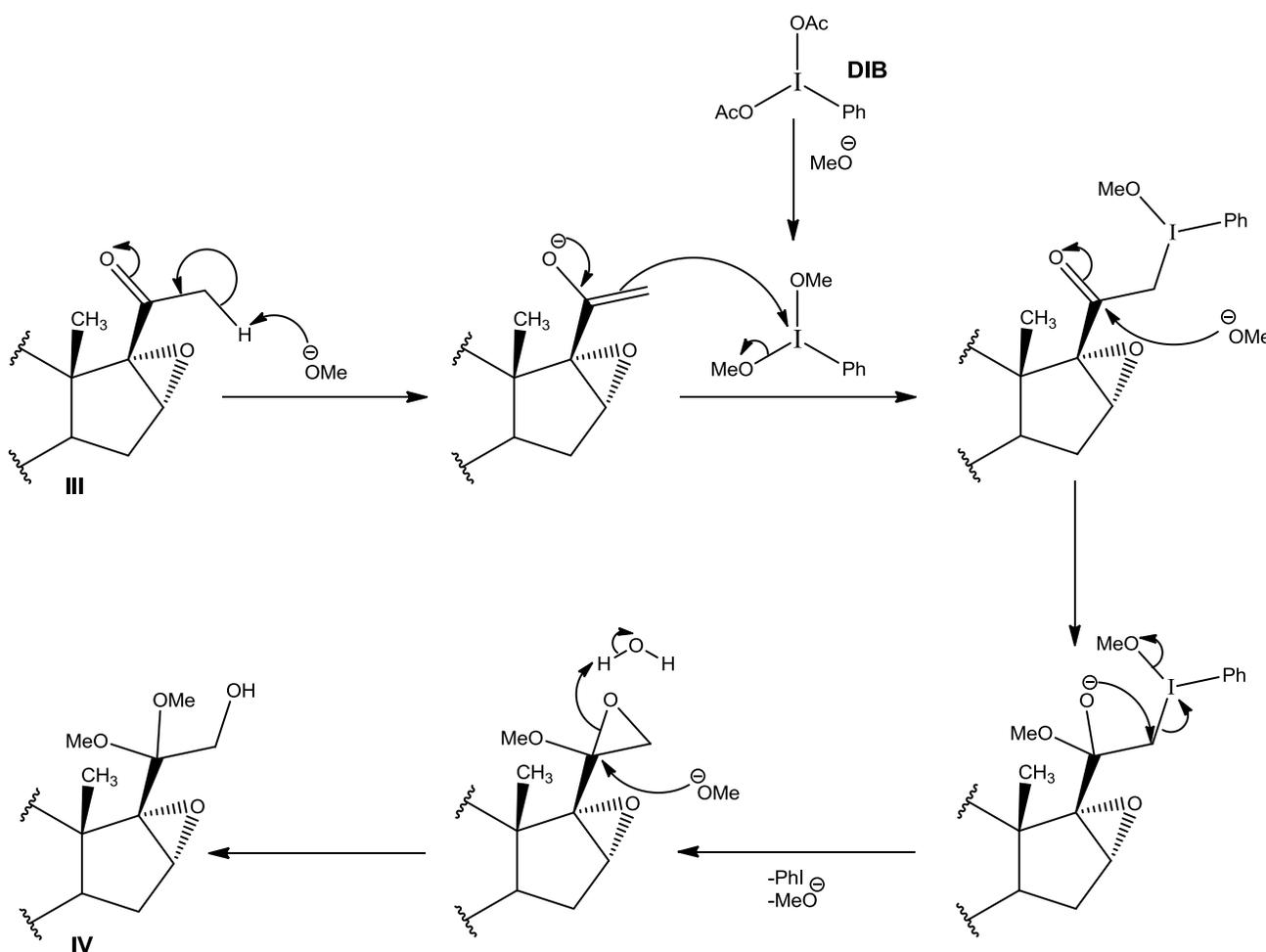
La síntesis del intermediario IV se llevó a cabo mediante una reacción de oxidación en C-21, empleando un derivado de yodo (III) hipervalente conocido como diacetoxiyodobenceno (DIB) en un medio básico y como disolvente MeOH. Esta reacción se emplea para la obtención de un α -hidroxicetal a partir de una α,β -epoxicetona.³⁵ Los compuestos derivados de yodo (III) hipervalente, tal como el DIB, se emplean comúnmente en reacciones de oxidación selectiva; sin embargo, este tipo de compuestos no poseen propiedades oxidativas intrínsecas, sino se caracterizan por ser un electrófilo fuerte y el fragmento -IPh es un excelente grupo saliente.³⁶

En esta reacción se observó que el NaOH fue más eficiente que otras bases tales como KOH y K_2CO_3 , debido a que se obtenían menos impurezas. Además, se determinó que el empleo de MeOH como disolvente, es imprescindible y corresponde con lo descrito en el mecanismo de reacción propuesto.

El mecanismo propuesto para la oxidación en C-21 consiste en la enolización de la α,β -epoxicetona en C-20, debido a la basicidad del medio. Enseguida, el enolato realiza un ataque nucleofílico (S_N2) sobre el yodo, debido a la fuerte electrofilia que posee dicho elemento hipervalente. Posteriormente, se adiciona un grupo metóxido en el carbonilo en C-20 y se forma un anión hemiacetal; el oxígeno que tiene la carga negativa, lleva a cabo un ataque nucleofílico (S_N2) sobre el carbono electrofílico C-21 y se cicla, produciéndose un anillo de oxirano y yodobenceno (PhI). Finalmente, se realiza la apertura del anillo de oxirano por el ataque nucleofílico (S_N2) de un grupo metóxido sobre C-20 y se produce el α -hidroxicetal.³⁷ (Esquema 8)

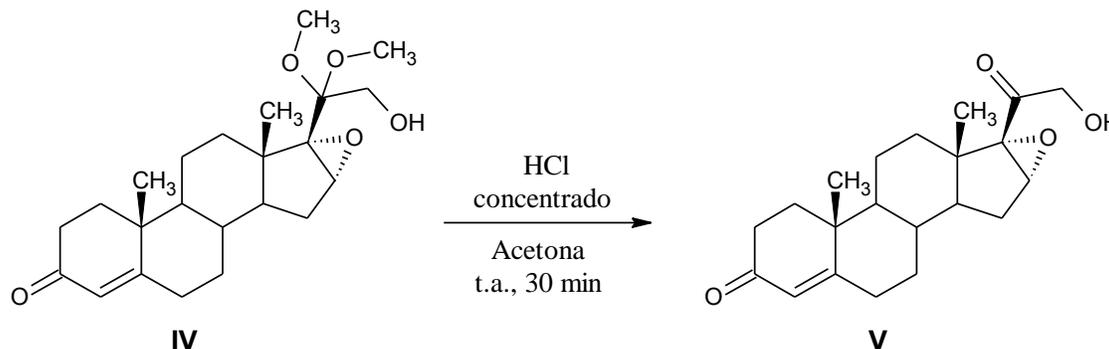
La obtención del compuesto IV (Espectros 10-15) se comprobó mediante la espectroscopia de IR, con la ausencia de la banda de cetona de C-20 y la presencia de dos bandas en 3426 cm^{-1} y 1084 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos O-H y C-O de un alcohol, respectivamente. La espectroscopia de UV confirmó la conservación del sistema carbonílico α,β -insaturado (240 nm) excluyendo la posibilidad de la formación de un cetal en dicha región. La espectroscopia de RMN ^1H

demostró la formación del α -hidroxicetal a partir de dos señales simples en 3.30 y 3.26 ppm asignadas a los protones de los metoxilos en C-20; además, se comprobó indirectamente la formación del hidroxilo en C-21 a partir de una señal doble con desplazamiento de 3.67 ppm ($J=5.9$ Hz, 2H), correspondiente a los protones en C-21, lo que aseveró el acoplamiento de los mismos con el protón del OH y que fue corroborado a través de un intercambio con D_2O (Espectro 13), donde se observó una señal simple con el mismo desplazamiento. La espectroscopia de RMN ^{13}C confirmó la formación del cetal mediante el desplazamiento de la señal de C-20 de campo bajo hacia campo alto (de 200 a 102 ppm); además, se observó la señal del carbono del metoxilo en 54.0 ppm. La espectrometría de masas comprobó la identidad del compuesto **IV** al observarse el ion molecular $[M+1]^+$ en m/z 391.



Esquema 8. Mecanismo propuesto para la obtención del intermediario **IV**.

5.1.4. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-4-eno-3,20-diona (V)

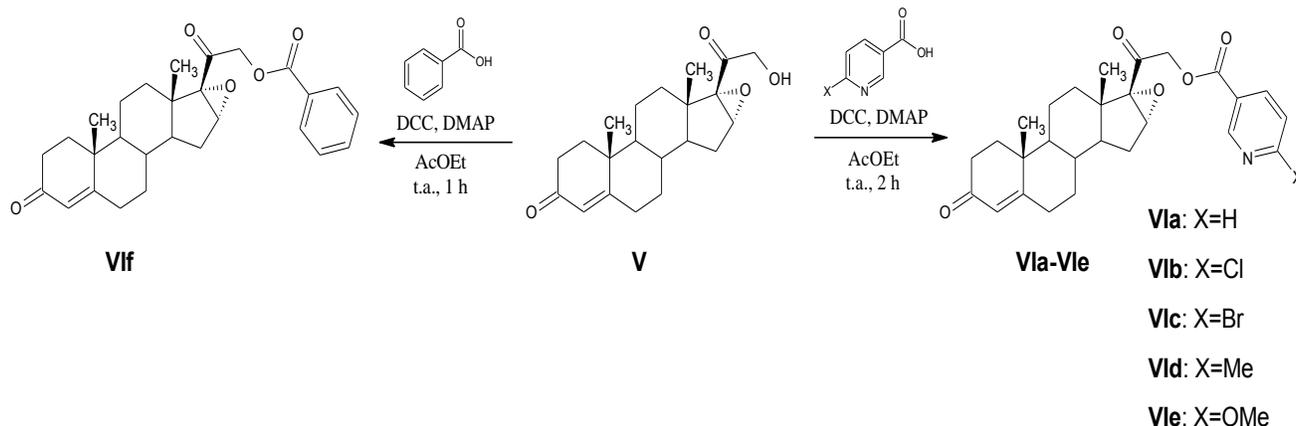


Esquema 9. Método general para la síntesis del intermediario **V**.

La síntesis del intermediario **V** se llevó a cabo mediante una reacción de desprotección del cetal en C-20 realizando una hidrólisis ácida en un medio polar no prótico.

La obtención del compuesto **V** (Espectros 16-21) se comprobó mediante la espectroscopia de IR, donde se observó la presencia de una banda intensa en 1711 cm^{-1} correspondiente a la cetona (estiramiento C=O) producida por la desprotección del carbonilo en C-20 y también se observó una banda ancha en 3457 cm^{-1} correspondiente al alcohol en C-21 (estiramiento O-H). La espectroscopia de UV comprobó la conservación del sistema conjugado mediante el máximo de absorción encontrado a 240 nm. La espectroscopia de RMN ^1H corroboró la desprotección de C-20 con base en la ausencia de las señales correspondientes a los protones del cetal. Además, se observó el desdoblamiento de las señales asignadas a los protones en C-21 como dos doble de dobles (dd) en 4.34 ($J_1=19.7$, $J_2=4.0$ Hz) y 4.04 ($J_1=19.7$, $J_2=5.3$ Hz), lo que sugirió un acoplamiento geminal de dos protones no equivalentes (diasterotópicos) debido al cambio que se originó en el ambiente estereoquímico de dicha región, y también se comprobó la presencia del protón unido al oxígeno del alcohol en 2.94 ppm (t, $J=4.8$ Hz), el cual se encuentra acoplado a los dos protones vecinos en C-21 y cuya asignación se corroboró a través de un intercambio con D_2O (Espectro 19). La espectroscopia de RMN ^{13}C demostró la formación del carbonilo en C-20 con base en la presencia de una señal en 206.0 ppm correspondiente a dicho carbono y la ausencia de la señal en 102.0 ppm asignada al C-20 del carbonilo protegido. La espectrometría de masas confirmó la identidad del compuesto **V** al observarse el ion molecular $[\text{M}+1]^+$ en m/z 345.

5.1.5. Síntesis de los ésteres nicotínicos (Vla-Vle) y el éster benzoico (Vlf)



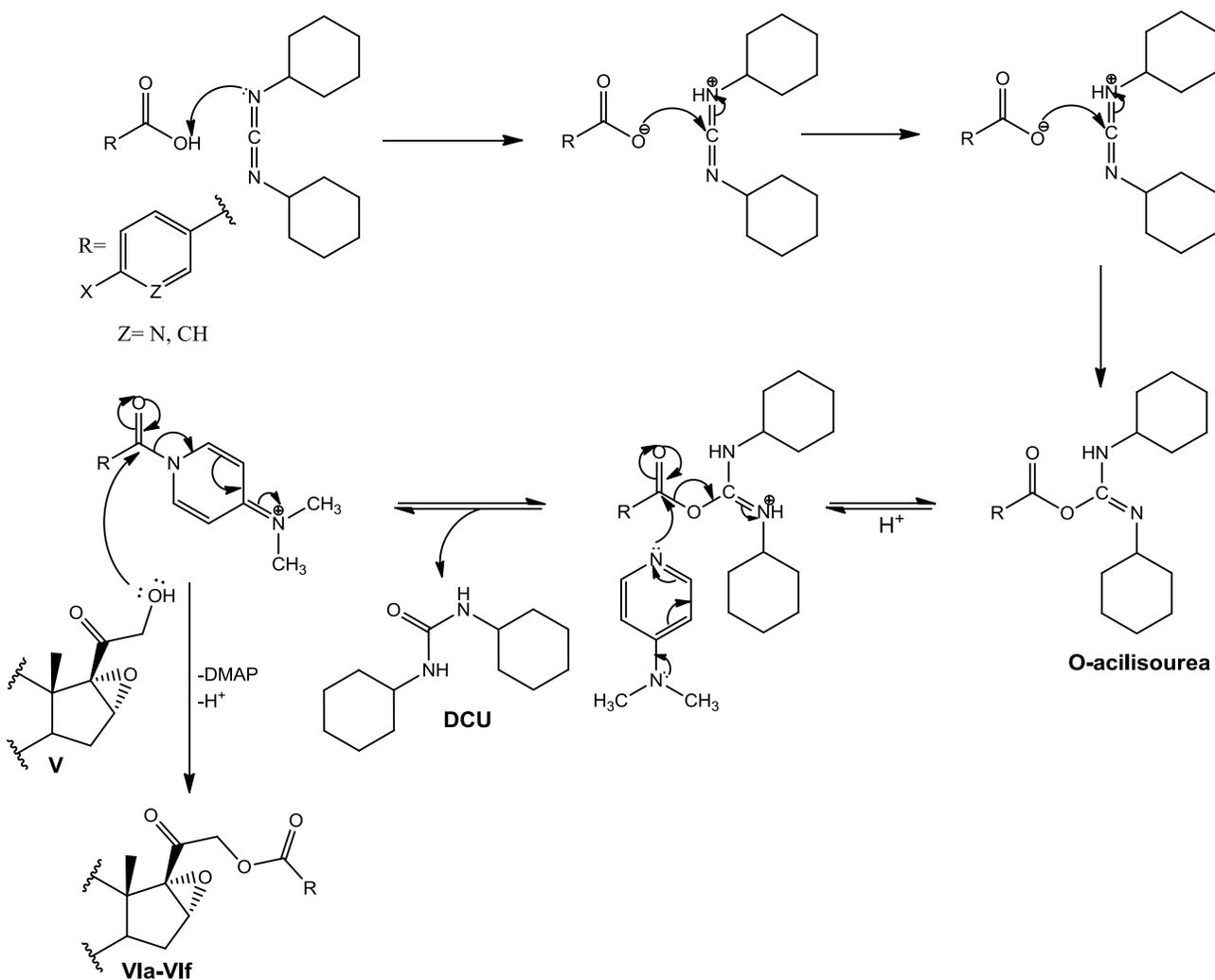
Esquema 10. Método general para la síntesis de los productos finales **Vla-Vlf**.

La síntesis de los productos finales **Vla-Vlf** se llevó a cabo mediante una reacción de esterificación de Steglich entre el intermediario **V** y distintos ácidos nicotínicos y ácido benzoico, empleando DCC y DMAP como agente acoplante y catalizador, respectivamente. La adición de DMAP, como catalizador para la reacción de esterificación, se debe a que los alcoholes son débiles nucleófilos que reaccionan lentamente con las O-acilisoureas (ácido carboxílico acoplado con DCC) y actúa como un agente de transferencia de grupos acilo.³⁸

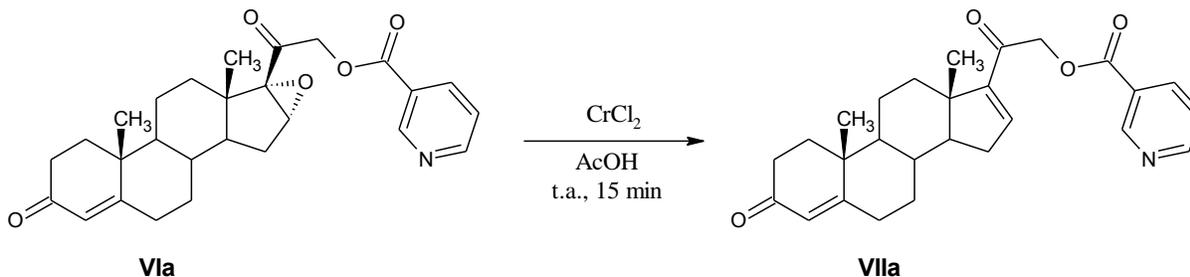
El mecanismo propuesto para la reacción de esterificación de Steglich consiste en la activación del ácido carboxílico, a través de la conversión en una O-acilisourea; mediante de una adición 1,2 del carboxilato sobre la diimida de la DCC. Posteriormente, la DMAP reacciona con la O-acilisourea mediante una sustitución nucleofílica en el grupo acilo, ya que ésta es más nucleofílica que el alcohol; de esta forma, se produce una amida reactiva (fuertemente electrofílica) y se elimina el agente acoplante como DCU. Finalmente, con base en la fuerte electrofilia de la amida producida, el alcohol realiza un rápido ataque nucleofílico en el acilo, que da como resultado la formación del éster y DMAP como grupo saliente.³⁹ (Esquema 11)

La obtención de los compuestos **Vla-Vlf** (Espectros 22-45) se determinó con base en la espectroscopia de IR, al observarse la ausencia de una banda en 3457cm^{-1} correspondiente al O-H del alcohol en C-21 y se observó la presencia de bandas entre 1740 y 1730cm^{-1} correspondiente a un carbonilo de éster y dos bandas intensas entre 1300 y 1100cm^{-1} debidas a los estiramientos asimétrico y simétrico C-O de los ésteres. La espectroscopia de RMN ^1H contribuyó a confirmar la obtención de los ésteres, al exhibir las señales características de los protones aromáticos correspondientes a cada núcleo de piridina y el núcleo de benceno entre 9.3 y 6.7 ppm, con sus apropiadas multiplicidades y constantes de acoplamiento (donde una $J = 8.1\text{-}8.3\text{ Hz}$ corresponde a un

acoplamiento entre protones vecinos y una $J = 1.2-2.4$ Hz corresponde a un acoplamiento entre protones que están alejados por 3 carbonos dentro del sistema aromático). La espectroscopia de RMN ^{13}C confirmó la formación de los ésteres mediante la presencia de una señal entre 162-168 ppm asignada al carbono carbonílico del éster y la expresión de las respectivas señales a campo bajo (160-120 ppm) de los carbonos aromáticos pertenecientes a cada uno de los derivados de piridina y del derivado benzoico. La espectrometría de masas confirmó la identidad de cada uno de los compuestos finales con base en sus respectivos iones moleculares $[\text{M}+1]^+$ a relaciones m/z correspondientes.



Esquema 11. Mecanismo propuesto para la obtención de los compuestos finales **VIa-VI f**.

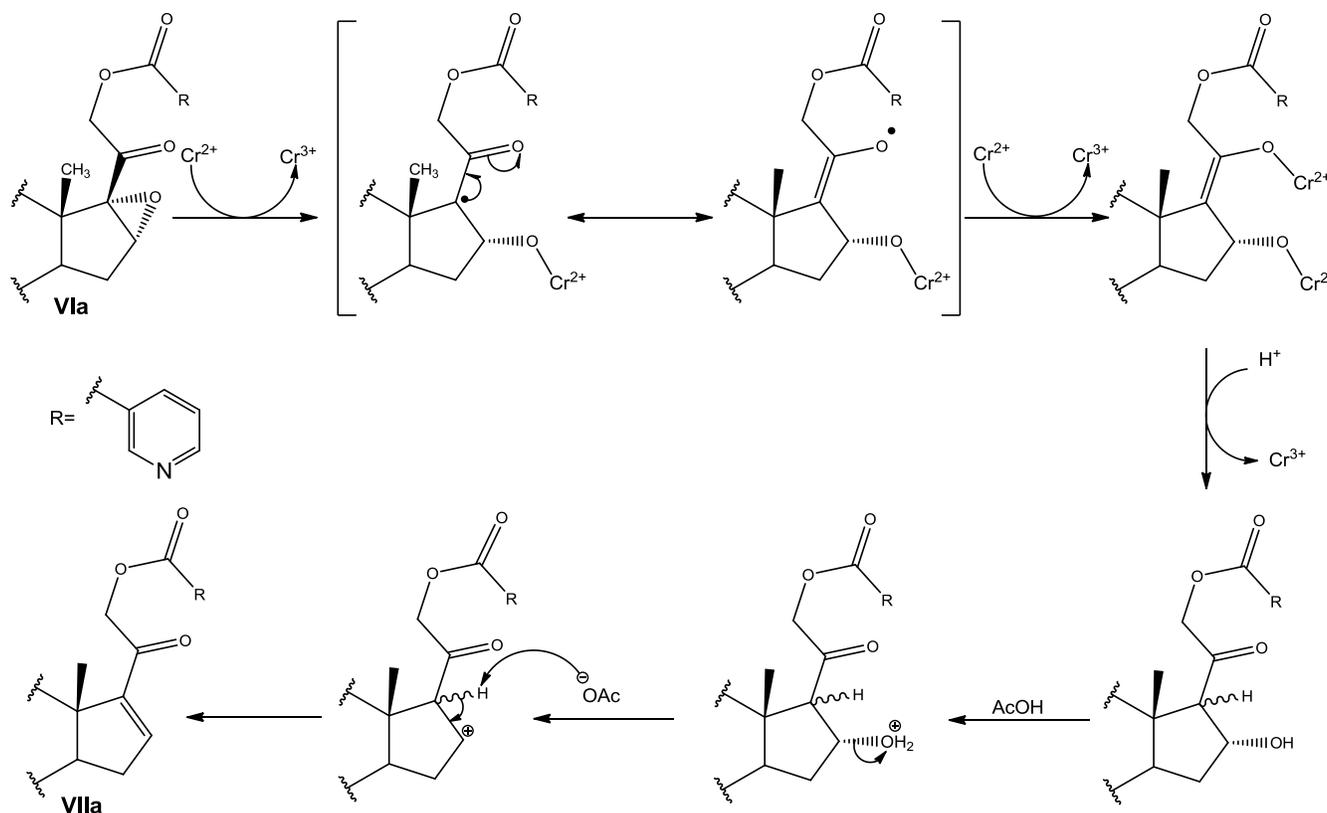
5.1.6. Síntesis y caracterización de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VIIa)**Esquema 12.** Método general para la síntesis del producto final **VIIa**.

La síntesis del producto final **VIIa** se llevó a cabo mediante una reacción de reducción que consistió en la apertura y eliminación del epóxido en C-16 y C-17 catalizada por Cr(II) en ácido acético como disolvente. La reacción de eliminación del epóxido mediante sales de cromo (CrCl_2 , $\text{Cr}(\text{AcO})_2$), es útil en la transformación de α,β -epoxicetonas a cetonas α,β -insaturadas esteroidales, a través de la formación de una β -hidroxicetona (con estereoquímica α , la cual se debe a la configuración del epóxido de origen).⁴⁰

El mecanismo de reacción propuesto para la eliminación del epóxido consiste en una eliminación reductiva mediante el empleo de cromo (II) como agente reductor. El cromo (II) se oxida a cromo (III) a través de la transferencia de un electrón hacia el átomo de oxígeno del epóxido y se promueve la apertura del mismo hacia C-17, con la subsecuente formación de un radical estabilizado por el sistema π adyacente. Enseguida, otro cromo (II) transfiere un electrón al radical enol y produce un compuesto de coordinación de cromo (III). Posteriormente, el complejo de cromo (III) se hidroliza rápidamente por el ácido presente en el medio y se obtiene una β -hidroxicetona (16 α -hidroxiesteroide) con el grupo hidroxilo con estereoquímica α . Finalmente, se lleva a cabo la deshidratación del esteroide mediante una reacción de eliminación E1 promovida por la acidez del medio, dando como producto a la cetona α,β -insaturada en el anillo D del esteroide.^{40,41} (Esquema 13)

La obtención del compuesto **VIIa** (Espectros 46-49) se comprobó a través de la espectroscopia de IR al observarse la ausencia de la banda correspondiente al carbonilo de cetona en 1711 cm^{-1} debido a la formación de otro sistema carbonílico α,β -insaturado y la conservación de la banda intensa correspondiente al carbonilo de éster en 1728 cm^{-1} . La espectroscopia de RMN ^1H corroboró la formación del nuevo sistema carbonílico α,β -insaturado al observarse la presencia de una señal doble en 6.83 ($J=1.4\text{ Hz}$) asignada al protón vinílico en C-16 y al determinarse la ausencia de la señal simple en 3.67 ppm correspondiente al protón del epóxido en C-16; además, la presencia de las señales correspondientes a protones aromáticos (9.28-7.41 ppm) comprobó la conservación del éster. La espectroscopia de RMN ^{13}C exhibió la ausencia de las señales correspondientes a los carbonos C-16

(62.0) y C-17 (70.0) del epóxido y la presencia de nuevas señales de carbonos vinílicos en 137.6 y 144.3 ppm que se asignaron a los carbonos C-16 y C-17, respectivamente; por otro lado, la presencia de una señal en 164.8 ppm comprobó la conservación del éster. La espectrometría de masas confirmó la identidad del compuesto **VIIa** con base en la presencia del ion molecular en m/z 434 $[M+1]^+$.



Esquema 13. Mecanismo propuesto para la obtención del compuesto final **VIIa**.

5.2. Parte biológica

5.2.1. Evaluación de la actividad antiproliferativa sobre líneas celulares de cáncer de próstata y toxicidad en células mononucleares

Se determinó la actividad antiproliferativa de los productos intermediarios **III** y **V** y los productos finales **Vla-Vlf** y **VIIa** sobre una línea celular de cáncer de próstata andrógeno-dependiente (LNCaP) y otra andrógeno-independiente (PC-3) y se comparó su actividad contra un fármaco de referencia que se usa ampliamente en el tratamiento de cáncer de próstata como es la flutamida (antagonista del receptor de andrógenos).

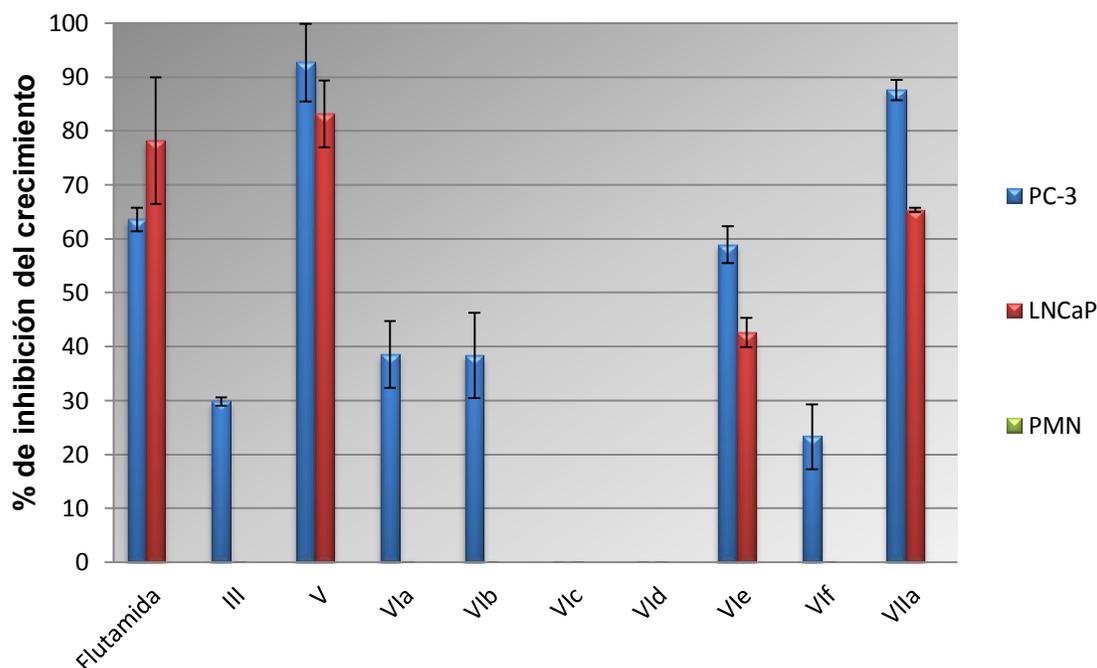


Figura 14. Comparación de los compuestos intermediarios y finales y el compuesto de referencia respecto al porcentaje de inhibición del crecimiento de las líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP) y células mononucleares (CMN).

En cuanto a los compuestos intermediarios **III** y **V**, se observó que el intercambio de un hidrógeno por un hidroxilo en la posición C-21 produjo un incremento considerable en la actividad antiproliferativa del esteroide frente a ambos tipos de células cancerosas de próstata (92.7% para PC-3 y 83.2% para LNCaP); sin embargo, dicho efecto se mostró sin exhibir selectividad. Lo anterior se puede explicar mediante un incremento en la hidrofilia del esteroide basado en la disminución del ClogP del esteroide (3.53 y 2.83 para **III** y **V**, respectivamente), y a su vez, se observó un incremento en la polaridad del mismo, como lo demostró el momento dipolar calculado para ambas estructuras esteroideas (2.6 y 2.96 D para **III** y **V**, respectivamente); lo que pudo favorecer la solubilidad del

esteroide en el medio acuoso donde se llevaron a cabo los ensayos biológicos. Adicionalmente, se sugiere que el incremento en la actividad biológica también pudo deberse a la presencia de un grupo donador de puentes de hidrógeno (OH) en C-21, el cual puede contribuir significativamente a la interacción con su respectivo blanco molecular.

Por otro lado, se observó que el compuesto **V**, respecto al fármaco de referencia, presentó la mayor actividad antiproliferativa frente a PC-3 y una actividad similar sobre la línea celular dependiente de andrógenos (LNCaP), lo que lo coloca como un potencial cabeza de serie para el diseño de nuevos derivados más potentes contra células cancerosas de próstata.

En la comparación del compuesto **V** y los compuestos finales **Vla-Vlf**, se observó que al bloquear el OH en C-21 mediante un grupo éster, la actividad antiproliferativa disminuyó o se perdió. La disminución o pérdida de la actividad biológica se pudo deber al incremento en la lipofilia del esteroide (ClogP entre 3.34 y 4.52) que le confirió la adición de un grupo voluminoso en C-21 tal como fue un anillo aromático y por tanto, contribuyó a la disminución de la solubilidad del esteroide.

Para el diseño de la serie de compuestos finales **Vla-Vle** se consideró emplear la técnica de bioisosterismo haciendo un reemplazo de anillos equivalentes como es el caso del benceno y piridina y se decidió sintetizar derivados del ácido nicotínico como bioisómeros del ácido benzoico. El compuesto **Vla** (derivado del ácido nicotínico no sustituido) se comparó con su bioisómero, el compuesto **Vlf** (derivado del ácido benzoico), y se observó que dicho reemplazo isostérico, exhibió un incremento en la actividad antiproliferativa y se mantuvo la selectividad hacia PC-3. Este efecto se pudo explicar mediante una disminución de la lipofilia basada en el ClogP del esteroide y a la presencia de un grupo débilmente básico y aceptor de puentes de hidrógeno, lo cual contribuyó a incrementar la solubilidad del mismo en el medio biológico.

Al comparar los compuestos finales **Vla-Vle**, se observó que el reemplazo de un hidrógeno, en la posición 6 del anillo de piridina, por diferentes sustituyentes produjo una modificación significativa en la actividad antiproliferativa. Se observó que el reemplazo de un hidrógeno por un cloro (**Vlb**) mantuvo una potencia y selectividad similar respecto al compuesto **Vla**, a pesar del considerable incremento en la lipofilia del esteroide (Clog P de 3.34 a 4.18). Por otro lado, el reemplazo isostérico por un bromo (**Vlc**) o metilo (**Vld**) produjo la pérdida de la actividad, lo pudo ser atribuido a la disminución de la hidrofiliidad del esteroide con base en el Clog P (4.52 y 4.12, respectivamente) o al incremento del tamaño del sustituyente. Cabe mencionar que también se observó este mismo efecto en una serie de 3 β -(piridil-3-carboxiloxi)pregna-4,16-dieno-6,20-diona previamente desarrollada en nuestro laboratorio, donde se explicó que dicho efecto se pudo deber a la disminución de la solubilidad basado en el aumento del ClogP.¹² No obstante, el reemplazo por un grupo metoxilo (**Vle**) incrementó considerablemente la actividad antiproliferativa sobre PC-3 (58.9%) y produjo una respuesta biológica

frente a LNCaP (42.6%), en cuyo caso, ninguno de los otros compuestos de la serie produjo, a pesar del incremento en el tamaño del sustituyente. Con base en lo anterior, se sugirió que el reemplazo en dicha posición, por un átomo o grupo de átomos que incrementen la lipofilia de la molécula, y no necesariamente que modifique el volumen molecular, producirá una disminución o pérdida de la actividad antiproliferativa y además, si dicho átomo o grupo es un aceptor de puentes de hidrógeno, se favorecerá un incremento en la potencia hacia las dos líneas celulares de cáncer de próstata pero no se mostrará selectividad hacia alguno de los dos tipos celulares.

Para determinar el efecto de la presencia del epóxido en C-16,C-17, se llevó a cabo la eliminación del mismo, en el compuesto **Vla**, para formar un doble enlace en su lugar y así, generar un sistema α,β -insaturado en dicha región del esteroide (**VIIa**). De acuerdo a los resultados exhibidos, se observó que la eliminación del epóxido incrementó considerablemente la actividad antiproliferativa en PC-3 (87.6%) y mostró una actividad frente a LNCaP (65.3%) y cuyas actividades fueron comparables con el compuesto **V** y flutamida; sin embargo, dicho efecto no se correlacionó con el log P (mostró un incremento de lipofilia con base en el ClogP de 3.34 a 4.19), pero se sugirió que la disminución del área superficial polar (PSA, de 67.614 a 56.309 Å^2), permitieron el incremento en la actividad antiproliferativa, ya sea por el aumento en la polaridad del compuesto que favoreció determinadas interacciones dipolo-dipolo en el sitio activo, o bien, incrementando su solubilidad en el medio biológico y al favorecerse la difusión del esteroide a través de la membrana de las células cancerosas (descrito por la disminución del PSA). Por otro lado, se sugirió que la rigidez y planaridad que proporcionó el epóxido en dicha región del esteroide, no favoreció una conformación óptima del esteroide para que se uniera a su respectivo blanco molecular, en ambas líneas cancerosas de próstata y que llevara a cabo su acción de manera adecuada.

De acuerdo a los resultados generales, se observó que los compuestos **V** y **VIIa** fueron los más potentes frente a ambas líneas celulares cancerosas, pero no mostraron selectividad. No obstante, se cree que cuando se evalúe *in vivo* al compuesto **V**, al presentar OH libre en C-21, estaría expuesto a un amplio metabolismo, es por ello que al protegerlo con un grupo éster de ácido nicotínico resultaría una útil herramienta.

Por otro lado, a pesar de que los compuestos **Vla** y **Vlb** (ésteres nicotínicos) mostraron selectividad hacia PC-3 pero una baja potencia, se espera que este hecho de una pauta para seguir estudiando este tipo de derivados y determinar cuáles son los sustituyentes más adecuados para incrementar la potencia del esteroide. Lo anterior con la finalidad de encontrar candidatos para el tratamiento de cáncer de próstata hormono-independiente.

También se determinó que en la mayoría de las comparaciones, el descriptor molecular que mejor se correlacionó con los resultados biológicos fue el log P, donde se observó que al aumentar la

lipofilia del esteroide disminuye la actividad antiproliferativa de los compuestos **III**, **V** y **Vla-Vlf** (Figura 15). Cabe mencionar que los demás descriptores calculados no mostraron correlación comparable respecto a la actividad biológica evaluada.

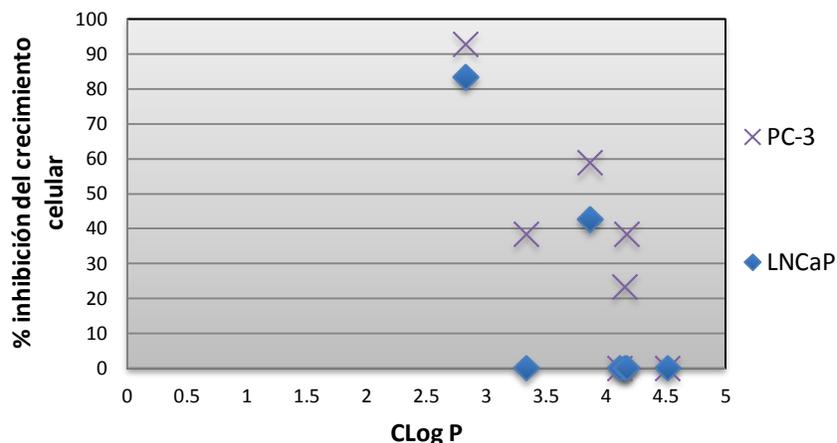


Figura 15. Comparación de la actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP) de los compuestos **III**, **V** y **Vla-Vlf** respecto al log P calculado (Clog P).

En cuanto a la toxicidad de los compuestos sintetizados en células mononucleares, se observó que ninguno inhibió el crecimiento de células sanas a una concentración de 50 μM , lo que se correlacionó con los resultados encontrados previamente en nuestro laboratorio. De esta forma, se determinó que la presencia de un grupo epóxido, comúnmente con propiedades toxicológicas, en C-16 y C-17 en el núcleo del pregnano, no incrementa ni favorece la toxicidad del esteroide.

En conclusión, se determinó que los compuestos sintetizados exhibieron selectividad hacia células cancerosas de próstata, lo que corroboró lo propuesto en el diseño y estableció un antecedente para el desarrollo de moléculas esteroideas selectivas que posean un bajo perfil toxicológico.

6. CONCLUSIONES

Se sintetizó una serie de derivados de la 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-pregn-4-eno-3,20-diona como: 21-(pirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vla**), 21-(6-cloropirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vlb**), 21-(6-bromopirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vlc**), 21-(6-metilpirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vld**), 21-(6-metoxipirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vle**) y 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (**Vlf**). Adicionalmente, se sintetizó un derivado de la 21-hidroxi-pregna-4,16-dieno-3,20-diona como: 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (**VIIa**). A los compuestos sintetizados se les determinó su punto de fusión y se caracterizaron mediante métodos espectroscópicos (IR, UV, RMN ^1H y RMN ^{13}C) y espectrométricos (EM).

Se evaluó la actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos intermediarios (**III** y **V**) y los productos finales mediante ensayos de inhibición del crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata como PC-3 (independiente de andrógenos) y LNCaP (dependiente de andrógenos), y se determinó que el compuesto **V** fue el más potente sin mostrar selectividad, mientras que sus ésteres derivados del ácido nicotínico produjeron una disminución en la actividad biológica, pero favorecieron la selectividad del esteroide.

Se determinó que el reemplazo isostérico =CH por =N (**Vlf** y **Vla**) produjo un incremento en la actividad antiproliferativa frente a PC-3; mientras que el empleo de sustituyentes en C-6 del anillo de piridina que incrementaron la lipofilia del esteroide, disminuyeron la actividad biológica. No obstante, los compuestos **Vla** y **Vlb** mostraron selectividad hacia PC-3 pero una baja potencia, lo que da una pauta para seguir estudiando este tipo de derivados, con la finalidad de encontrar agentes terapéuticos que puedan ser empleados en el tratamiento de cáncer de próstata hormono-independiente.

Se determinaron algunos descriptores moleculares como volumen molecular, área superficial, ovalidad, área superficial polar, momento dipolar y log P, y se observó que en la mayoría de las comparaciones, el descriptor molecular que más se correlacionó con los resultados biológicos fue este último.

Se evaluó la toxicidad *in vitro* de los compuestos intermediarios y los compuestos finales mediante ensayos de inhibición del crecimiento de células mononucleares, y se determinó que todos los compuestos sintetizados no exhibieron toxicidad frente a este tipo de células sanas a la concentración de 50 μM , lo que confirmó la seguridad de los compuestos esteroideos propuestos y se correlacionó con los resultados previamente determinados en nuestro laboratorio.

7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.1. Métodos y Materiales

La pureza de los productos y el progreso de las reacciones se monitorearon mediante CCF, empleando cromatoplasmas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60F₂₅₄ (0.20 mm de espesor) y un sistema de elución CHCl₃-MeOH (95:5). Las cromatoplasmas se visualizaron con lámpara de luz UV empleando una longitud de onda de 254 nm y posteriormente, se revelaron con una solución ácida de cloruro de cobalto 2% (m/v).

La purificación de los productos se realizó mediante CC empleando gel de sílice Kieselgel 60 de 0.063-0.2 mm (MN) o Fluorisil® de 60-100 malla (Aldrich) empacadas en columnas de vidrio y como sistema de elución, una mezcla de hexano-AcOEt (8:2) o un gradiente de hexano-AcOEt, según sea el caso.

Los puntos de fusión de los productos intermedios y finales se determinaron en un aparato de Fisher-Johns y se informaron sin corregir.

Los espectros de IR se obtuvieron en un equipo Perkin Elmer Spectrum 400, FT-IR/FT-FIR utilizando la técnica de reflectancia por ATR. Las unidades se reportan como cm⁻¹.

Los espectros de UV se determinaron en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer modelo Lambda 2, utilizando como disolvente metanol. Las unidades se expresan como nm.

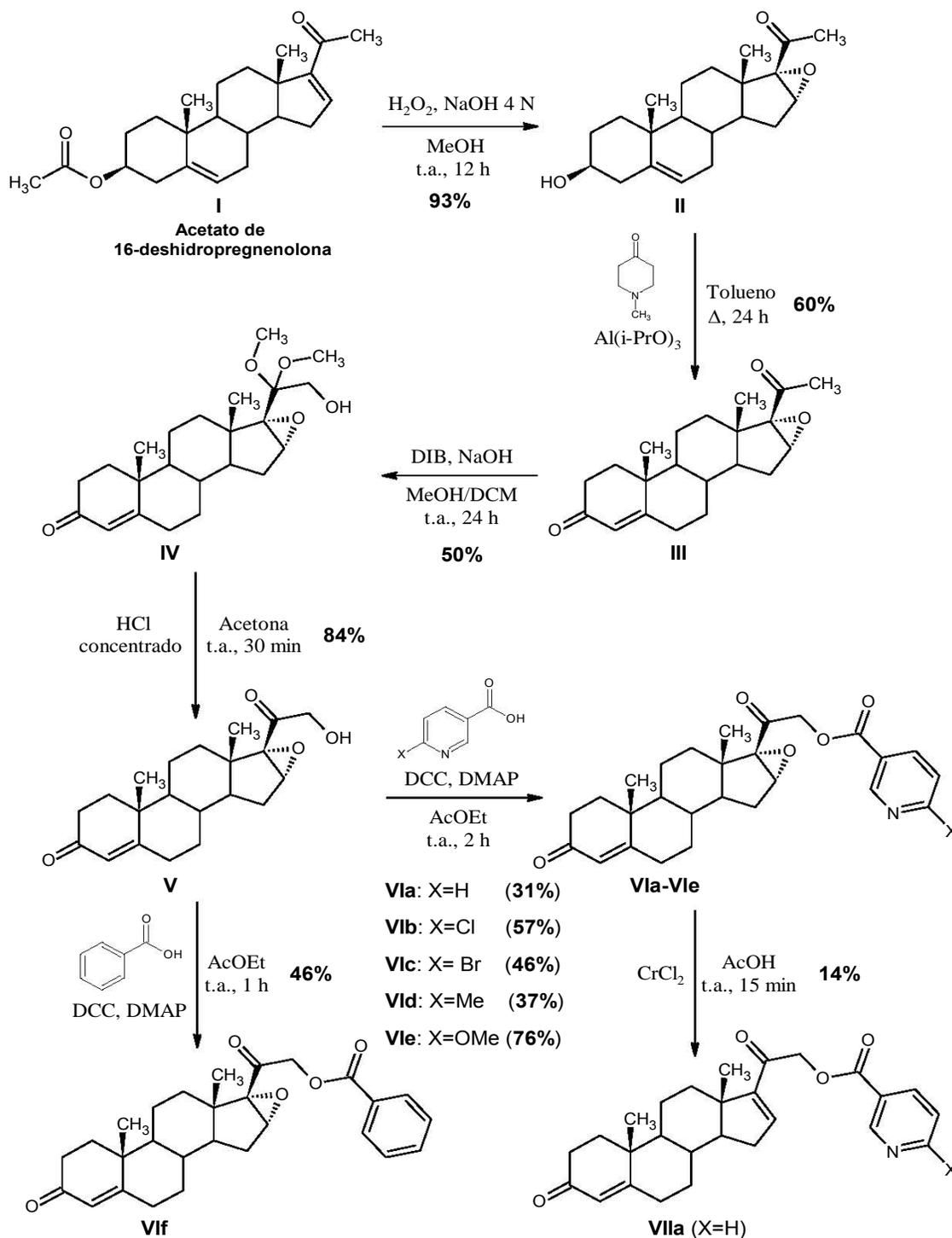
Los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C se determinaron en los equipos Inova Varian de 400 MHz y VRX-300s, respectivamente. Se empleó como disolvente CDCl₃ y TMS como estándar interno. Los desplazamientos químicos (δ) se muestran en ppm y las constantes de acoplamiento en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se expresa como sencilla (s), doble (d), triple (t), múltiple (m) y doble de doble (dd).

Los espectros de masas de los compuestos **(II)-(IV)** y **(VId)** se determinaron mediante la técnica de ionización de bombardeo de átomos rápidos (FAB) en un espectrómetro de masas Termo-Electron modelo DFS (Double Focus Sensor), empleando alcohol 3-nitrobencílico como matriz interna; mientras que la introducción de la muestra fue por medio de una sonda directa a una temperatura menor a 50 °C y se detectaron los iones positivos. Por otro lado, los espectros de masas de los compuestos **(V)**, **(VIa)-(VIc)**, **(VIe)-(VIg)** y **(VIIa)** se determinaron mediante la técnica de análisis directo en tiempo real (DART) en un espectrómetro de masas AccuTOF JMS-T100LC con un analizador Ion Sense DART modelo SVP100. El ion molecular, para ambas técnicas, se expresa como [M+1]⁺ y se informa mediante las unidades *m/z*.

La materia prima, acetato de 16-deshidropregnenolona, se compró en Aldrich-Sigma y se recristalizó con MeOH. Su identidad se comprobó con su punto de fusión (170-172°C) y se comparó con la literatura (170-178°C).

7.2. Síntesis Química

La ruta sintética consistió en una serie de 5 pasos para llegar a la obtención de los productos finales (**Vla-VIf**) y un paso adicional para la obtención del derivado reducido (**VIIa**) a partir de (**Vla**) (Esquema 14).



Esquema 14. Ruta sintética general para la obtención de los productos finales (**Vla-VIf**) y (**VIIa**).

7.2.1. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (II)

En un matraz de fondo plano de 250 mL, provisto de agitación magnética, se disolvió 1.0 g (3 mmol) de acetato de 16-deshidropregnenolona (I) en 66 mL de MeOH caliente y se adicionaron 2 mL (8 mmol) de una disolución de NaOH 4 N y 4 mL de H₂O₂ al 30% (v/v), y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el sólido obtenido se lavó con agua y se filtró al vacío. Se obtuvo un rendimiento del 93%.

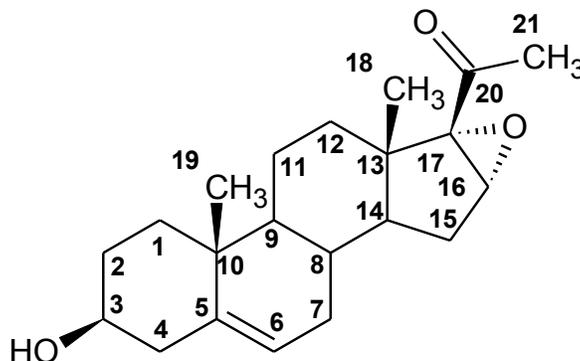


Figura 16. Estructura y numeración del compuesto II.

El compuesto II (C₂₁H₃₀O₃, PM. 330 uma) se obtuvo como un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 183-185°C y se caracterizó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto intermediario II

IR (Espectro 1, FTIR-ATR)	
Asignación	ν (cm ⁻¹)
O-H	3343
C-H alifático	2937
C=O cetona	1691
C=C olefina	1634
C-O epóxido	1243
C-O alcohol	1055
RMN ¹ H (Espectro 2, 400 MHz, CDCl ₃)	
Asignación	δ (ppm)
H-6	5.33 (d, $J=5.2$ Hz, 1H)
H-16	3.67 (s, 1H, H-16)
H-3	3.55-3.48 (m, 1H)

H-21	2.03 (s, 3H)
CH ₂ (H-1, H-2, H-4, H-7, H-11, H-12, H-15), OH	2.32-2.16 (m, 2H), 1.98-1.79 (m, 4H), 1.64-1.36 (m, 9H)
CH (H-8, H-9, H-14)	1.35-1.28 (m, 1H), 1.20-1.09 (m, 1H), 1.00-0.93 (m, 1H)
H-19	1.04 (s, 3H)
H-18	1.02 (s, 3H)
RMN ¹³C (Espectro 3, 100 MHz, CDCl₃)	
Asignación	δ (ppm)
C-20	205.1
C-5	141.3
C-6	121.1
C-3	71.8
C-17	71.2
C-16	60.7
CH ₂ y CH (C-1, C-2, C-4, C-7, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-15)	50.4, 45.7, 42.3, 37.3, 31.7, 31.6, 31.5, 29.9, 27.7, 20.6
C (C-13, C-10)	41.7, 36.8
C-21	26.1
C-19	19.5
C-18	15.3
EM (Espectro 4, FAB⁺)	
Asignación	m/z
[M+1] ⁺	331

7.2.2. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III)

Siguiendo el método descrito por Kirk y Rajagopalan,³² se adaptó y se estandarizó para la obtención del compuesto **III**, como se menciona enseguida: En un matraz de fondo redondo de 250 mL, provisto de agitación magnética y adaptado a una trampa Dean-Stark y un refrigerante, se disolvió 1.0 g (3 mmol) de **II** y 12 mL (97.6 mmol) de *N*-metil-4-piperidona en 100 mL de tolueno seco. Se destilaron 40 mL de tolueno y enseguida se adicionaron 3.1 g (15 mmol) de isopropóxido de aluminio. Posteriormente, se destilaron 10 mL de tolueno. Se retiró la trampa Dean-Stark y se colocó el refrigerante en posición de reflujo. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 24 h. La reacción se monitoreó por CCF y al término se concentró al vacío, el residuo se extrajo con 100 mL de AcOEt y se lavó con HCl 15% (2 x 50 mL), solución saturada de NaHCO₃ (2 x 50 mL) y agua destilada (2 x 50 mL). La fase orgánica se separó, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío. El sólido obtenido se recrystalizó de MeOH. Se obtuvo un rendimiento del 60%.

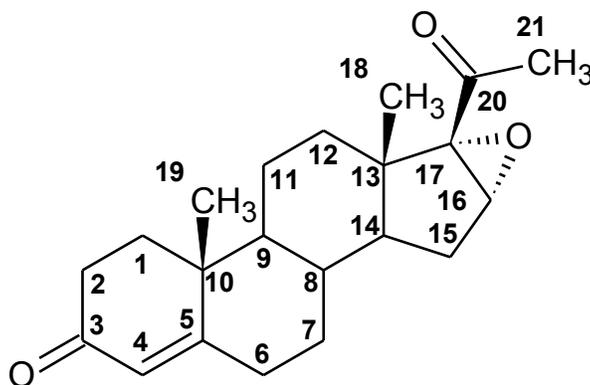


Figura 17. Estructura y numeración del compuesto **III**.

El compuesto **III** (C₂₁H₂₈O₃, PM. 328 uma) se obtuvo como un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 205-206 °C y se caracterizó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto intermediario **III**

IR (Espectro 5, FTIR-ATR)	
Asignación	ν (cm ⁻¹)
C-H alifático	2928
C=O cetona	1698
C=O α,β -insaturada	1659
C=C olefina	1608
C-O epóxido	1229

UV (Espectro 6, MeOH)	
Asignación	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
C=O α,β -insaturada	239.8
RMN ^1H (Espectro 7, 400 MHz, CDCl_3)	
Asignación	δ (ppm)
H-4	5.70 (s, 1H)
H-16	3.68 (s, 1H)
H-21	2.01 (s, 3H)
CH ₂ y CH (H-1, H-2, H-6, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15)	2.46-2.23 (m, 5H), 1.81-1.57 (m, 5H), 1.53-1.28 (m, 4H), 1.16-1.09 (m, 1H), 1.05-0.90 (m, 2H)
H-19	1.17 (s, 3H)
H-18	1.06 (s, 3H)
RMN ^{13}C (Espectro 8, 100 MHz, CDCl_3)	
Asignación	δ (ppm)
C-20	204.8
C-3	199.5
C-5	170.6
C-4	124.2
C-17	70.9
C-16	60.5
CH ₂ y CH (C-1, C-2, C-6, C-7, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-15)	54.0, 45.0, 35.7, 34.0, 33.4, 32.8, 31.7, 31.3, 27.5, 20.5
C (C-13, C-10)	41.7, 38.8
C-21	26.1
C-19	17.4
C-18	15.3
EM (Espectro 9, FAB ⁺)	
Asignación	m/z
[M+1] ⁺	329

7.2.3. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV)

Con base en el método descrito por Kamernitzky, *et al.*,³⁵ se adaptó y se estandarizó para la obtención del compuesto **IV**, como se indica enseguida: En un matraz de fondo redondo de 100 mL, provisto de agitación magnética, se disolvió 1.0 g (25 mmol) de NaOH en 30 mL de una mezcla de MeOH-DCM (2:1) y posteriormente se adicionaron 1.0 g (3 mmol) del intermediario **III** y 1.8 g (5.8 mmol) de diacetoxiyodobenceno (DIB), y se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. El progreso de la reacción se observó mediante CCF. La mezcla de reacción se concentró al vacío, se extrajo con 100 mL de AcOEt y se lavó con agua destilada (2 x 50 mL). La fase orgánica se separó, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío. El producto obtenido se purificó mediante CC con gel de sílice y se empleó como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (8:2). Se obtuvo un rendimiento del 50%.

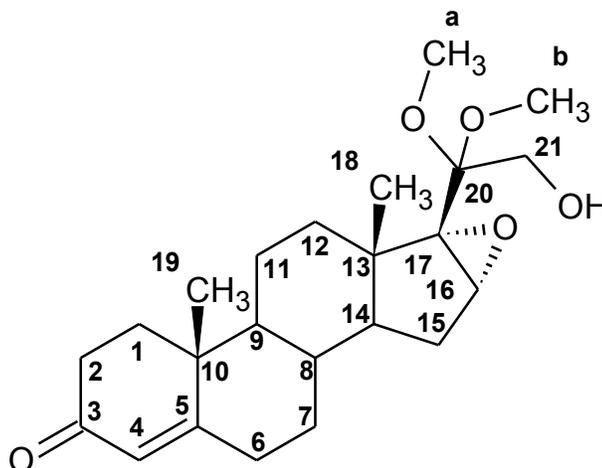


Figura 18. Estructura y numeración del compuesto **IV**.

El compuesto **IV** (C₂₃H₃₄O₅, PM. 390 uma) se obtuvo como un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 150-152 °C y se caracterizó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto intermediario **IV**

IR (Espectro 10, FTIR-ATR)	
Asignación	ν (cm ⁻¹)
O-H en C-21	3426
C-H alifático	2936
C=O α,β -insaturada	1651
C=C olefina	1610
C-O epóxido	1236

C-O alcohol	1084
UV (Espectro 11, MeOH)	
Asignación	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
C=O α,β -insaturada	240.3
RMN ^1H (Espectro 12, 400 MHz, CDCl_3)	
Asignación	δ (ppm)
H-4	5.72 (s, 1H)
H-21	3.67 (d, $J=5.9$ Hz, 2H)
H-16	3.46 (s, 1H)
OCH_3 (a), OCH_3 (b)	3.30 (s, 3H), 3.26 (s, 3H)
CH_2 y CH (H-1, H-2, H-6, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15), OH	2.46-2.23 (m, 4H), 2.07-1.95 (m, 3H), 1.90-1.84 (m, 1H), 1.80-1.44 (m, 6H), 1.32-1.21 (m, 2H), 1.12-0.89 (m, 2H)
H-19	1.19 (s, 3H)
H-18	1.06 (s, 3H)
RMN ^{13}C (Espectro 14, 100 MHz, CDCl_3)	
Asignación	δ (ppm)
C-3	199.6
C-5	171.0
C-4	124.1
C-20	102.0
C-17	69.6
C-16	62.6
C-21	58.5
OCH_3 (a), OCH_3 (b)	49.71, 49.51
CH_2 y CH (C-1, C-2, C-6, C-7, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-15)	54.0, 45.6, 35.7, 34.0, 33.6, 32.9, 32.5, 31.8, 27.0, 20.6
C (C-13, C-10)	42.5, 38.8
C-19	17.3
C-18	15.3
EM (Espectro 15, FAB^+)	
Asignación	m/z
$[\text{M}+1]^+$	391

7.2.4. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-pregn-4-eno-3,20-diona (V)

En un matraz de fondo redondo de 100 mL, provisto de agitación magnética, se disolvieron 0.5 g (1.3 mmol) de **IV** en 15 mL de acetona y se adicionaron 6 gotas de HCl concentrado. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El progreso de la reacción se observó mediante CCF. La mezcla de reacción se concentró al vacío, se extrajo con 100 mL de AcOEt y se lavó con agua destilada (2 x 50 mL). La fase orgánica se separó, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío. El producto obtenido se recristalizó de hexano-AcOEt. Se obtuvo un rendimiento del 84%.

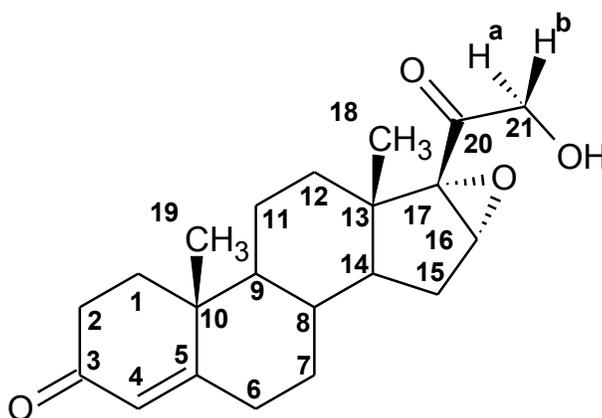


Figura 19. Estructura y numeración del compuesto **V**.

El compuesto **V** (C₂₁H₂₈O₄, PM. 344 uma) se obtuvo como un sólido blanco con un punto de fusión de 146-148 °C y se caracterizó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto intermediario **V**

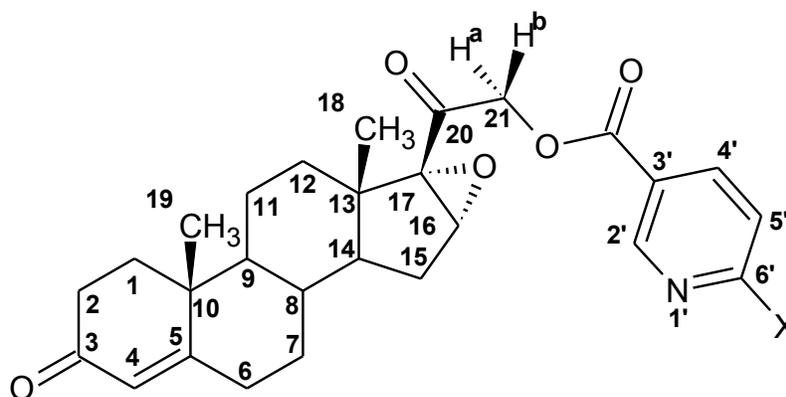
IR (Espectro 16, FTIR-ATR)	
Asignación	ν (cm ⁻¹)
O-H en C-21	3457
C-H alifático	2930
C=O cetona	1711
C=O α,β -insaturada	1660
C=C olefina	1614
C-O epóxido	1233
C-O alcohol	1067
UV (Espectro 17, MeOH)	
Asignación	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)

C=O α,β -insaturada	239.9
RMN ¹H (Espectro 18, 400 MHz, CDCl₃)	
Asignación	δ (ppm)
H-4	5.72 (s, 1H)
H ^a -21, H ^b -21	4.34 (dd, $J_1=19.7$, $J_2=4.0$ Hz, 1H), 4.04 (dd, $J_1=19.7$, $J_2=5.3$ Hz, 1H)
H-16	3.69 (s, 1H)
OH	2.94 (t, $J=4.8$ Hz, 1H)
CH ₂ y CH (H-1, H-2, H-6, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15)	2.47-2.24 (m, 4H), 2.05-1.96 (m, 3H), 1.81-1.60 (m, 5H), 1.55-1.33 (m, 3H), 1.14-0.91 (m, 2H)
H-19	1.19 (s, 3H)
H-18	1.17 (s, 3H)
RMN ¹³C (Espectro 20, 100 MHz, CDCl₃)	
Asignación	δ (ppm)
C-20	206.0
C-3	199.4
C-5	170.3
C-4	124.3
C-17	70.0
C-21	65.8
C-16	62.1
CH ₂ y CH (C-1, C-2, C-6, C-7, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-15)	53.9, 44.5, 35.8, 34.0, 33.3, 32.7, 31.7, 31.2, 27.9, 20.5
C (C-10, C-13)	42.7, 38.8
C-19	17.4
C-18	15.4
EM (Espectro 21, DART)	
Asignación	m/z
[M+1] ⁺	345

7.2.5. Síntesis de los ésteres nicotínicos (VIa-VIe)

Procedimiento general:

En un matraz de fondo redondo de 25 mL, provisto de agitación magnética, se disolvieron 0.87 mmol del ácido nicotínico correspondiente, 0.107 g (0.87 mmol) de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) y 0.180 g (0.87 mmol) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en 10 mL de AcOEt y se agitaron durante 10 min. Posteriormente, se adicionaron 0.1 g (0.29 mmol) de **V** y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h (excepto para el compuesto 6d, se agitó durante 6 h). La reacción se monitoreó mediante CCF. La mezcla de reacción se filtró al vacío, para separar la DCU formada. El filtrado se lavó con HCl 5% (1 x 20 mL), solución saturada de NaHCO₃ (1 x 20 mL) y agua destilada (1 x 20 mL). La fase orgánica se separó, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío. El correspondiente producto obtenido se purificó mediante CC con fluorisil y se empleó un gradiente con una mezcla de hexano-AcOEt. El sólido obtenido se recrystalizó de MeOH. Las constantes físicas (punto de fusión y apariencia) y los rendimientos determinados se muestran en la Tabla 5.



X= H (**VIa**), Cl (**VIb**), Br (**VIc**), Me (**VI d**), MeO (**VIe**)

Figura 20. Estructura general y numeración de los compuestos finales **VIa-VIe**.

Tabla 5. Constantes físicas de los compuestos **VIa-VIe**

Compuesto	Fórmula molecular	Peso molecular (uma)	Apariencia	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)
VIa	C ₂₇ H ₃₁ NO ₅	449	Sólido blanco	218-220	31
VIb	C ₂₇ H ₃₀ ClO ₅	483	Sólido blanco cristalino	211-213	57
VIc	C ₂₇ H ₃₀ BrO ₅	528	Sólido blanco	222-224	46
VI d	C ₂₈ H ₃₃ NO ₅	463	Sólido blanco	232-234	37
VIe	C ₂₈ H ₃₃ NO ₆	479	Sólido blanco cristalino	199-201	76

Los productos finales **Vla-Vle** se caracterizaron mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos como se muestra en las Tablas 6-9.

Tabla 6. Señales características de IR de los productos finales **Vla-Vle**

IR (FTIR-ATR, ν , cm^{-1})					
Espectro	22	26	30	34	38
Asignación	Vla	Vlb	Vlc	Vld	Vle
C-H aromático		3061	3039	3027	3062
C-H alifático	2921	2928	2935	2931	2942
C=O éster	1735	1733	1737	1732	
C=O cetona	1724	1723	1718	1722	1714
C=O α,β-insaturada	1681	1680	1681	1677	1667
C=C aromático	1592	1585	1577	1599	1600
C-O epóxido	1244	1244	1241	1244	1246
C-O-C éster	1273	1267	1276	1265	1266
	1110	1117	1088	1112	1113

Tabla 7. Señales características de RMN ^1H de los productos finales **Vla-Vle**

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, δ , ppm)					
Espectro	23	27	31(300 MHz)	35	39
Asignación	Vla	Vlb	Vlc	Vld	Vle
H-2'	9.26 (s, 1H)	9.04 (s, 1H)	8.99 (s, 1H)	9.14 (s, 1H)	8.87 (s, 1H)
H-6'	8.88 (dd, $J_1=4.8$, $J_2=1.5$ Hz, 1H)	—	—	—	—
H-4'	8.32 (dt, $J_1=8.0$, $J_2=1.9$ Hz, 1H)	8.27 (dd, $J_1=8.2$, $J_2=1.9$ Hz, 1H)	8.15 (dd, $J_1=8.3$, $J_2=2.4$ Hz, 1H)	8.22 (dd, $J_1=8.1$, $J_2=2.0$ Hz, 1H)	8.16 (dd, $J_1=8.7$, $J_2=2.3$ Hz, 1H)
H-5'	7.40 (dd, $J_1=7.4$, $J_2=4.9$ Hz, 1H)	7.43 (d, $J=8.3$ Hz, 1H)	7.60 (d, $J=8.3$ Hz, 1H)	7.26 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)	6.76 (d, $J=8.7$ Hz, 1H)
H-4	5.72 (s, 1H)	5.73 (s, 1H)	5.72 (s, 1H)	5.72 (s, 1H)	5.72 (s, 1H)

H^a-21, H^b-21	4.98 (d, <i>J</i> =17.2 Hz, 1H), 4.85 (d, <i>J</i> =17.1 Hz, 1H)	4.98 (d, <i>J</i> =17.2 Hz, 1H), 4.85 (d, <i>J</i> =17.1 Hz, 1H)	4.98 (d, <i>J</i> =17.2 Hz, 1H), 4.85 (d, <i>J</i> =17.2 Hz, 1H)	4.95 (d, <i>J</i> =17.2 Hz, 1H), 4.85 (d, <i>J</i> =17.2 Hz, 1H)	4.91 (d, <i>J</i> =17.2 Hz, 1H), 4.83 (d, <i>J</i> =17.3 Hz, 1H)
piridina-OCH₃	—	—	—	—	3.99 (s, 3H)
H-16	3.88 (s, 1H)	3.87 (s, 1H)	3.87 (s, 1H)	3.88 (s, 1H)	3.87 (s, 1H)
piridina-CH₃	—	—	—	2.64 (s, 3H)	—
CH₂ y CH (H-1, H-2, H-6, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15)	2.45-2.26 (m, 4H), 2.08-1.97 (m, 3H), 1.82-1.62 (m, 5H), 1.51-1.39 (m, 3H), 1.11-0.94 (m, 2H)	2.48-2.23 (m, 4H), 2.06-1.91 (m, 3H), 1.82-1.59 (m, 5H), 1.49-1.31 (m, 3H), 1.09-0.92 (m, 2H)	2.49-2.23 (m, 4H), 2.10-1.93 (m, 3H), 1.79-1.60 (m, 5H), 1.52-1.36 (m, 3H), 1.10-0.89 (m, 2H)	2.43-2.25 (m, 4H), 2.06-1.89 (m, 3H), 1.81-1.61 (m, 5H), 1.46-1.32 (m, 3H), 1.08-0.93 (m, 2H)	2.46-2.25 (m, 4H), 2.07-1.96 (m, 3H), 1.81-1.60 (m, 5H), 1.51-1.38 (m, 3H), 1.11-0.92 (m, 2H)
H-19	1.19 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)	1.18 (s, 3H)
H-18	1.16 (s, 3H)				

Tabla 8. Señales características de RMN ¹³C de los productos finales **Vla-Vle**

RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz, δ, ppm)					
Espectro	24	28	32	36	40
Asignación	Vla	Vlb	Vlc	Vld	Vle
C-20	199.4	199.4	197.1	199.4	199.4
C-3	198.5	198.4	197.05	198.7	198.9
C-5	170.4	170.4	169.0	170.5	170.4
R'COOR	164.9	164.0	162.4	165.0	167.2
C-6'	154.0	156.3	150.0	163.9	165.0
C-2'	151.3	151.6	145.6	150.7	150.6
C-4'	137.4	139.9	138.3	137.9	139.8
C-3'	125.4		123.6	122.8	118.9
C-4	124.3	124.4	122.5	124.3	124.2
C-5'	123.5	124.3	127.1	123.2	110.9

C-17	70.5	70.5	68.7	70.5	70.5
C-21	66.7	66.9	65.5	66.6	66.4
C-16	61.7	61.7	60.1	61.7	61.6
piridina-OCH₃	_____	_____	_____	_____	54.2
piridina-CH₃	_____	_____	_____	25.1	_____
CH₂ y CH (C-1, C-2, C-6, C-7, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-15)	54.0, 44.5, 35.8, 34.0, 33.3, 32.8, 31.7, 31.2, 27.9, 20.5	54.0, 44.5, 35.8, 34.1, 33.3, 32.8, 31.7, 31.2, 27.9, 20.5	52.4, 42.9, 34.1, 32.6, 31.6, 31.2, 30.2, 29.8, 26.2, 19.0	54.0, 44.5, 35.8, 34.0, 33.3, 32.8, 31.7, 31.2, 27.9, 20.5	54.0, 44.5, 35.8, 34.0, 33.3, 32.8, 31.7, 31.2, 27.9, 20.5
C (C-13, C-10)	42.8, 38.8	42.8, 38.8	41.0, 37.3	42.8, 38.8	42.7, 38.8
C-19	17.4	17.4	15.9	17.4	17.4
C-18	15.3	15.3	13.8	15.3	15.3

Tabla 9. Señales características de EM de los productos finales **Vla-VIe**

EM (DART, m/z)					
Espectro	25	29	33	37	41
Asignación	Vla	Vlb	Vlc	Vld	VIe
[M+1]⁺	450	484	528	464	480 (FAB ⁺)
[M+3]⁺		486	530		

7.2.6. Síntesis del éster benzoico (Vlf)

En un matraz de fondo redondo de 25 mL, provisto de agitación magnética, se disolvieron 0.053 g (0.44 mmol) de ácido benzoico, 0.053 g (0.44 mmol) de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) y 0.090 g (0.44 mmol) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en 10 mL de AcOEt y se agitaron durante 10 min. Posteriormente, se adicionaron 0.1 g (0.29 mmol) de **V** y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se monitoreó mediante CCF. Al término de la reacción, la mezcla se filtró al vacío para separar la DCU formada. El filtrado se lavó con HCl 15% (1 x 20 mL), solución saturada de NaHCO₃ (1 x 20 mL) y agua destilada (1 x 20 mL). La fase orgánica se separó, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío. El producto obtenido se recrystalizó de MeOH. Se obtuvo un rendimiento del 46%.

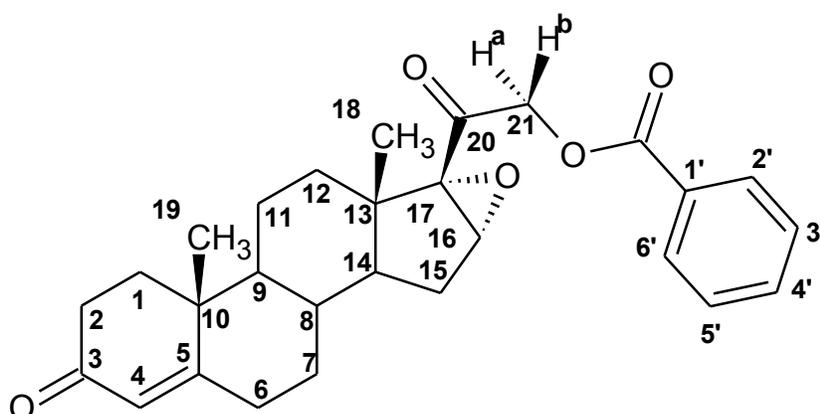


Figura 21. Estructura y numeración del compuesto Vlf.

El compuesto **Vlf** (C₂₈H₃₂O₅, PM. 448 uma) se obtuvo como un sólido blanco con un punto de fusión de 203-205 °C y se caracterizó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto final **Vlf**

IR (Espectro 42, FTIR-ATR)	
Asignación	ν (cm ⁻¹)
C-H aromático	3071
C-H alifático	2932
C=O cetona	1711
C=O α,β -insaturada	1671
C=C aromático	1599
C-O epóxido	1235

C-O-C éster	1269
	1104
RMN ¹H (Espectro 43, 400 MHz, CDCl₃)	
Asignación	δ (ppm)
H-2' y H-6'	8.08 (dd, $J_1=8.2$, $J_2=1.2$ Hz, 2H)
H-4'	7.58 (t, $J=7.4$ Hz, 1H)
H-3' y H-5'	7.45 (t, $J=7.7$ Hz, 2H)
H-4	5.73 (s, 1H)
H ^a -21, H ^b -21	4.92 (d, $J=17.2$ Hz, 1H), 4.85 (d, $J=17.3$ Hz, 1H)
H-16	3.89 (s, 1H)
CH ₂ y CH (H-1, H-2, H-6, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15)	2.47-2.26 (m, 4H), 2.08-1.97 (m, 3H), 1.83-1.59 (m, 5H), 1.51-1.39 (m, 3H), 1.11-0.92 (m, 2H)
H-19	1.19 (s, 3H)
H-18	1.17 (s, 3H)
RMN ¹³C (Espectro 44, 100 MHz, CDCl₃)	
Asignación	δ (ppm)
C-20	200.8
C-3	200.3
C-5	171.8
R' <u>C</u> OO R	167.5
C-4'	134.9
C-2' y C-6'	131.37
C-1'	130.8
C-3' y C-5'	129.9
C-4	125.6
C-17	71.9
C-21	67.8
C-16	63.0
CH ₂ y CH (C-1, C-2, C-6, C-7, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14, C-15)	55.4, 45.9, 37.1, 35.4, 34.7, 34.1, 33.1, 32.6, 29.2, 21.87
C (C-13, C-10)	44.1, 40.2

C-19	18.7
C-18	16.7
EM (Espectro 45, DART)	
Asignación	<i>m/z</i>
[M+1]⁺	449

7.2.7. Síntesis de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VIIa)

De acuerdo al método publicado por Cole y Julian,⁴⁰ se adaptó y estandarizó para la obtención del compuesto **VIIa**, como se describe enseguida: En un matraz de fondo redondo de 100 mL, provisto de agitación magnética, se disolvieron 0.1 g (0.22 mmol) de **VIa** en 3 mL de AcOH glacial, y se adicionaron 0.128 g (1.04 mmol) de CrCl₂ anhidro. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. Al término de la reacción, la mezcla se vertió en 50 mL de una disolución fría de HCl 5% (v/v) y se formó un precipitado fino que se extrajo con AcOEt (5 x 10 mL). La fase orgánica se separó y se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ (1 x 50 mL) y agua destilada (1 x 50 mL). La fase orgánica se separó, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío. El producto obtenido se purificó mediante CC con gel de sílice y se empleó un gradiente con una mezcla de hexano-AcOEt. El sólido obtenido se recrystalizó de MeOH. Se obtuvo un rendimiento del 14%.

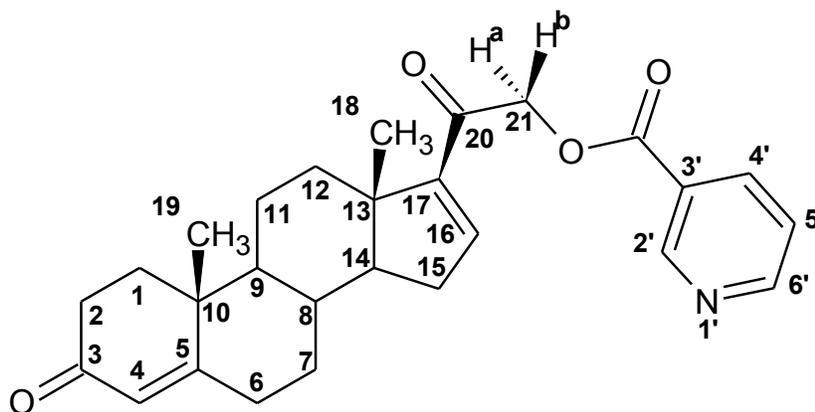


Figura 22. Estructura y numeración del compuesto **VIIa**.

El compuesto **VIIa** (C₂₇H₃₁NO₄, PM: 433 uma) se obtuvo como un sólido blanco con un punto de fusión de 202-204 °C y se caracterizó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas del compuesto final **VIIa**

IR (Espectro 46, FTIR-ATR)	
Asignación	ν (cm ⁻¹)
C-H aromático	3063
C-H alifático	2938
C=O cetona	1728
C=O α,β -insaturada	1671
C=C aromático	1586

C-O-C éster	1276
	1108
RMN ¹H (Espectro 47, 300 MHz, CDCl₃)	
Asignación	δ (ppm)
H-2'	9.28 (s, 1H)
H-6'	8.79 (s, 1H)
H-4'	8.36 (d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H)
H-5'	7.41 (dd, <i>J</i> ₁ =7.8, <i>J</i> ₂ =4.8 Hz, 1H)
H-16	6.83 (d, <i>J</i> =1.4 Hz, 1H)
H-4	5.72 (s, 1H)
H ^a -21, H ^b -21	5.31 (d, <i>J</i> =16.0 Hz, 1H), 5.15 (d, <i>J</i> =15.9 Hz, 1H)
CH ₂ y CH (H-1, H-2, H-6, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15)	2.44-2.30 (m, 5H), 2.21-2.09 (m, 1H), 2.06-1.96 (m, 1H), 1.91-1.35 (m, 8H), 1.16-1.01 (m, 2H)
H-19	1.20 (s, 3H)
H-18	0.97 (s, 3H)
RMN ¹³C (Espectro 48, 100 MHz, CDCl₃)	
Asignación	δ (ppm)
C-3	199.6
C-20	189.9
C-5	170.8
R' <u>C</u> OOOR	164.8
C-6'	153.7
C-2'	151.8
C-4'	151.1
C-17	144.3
C-16	137.6
C-3'	125.7
C-4	124.2
C-5'	123.5
C-21	66.4
CH ₂ y CH (C-1, C-2, C-7, C-8, C-9, C-11, C-12, C-14,)	55.4, 54.1, 35.6, 34.3, 34.0, 33.9, 31.9, 20.8

C (C-13, C-10)	46.9, 38.8
CH₂ alílico (C-6, C-15)	32.8
C-19	17.3
C-18	16.1
EM (Espectro 49, DART)	
Asignación	<i>m/z</i>
[M+1]⁺	434

7.3. Evaluación Biológica

7.3.1. Evaluación de la actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de próstata

Se evaluó la actividad antiproliferativa de los productos intermediarios (**III** y **V**) y finales (**VIIa-VIIc** y **VIIa**) en cultivos de líneas celulares de cáncer de próstata como PC-3 (andrógeno-independiente) y LNCaP (andrógeno-dependiente) mediante la técnica de tinción con Sulforrodamina B (SRB).

Las líneas celulares cancerosas se cultivaron en medio RPMI-1640 adicionado de suero fetal bovino (SFB) y glutamina 2.0 μM y se incubaron bajo condiciones de humedad y una atmósfera de 5% de CO_2 a una temperatura de 37°C. Las células adheridas a las paredes del frasco se removieron mediante una solución de tripsina-EDTA al 0.05%. La densidad del inóculo se ajustó a 7.5×10^4 células/mL (PC-3) y 3.0×10^4 células/mL (LNCaP). La suspensión celular se inoculó en placas de 96 pozos y se incubaron durante un periodo de 24 h a 37°C.

Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO para obtener una concentración de 20 mM. Se agregaron 100 μL de la solución a cada uno de los pozos que contenían las líneas celulares (plato experimental) ó 100 μL de DMSO ó vehículo (plato basal), para obtener un volumen total de 200 μL por cada pozo y una concentración de 50 μM (compuestos de prueba). Los platos experimentales se incubaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y saturada de humedad. El plato basal se incubó durante 1 h bajo las mismas condiciones.

Transcurridos los periodos de incubación respectivos, cada uno de los platos experimentales y basales se fijaron con 50 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 50%, y se incubaron durante 60 minutos a 4°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se lavaron con agua desionizada dejándolos secar durante 24 h. Una vez secos, se tiñeron con 100 μL de SRB 0.4% (p/v) en AcOH al 1% y el exceso de SRB se retiró mediante lavados de AcOH 1% y se dejaron secar durante un periodo de tiempo de 24 h. Finalmente, el complejo SRB-proteínas se disolvió con una solución de Tris (tris(hidroximetil)aminometano) pH 10.5 y se determinó la densidad óptica (DO) de los micropozos mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La DO es directamente proporcional al crecimiento celular e inversamente proporcional al grado de inhibición del crecimiento de cada compuesto de prueba. La actividad antiproliferativa se informó como porcentaje de inhibición del crecimiento celular y se determinó mediante la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ de inhibición del crecimiento} = 100 - \left[\left(\frac{DO \text{ promedio muestra}}{DO \text{ promedio vehículo}} \right) * 100 \right]$$

Después de calcular el % de inhibición de crecimiento celular por cada muestra y por triplicado, se determinó el promedio y se calculó su respectivo error estándar medio (EEM).

7.3.2. Evaluación de la toxicidad en células mononucleares

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) son aquellas que se caracterizan por tener sólo un núcleo redondo como los linfocitos o los monocitos. Estas células sanguíneas se obtienen de la sangre usando un medio de separación (ficoll hypaque de densidad 1.078g/mL) y por gradientes de centrifugación, se separa la sangre en varios extractos celulares, donde los monocitos y linfocitos forman un anillo translúcido por encima de los eritrocitos y por debajo de la capa del plasma. Para conseguir la separación, la muestra de sangre se deposita sobre el medio de separación y se centrifuga para acelerar la separación, el medio aglutina a los eritrocitos.

Para la obtención de las células mononucleares, se emplearon ratas Wistar macho de 250-300 g que fueron anestesiadas con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal. Una vez que el animal estuvo completamente anestesiado, en condiciones de asepsia, se procedió a limpiar con etanol la parte torácica y se introdujo una aguja con su respectiva jeringa de 10 mL cargada con 1 mL de heparina. Se extrajeron 9 mL de sangre por punción cardíaca y se mezcló suavemente, para impedir la formación de coágulos.

En tubos cónicos de vidrio, a los cuales previamente se les añadió 3 mL del medio de separación, se depositaron lentamente 3 mL de sangre sin diluir, evitando que se mezclara la sangre y el medio de separación; posteriormente, los tubos se centrifugaron en un rotor oscilante a temperatura ambiente, iniciando con una fuerza de centrifugación relativa de 500 g y se incrementó hasta alcanzar 2000 g durante 20 min. Una vez que terminó la centrifugación, se recolectó la fracción mononuclear con una pipeta Pasteur, se depositó en los tubos cónicos, se adicionó buffer de fosfato (PBS) pH 7.2, y se procedió a centrifugar a 2500 g por 5 min. Una vez que terminó la centrifugación, el sobrenadante se decantó, se agregó PBS para resuspender el pellet y se centrifugó nuevamente, para eliminar los restos del medio de separación. El pellet celular se resuspendió en medio de cultivo RPMI y se determinó la viabilidad de las células usando azul de tripano, ajustando la densidad de las CMSP a 1×10^6 cel/mL.

En placas de 96 pozos, se depositaron 100 μ l de las CMSP, se incubaron durante 1 h. Después del tiempo de incubación, se adicionó el compuesto de prueba a la concentración de 50 μ M en un volumen de 100 μ l y se incubó, de nueva cuenta, en una atmósfera de CO₂ a 37°C durante 24 h. Posteriormente, las células se fijaron con una solución de ácido tricloroacético frío al 50% por 1 h a 4°C, se lavaron tres veces con agua de la llave y se dejaron secar a temperatura ambiente. Enseguida, se tiñeron con sulforrodamina B (SRB) y se lavaron con una solución de ácido acético al 1 %. Una vez secas las placas, se añadió 100 μ L de un buffer de Tris, para favorecer la solubilidad de la SRB, y se determinaron en un lector de Elisa a una longitud de onda de 515 nm.

La toxicidad celular se determinó mediante la ecuación descrita en el apartado 7.3.1.

7.3.3. Resultados de la evaluación de la actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de próstata y toxicidad en células mononucleares

Se evaluó la actividad antiproliferativa de los productos intermedios (III y V) y los productos finales (VIa-VI f y VIIa) sobre líneas celulares de cáncer de próstata como son PC-3 (independiente de andrógenos) y LNCaP (dependiente de andrógenos) mediante la técnica de sulforrodamina B. Adicionalmente, se evaluó la toxicidad de los compuestos frente a células mononucleares (CMN) como un modelo de células sanas o normales. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición del crecimiento celular con su respectivo error estándar medio (EEM), como se observa en la Tabla 12.

Tabla 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las líneas celulares de cáncer de próstata y de células mononucleares por cada compuesto evaluado

Compuesto	% inhibición del crecimiento (50 μ M)		
	PC-3	LNCaP	CMN
Referencia			
Flutamida	63.6 \pm 2.2	78.2 \pm 11.7	NE
Intermediarios			
3	29.8 \pm 0.8	SA	SA
5	92.7 \pm 7.2	83.2 \pm 6.2	SA
Finales			
6a	38.5 \pm 6.2	SA	SA
6b	38.4 \pm 7.9	SA	SA
6c	SA	SA	SA
6d	SA	SA	SA
6e	58.9 \pm 3.4	42.6 \pm 2.7	SA
6f	23.3 \pm 6.0	SA	SA
7a	87.6 \pm 1.9	65.3 \pm 0.4	SA

SA: sin actividad; NE: no evaluado

7.4. Análisis Computacional

7.4.1. Cálculo de descriptores moleculares

El análisis computacional se llevó a cabo en una computadora HP w1907 con un procesador Intel® Pentium Dual-Core E2180 de 2 GB de RAM y 360 GB de disco duro. Se realizó el modelado molecular empleando el programa Spartan 08®. En primera instancia, se llevó a cabo la construcción de cada una de las moléculas para realizar un análisis conformacional mediante el método de mecánica molecular MMFF (campo de fuerza molecular Merck). Posteriormente, se obtuvieron distintos conformeros, entre los cuales se seleccionó el de menor energía. Una vez seleccionado dicho conformero, se procedió a llevar a cabo la optimización de la geometría aplicando el método semi-empírico AM1 (Austin Model 1) y se realizó el cálculo de los descriptores moleculares como volumen molecular, área molecular, área superficial polar, ovalidad, polarizabilidad, momento dipolar y log P (Ghose-Crippen). Los resultados de los cálculos computacionales correspondientes a los compuestos evaluados biológicamente se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Descriptores moleculares calculados para los compuestos intermediarios y finales

Descriptores moleculares	III	V	VIa	VIb	VIc	VI d	VIe	VI f	VIIa
Volumen (A^3)	347.41	354.85	455.83	469.20	473.85	474.22	483.79	461.79	450.48
Área (A^2)	343.43	352.40	453.44	468.88	473.80	473.63	484.91	458.09	450.21
PSA (A^2)	40.102	59.548	67.614	67.700	67.656	67.532	73.774	60.154	56.309
Ovalidad	1.44	1.45	1.58	1.61	1.61	1.61	1.63	1.59	1.58
Polarizabilidad	67.19	67.79	76.17	77.32	77.71	77.66	78.49	76.58	75.73
Momento dipolar	2.26	2.96	4.57	4.09	4.07	4.97	4.15	4.44	6.59
Log P	3.53	2.83	3.34	4.18	4.52	4.12	3.87	4.16	4.19

8. REFERENCIAS

1. Mahato, S. B.; Garai, S. Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids* **1997**, 62(4), 332-345.
2. Primo, E. Química orgánica básica y aplicada: De la molécula a la industria, Vol. 2; Reverté: Barcelona, España, 1995; p. 947-948, 953-954.
3. Bruice, P. Química orgánica, 5ª ed. Pearson Educación: México, D.F., 2008; p.1186-1189.
4. Wade, L. Química Orgánica, 5ª ed. Pearson Prentice-Hall: Madrid, 2004; p. 922-924,1171-1173.
5. Lednicer, D. Steroid Chemistry at a Glance. Wiley: West Sussex, 2011; p. 3-7.
6. Roskoski, R. Bioquímica. McGraw-Hill: México, D.F., 1998; p. 456-458, 462-482.
7. Delgado, A. Introducción a la Química Terapéutica, 2ª ed. Ediciones Díaz de Santos: Madrid, 2004; p. 357-365, 399-403.
8. Berrevoets, C.; Umar, A.; Brinkmann, A. Antiandrogens: selective androgen receptor modulators. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2002**, 198, 97-103.
9. Rojas, F.; Manzo, J.; Soto, A.; Aranda, G.; Juárez, E.; Coria, G.; Toledo, R.; Locia, J.; Hernández, M. El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática. *Rev eNeurobiología* **2011**, 2(4), 1-15.
10. Mycek, M.; Harvey, R.; Champe, P. Farmacología, 2ª ed.; McGraw-Hill: México, D.F., 2008; p. 322-324.
11. Medline Plus. Enfermedades de la próstata. Recuperado el 30 de diciembre de 2014 de: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/prostatediseases.html>
12. Sociedad Americana de Cáncer. Cáncer de próstata. Recuperado el 12 de febrero de 2015 de: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeprostata/guiadetallada/cancer-de-prostata-what-is-what-is-prostate-cancer>.
13. Xu, R.; Zhang, Y.; Ye, X.; Xue, S.; Sh, J.; Pan, J.; Chen, Q. Inhibition effects and induction of apoptosis of flavonoids on the prostate cancer cell line PC-3 *in vitro*. *Food Chem.* **2013**, 138, 48-53.
14. Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud. Los cinco tipos de cáncer que más afecta a los mexicanos. Recuperado el 30 de diciembre de 2014 de: <http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>.
15. INEGI. Estadísticas a propósito del... Día de Muertos (2 de noviembre). Datos Nacionales. Recuperado el 30 de diciembre de 2014 de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/muertos0df>
16. Khosravi, P.; Pérez, G. Cáncer de próstata metastásico. *Oncología* **2006**, 29(10), 398-404.

17. Asociación Americana del Cáncer. Terapia hormonal. Recuperado el 12 de febrero de 2015 de: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeprostata/guiadetallada/cancer-de-prostata-treating-hormone-therapy>.
18. Cabeza, M.; Bratoeff, E.; Ramírez, E.; Flores, E. Mecanismo de acción de antiandrógenos esteroidales. Serie Académicos CBS-UAM: México, D.F., 2004; p. 7-16, 23-56.
19. Picard, F.; Baston, E.; Reichert, W.; Hartmann, R. Synthesis of *N*-substituted piperidine-4-(benzylidene-4-carboxylic acids) and evaluation as inhibitors of steroid-5 α -reductase type 1 and 2. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1479-1487.
20. Mendoza Jasso, María Eugenia. Síntesis y evaluación biológica de derivados de la deshidroepiandrosterona con un grupo azol en C-17 y ésteres de cinamoilo en C-3. Tesis de Maestría, UNAM, **2015**.
21. Rang, H.; Dale, M.; Ritter, J.; Moore, P. Farmacología, 6^a ed. Elsevier: Barcelona, España, 2004; p. 436-437.
22. Chan, F.; Choi, H.; Chen, Z.; Chan, P.; Huang, Y. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer Lett.* **2000**, *160*, 219-228.
23. Khatik, G.; Kaur, J.; Kumar, V.; Tikoo, K.; Nair, V. 1,2,4-Oxadiazoles: A new class of anti-prostate cancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1912-1916.
24. Adsule, S.; Banerjee, S.; Ahmed, F.; Padhye, S.; Sarkar, F. Hybrid anticancer agents: Isothiocyanate-progesterone conjugates as chemotherapeutic agents and insights into their cytotoxicities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1247-1251.
25. Patrick, G. An Introduction to Medicinal Chemistry, 4^a ed. Oxford University Press: Oxford, 2009; p. 222-223, 230-231.
26. Avendaño, C. Introducción a la Química Terapéutica, 2^a ed. Mc Graw-Hill: Madrid, 2001; p. 73-77.
27. Galbis, J. Panorama actual de la química farmacéutica, 2^a ed. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla: Sevilla, 2004; p. 265-274.
28. Rojas González, Carlos Andrés. Síntesis de nuevos derivados esteroidales basados en el esqueleto del pregnano con un grupo éster de ácido nicotínico en C-3 y su actividad citotóxica. Tesis de Maestría, UNAM. **2014**.
29. Mendoza Jasso, María Eugenia. Obtención de nuevos 16-haloderivados de la pregnenolona con potencial actividad biológica. Tesis de Licenciatura, UNAM. **2012**.
30. Reyes Mosso, Alfonsina. Síntesis de ésteres del grupo cinamoilo por radiación de microondas con potencial actividad citotóxica. Tesis de Licenciatura, UNAM. **2012**.
31. Acevedo Hernández, Leobardo Iván. Síntesis de 17 α -saliciloxiderivados de la progesterona, asistida por microondas y su evaluación como potenciales agentes citotóxicos. Tesis de Licenciatura, UNAM. **2012**.



32. Kirk, D.; Rajagopalan, M. Synthesis of 18-substituted steroids. Part II (1). Improvements in the preparation of 18-hydroxyprogesterone. *Steroids* **1976**, 27(2), 269-274.
33. Djerassi, C. Oppenauer oxidation. *Org. React.* **1951**, 6, 207-272.
34. Kurti, L.; Czako, B. Strategic applications of named reactions in organic synthesis. Elsevier Academic Press: EUA, 2005; p. 320-321.
35. Kamernitzky, A.; Turuta, A.; Fadeeva, T.; Istomina, Z. Use of diacetoxyphenyliodine for α -hydroxylation of 20-oxosteroids fused with heterocycles in position 16 α , 17 α . *Synthesis* **1985**, 3, 326-328.
36. Zhdankin, V. Hypervalent iodine(III) reagents in organic synthesis. *ARKIVOC* **2009**, i, 1-62.
37. Prakash, O.; Singh, S. Iodobenzene diacetate and related hypervalent iodine reagents in the synthesis of heterocyclic compounds. *Aldrichimica Acta* **1994**, 27(1), 15-23.
38. Neises, B.; Steglich, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, 17, 522-524.
39. Organic Chemistry Portal. Steglich Esterification. Recuperado el 9 de abril de 2015 de: <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/steglich-esterification.shtm>
40. Cole, W.; Julian, P. Reduction of epoxy ketones by chromous salts. *J. Org. Chem.* **1954**, 19, 131-138.
41. Morris, S.; Maruyama, M. Reductive elimination of epoxide to olefins with zinc-cooper couple. *J. Org. Chem.* **1971**, 36(9), 1187-1191.

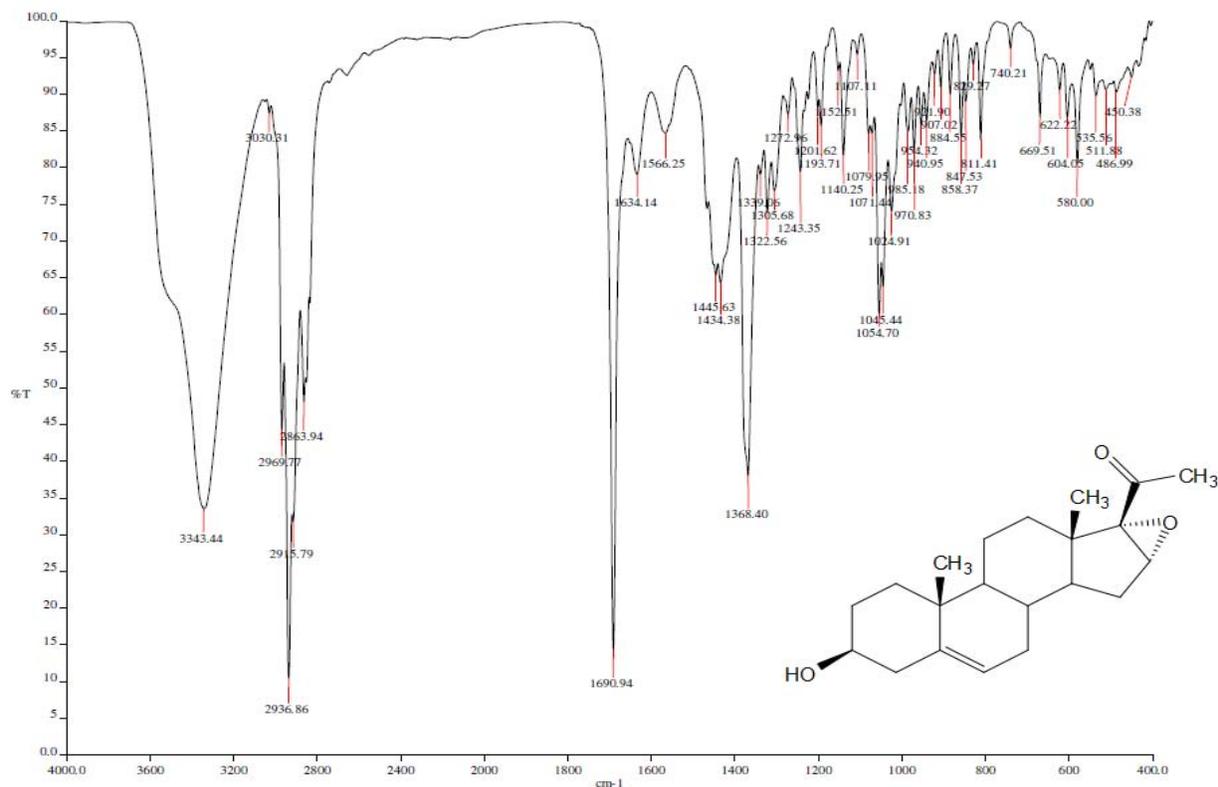
9. ANEXO

9.1. Lista de Espectros de IR, UV, RMN ¹H, RMN ¹³C y EM

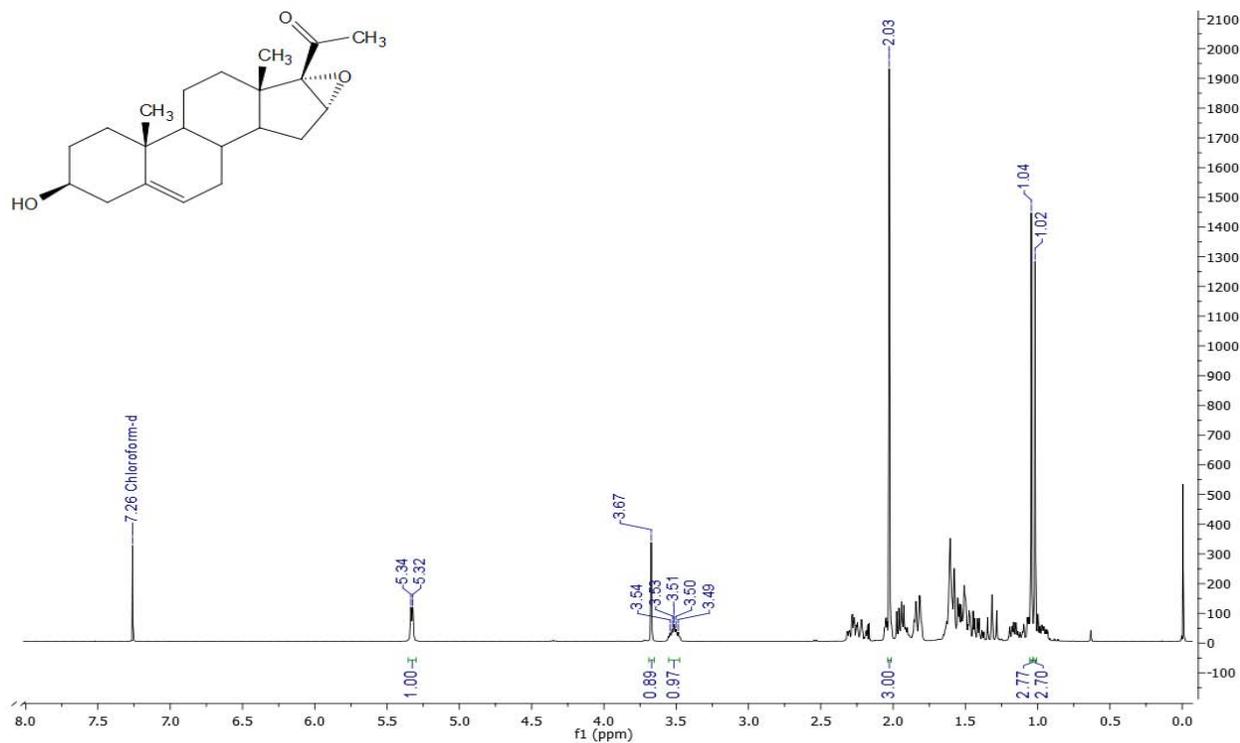
	Página
Espectro 1. IR de 16α,17α-epoxi-3β-hidroxipregn-5-en-20-ona (II).....	64
Espectro 2. RMN ¹ H de 16α,17α-epoxi-3β-hidroxipregn-5-en-20-ona (II).....	64
Espectro 3. RMN ¹³ C de 16α,17α-epoxi-3β-hidroxipregn-5-en-20-ona (II).....	65
Espectro 4. EM de 16α,17α-epoxi-3β-hidroxipregn-5-en-20-ona (II).....	65
Espectro 5. IR de 16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).....	66
Espectro 6. UV de 16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).....	66
Espectro 7. RMN ¹ H de 16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).....	67
Espectro 8. RMN ¹³ C de 16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).....	67
Espectro 9. EM de 16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).....	68
Espectro 10. IR de 16α,17α-epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV).....	68
Espectro 11. UV de 16α,17α-epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV).....	69
Espectro 12. RMN ¹ H de 16α,17α-epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV).....	69
Espectro 13. RMN ¹ H de 16α,17α-epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV) con intercambio D ₂ O.....	70
Espectro 14. RMN ¹³ C de 16α,17α-epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV)....	70
Espectro 15. EM de 16α,17α-epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV).....	71
Espectro 16. IR de 16α,17α-epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V).....	71
Espectro 17. UV de 16α,17α-epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V).....	72
Espectro 18. RMN ¹ H de 16α,17α-epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V).....	72
Espectro 19. RMN ¹ H de 16α,17α-epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V) con intercambio D ₂ O.....	73
Espectro 20. RMN ¹³ C de 16α,17α-epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V).....	73
Espectro 21. EM de 16α,17α-epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V).....	74
Espectro 22. IR de 21-(pirid-3-il)carboniloxi-16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIa).....	74
Espectro 23. RMN ¹ H de 21-(pirid-3-il)carboniloxi-16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIa).....	75
Espectro 24. RMN ¹³ C de 21-(pirid-3-il)carboniloxi-16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIa).....	75
Espectro 25. EM de 21-(pirid-3-il)carboniloxi-16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIa)....	76

Espectro 26. IR de 21-(6-cloropirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V lb).....	76
Espectro 27. RMN ¹ H de 21-(6-cloropirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V lb).....	77
Espectro 28. RMN ¹³ C de 21-(6-cloropirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V lb).....	77
Espectro 29. EM de 21-(6-cloropirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V lb).....	78
Espectro 30. IR de 21-(6-bromopirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V lc).....	78
Espectro 31. RMN ¹ H de 21-(6-bromopirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V lc).....	79
Espectro 32. RMN ¹³ C de 21-(6-bromopirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V lc).....	79
Espectro 33. EM de 21-(6-bromopirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V lc).....	80
Espectro 34. IR de 21-(6-metilpirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V ld).....	80
Espectro 35. RMN ¹ H de 21-(6-metilpirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V ld).....	81
Espectro 36. RMN ¹³ C de 21-(6-metilpirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V ld).....	81
Espectro 37. EM de 21-(6-metilpirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V ld).....	82
Espectro 38. IR de 21-(6-metoxipirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V le).....	82
Espectro 39. RMN ¹ H de 21-(6-metoxipirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V le).....	83
Espectro 40. RMN ¹³ C de 21-(6-metoxipirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V le).....	83
Espectro 41. EM de 21-(6-metoxipirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V le).....	84
Espectro 42. IR de 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (V lf).....	84

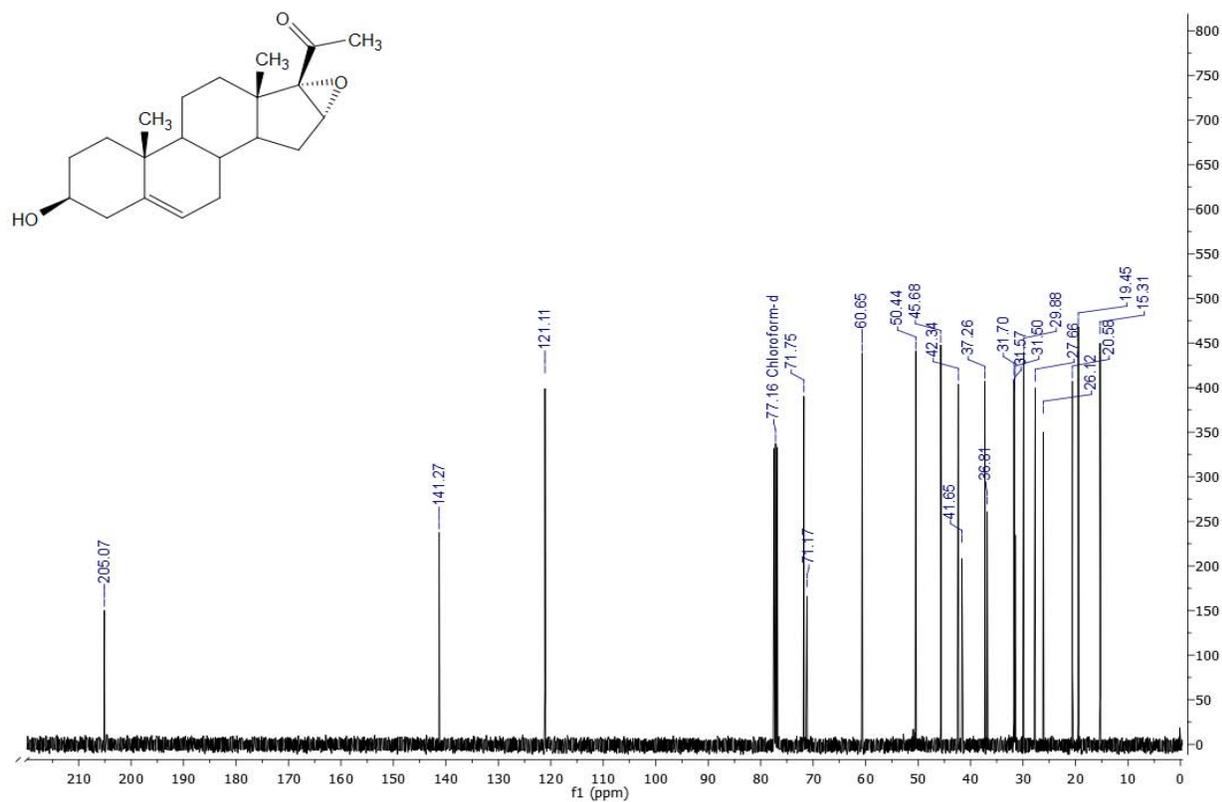
Espectro 43. RMN ^1H de 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIf).....	85
Espectro 44. RMN ^{13}C de 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIf).....	85
Espectro 45. EM de 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIf).....	86
Espectro 46. IR de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VIIa).....	86
Espectro 47. RMN ^1H de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VIIa).....	87
Espectro 48. RMN ^{13}C de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VIIa).....	87
Espectro 49. EM de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VIIa).....	88



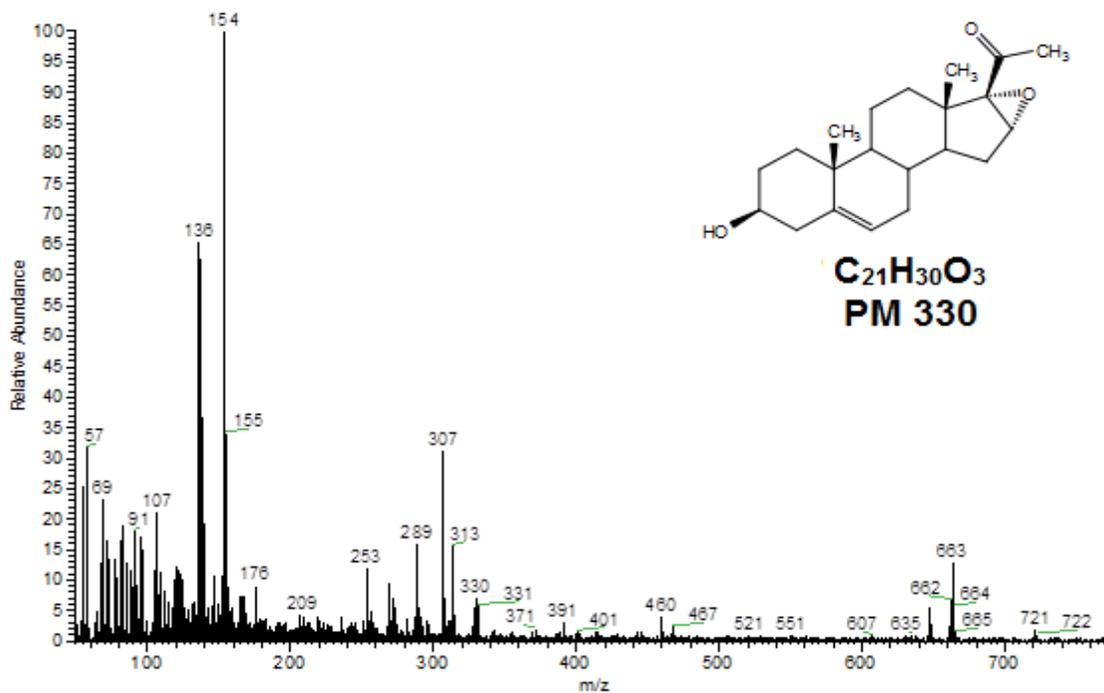
Espectro 1. IR (FTIR-ATR) de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (II).



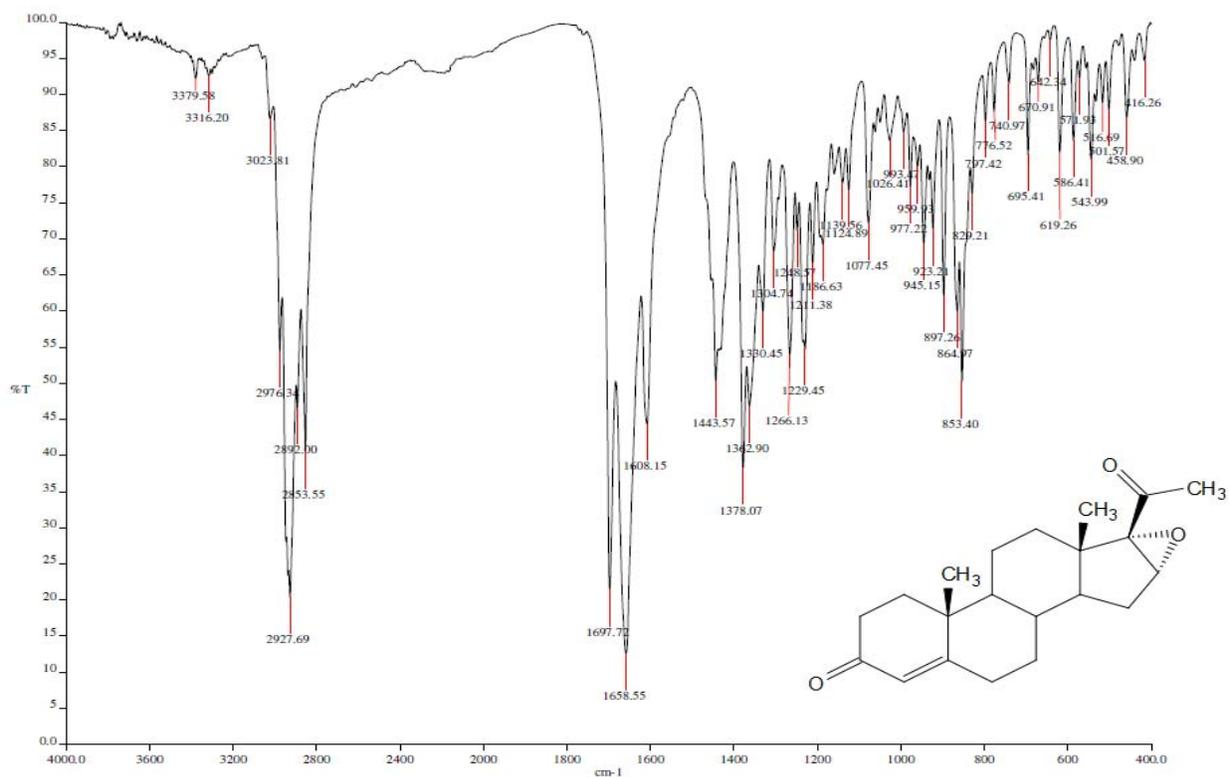
Espectro 2. RMN ¹H (CDCl₃) de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (II).



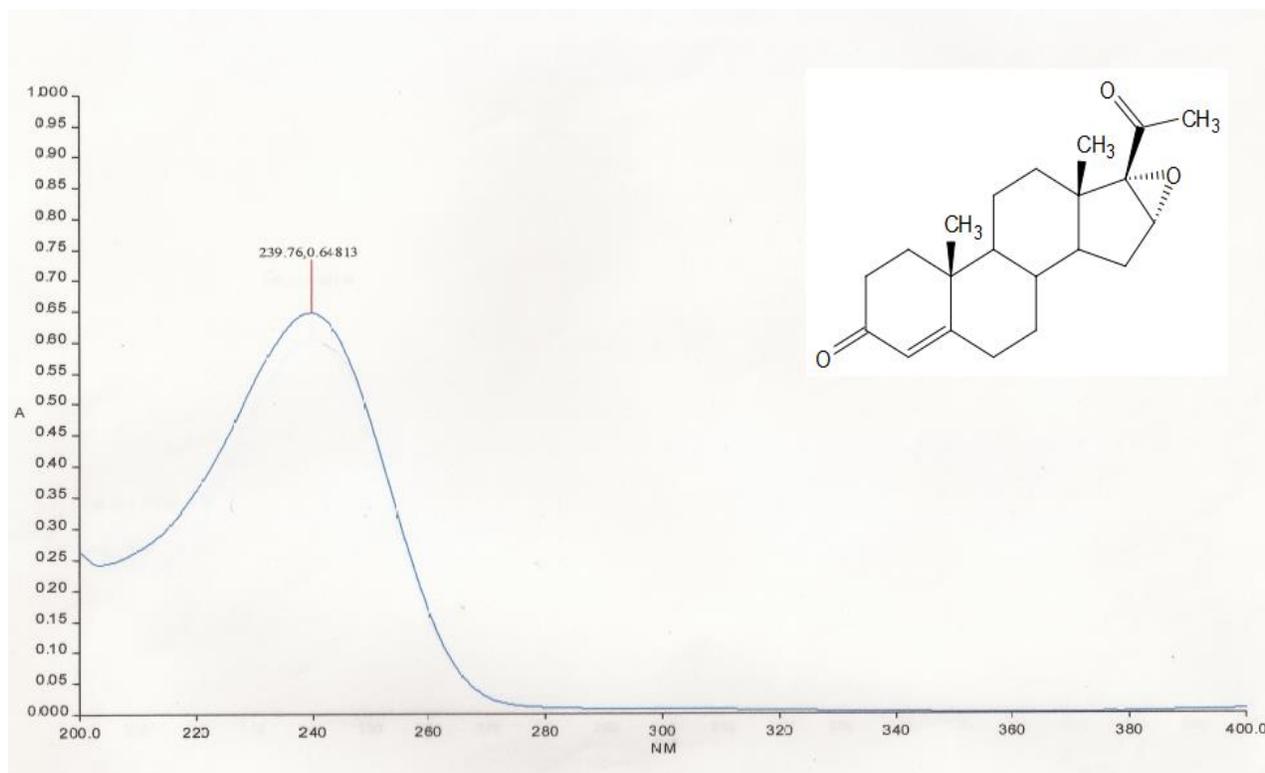
Espectro 3. RMN ^{13}C (CDCl_3) de $16\alpha,17\alpha$ -epoxi- 3β -hidroxipregn-5-en-20-ona (II).



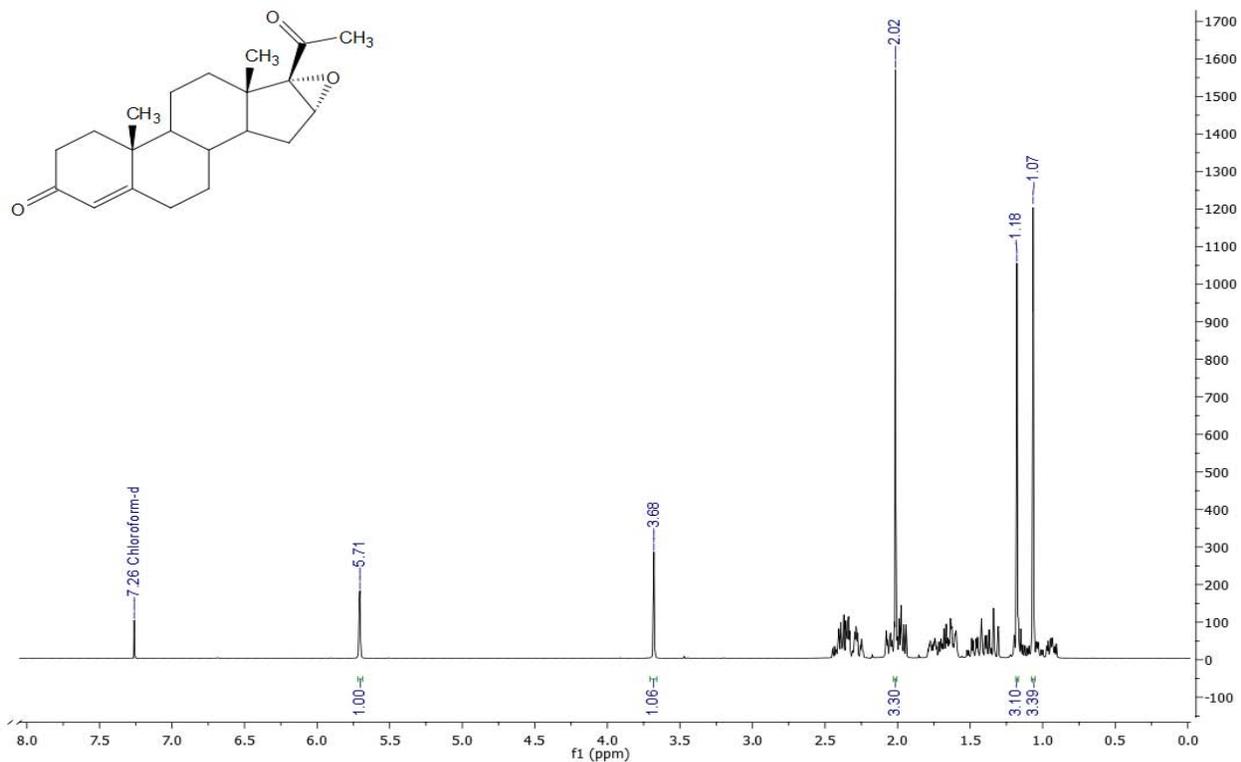
Espectro 4. EM (FAB, ID) de $16\alpha,17\alpha$ -epoxi- 3β -hidroxipregn-5-en-20-ona (II).



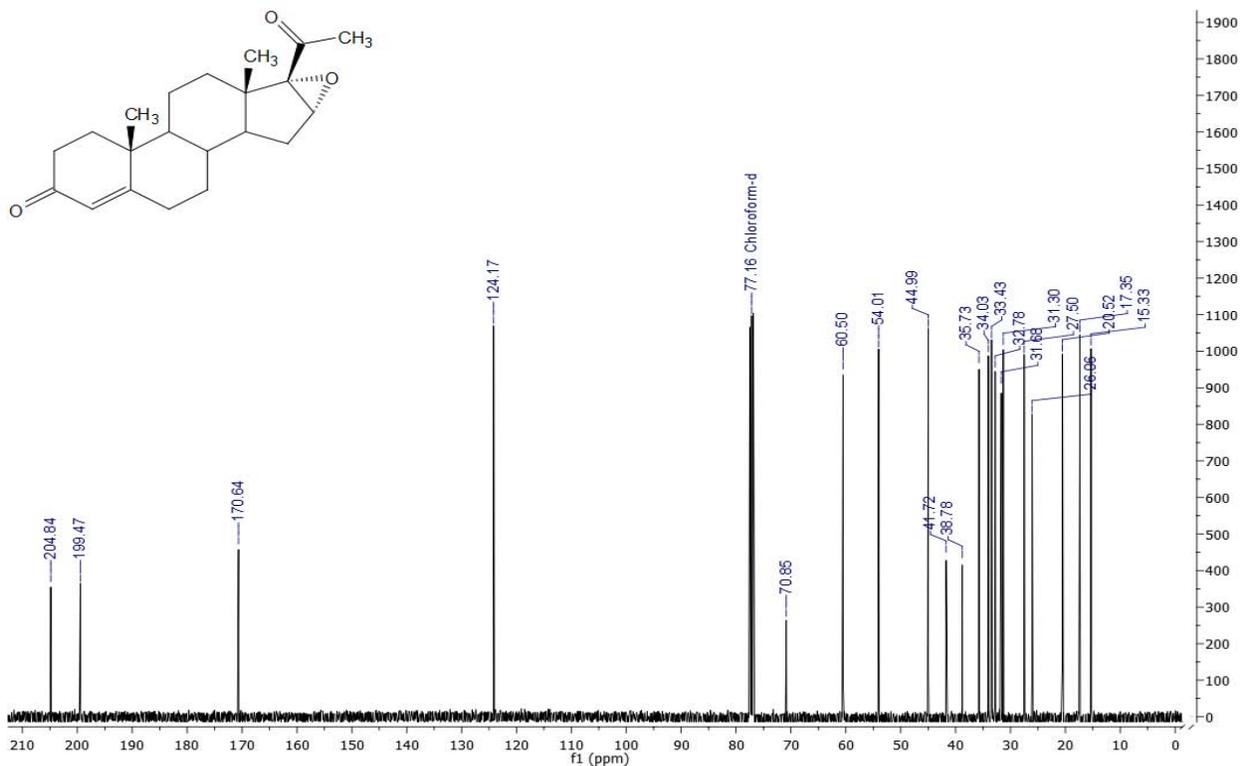
Espectro 5. IR (FTIR-ATR) de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).



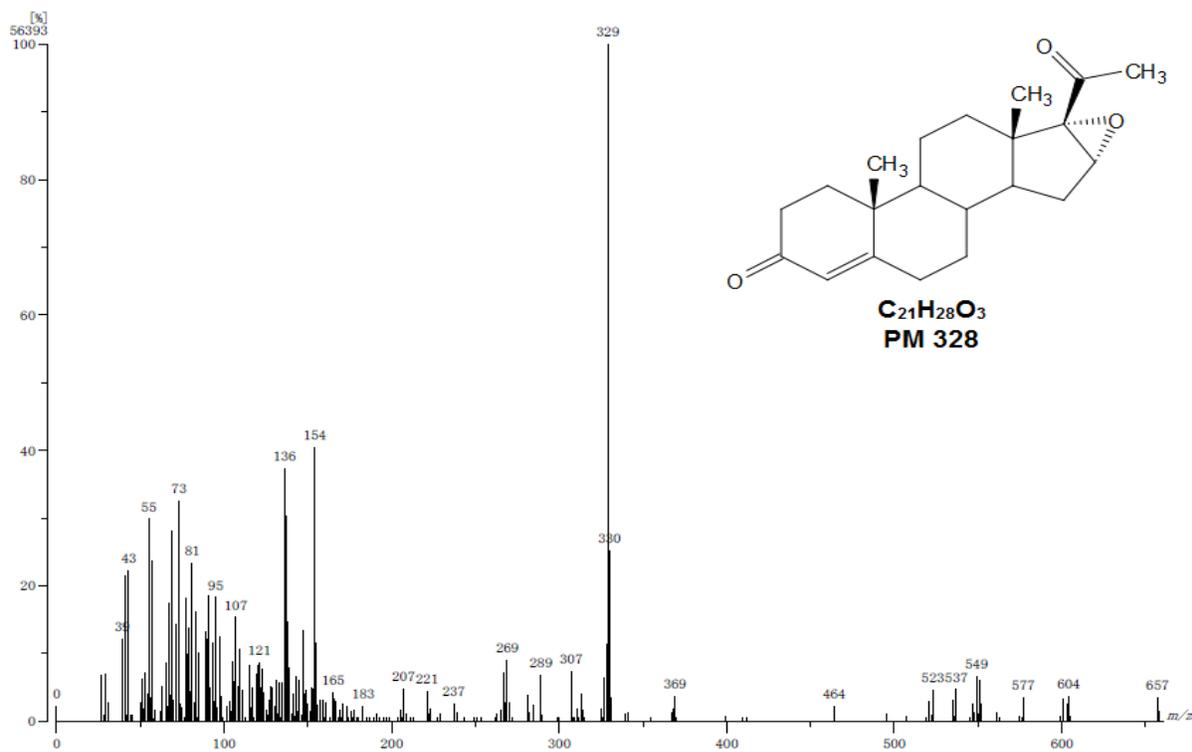
Espectro 6. UV (MeOH) de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).



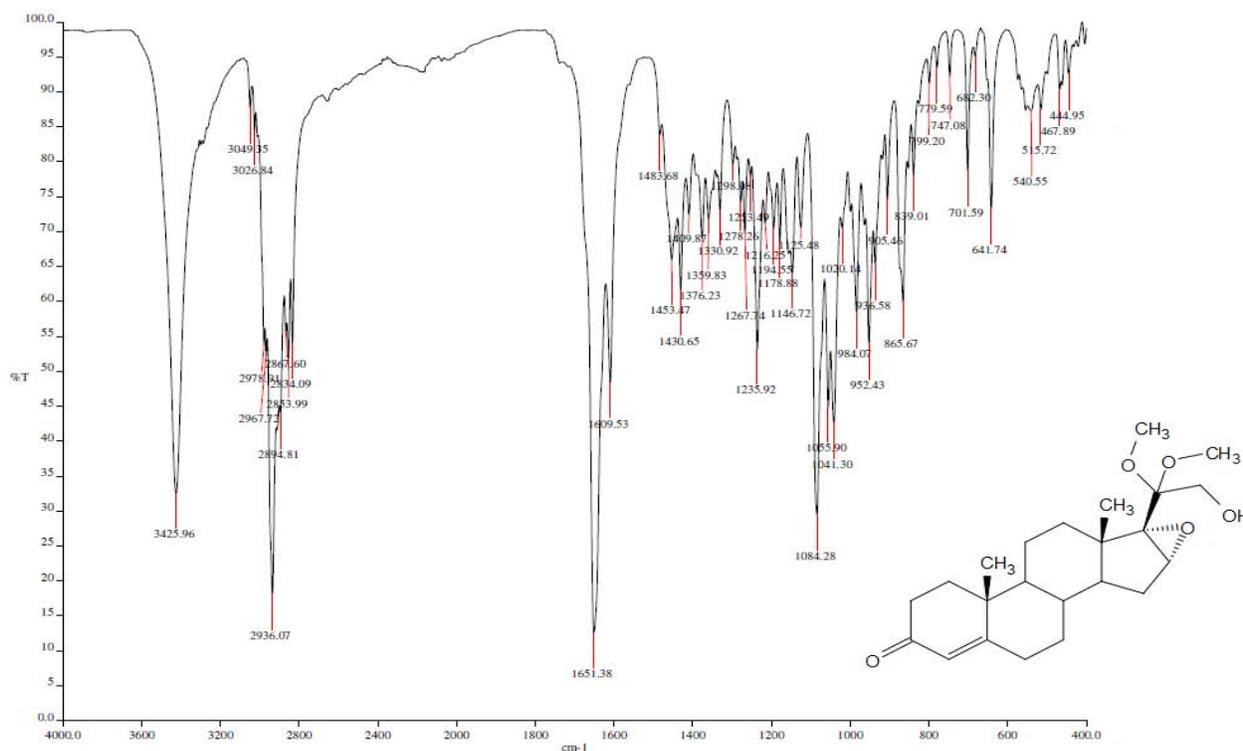
Espectro 7. RMN ^1H (CDCl₃) de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).



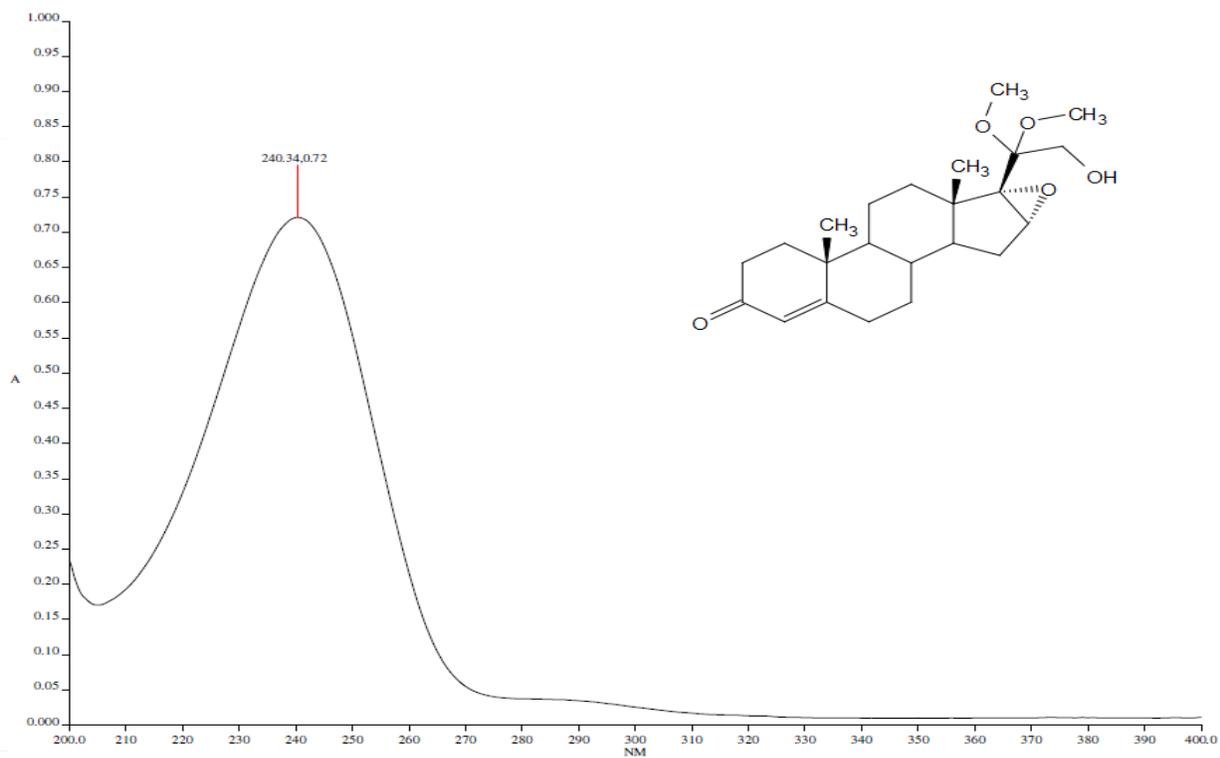
Espectro 8. RMN ^{13}C (CDCl₃) de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).



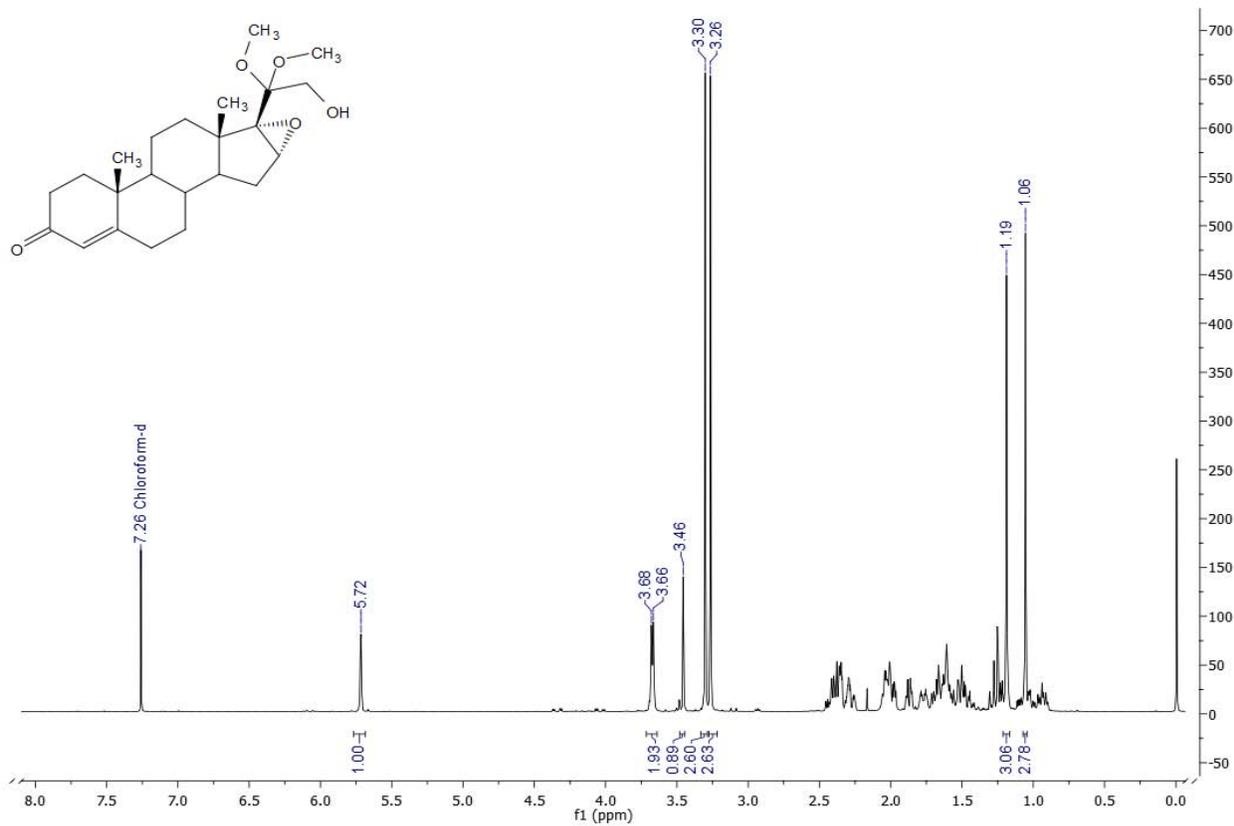
Espectro 9. EM (FAB, ID) de 16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (III).



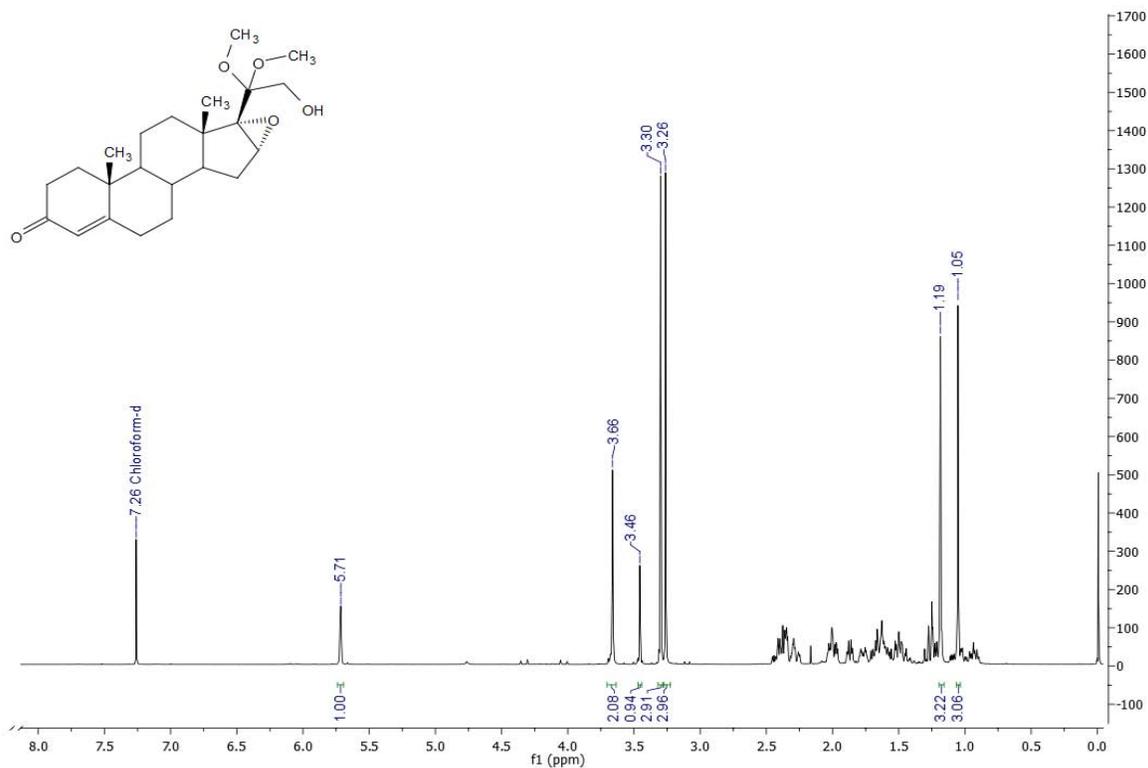
Espectro 10. IR (FTIR-ATR) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV).



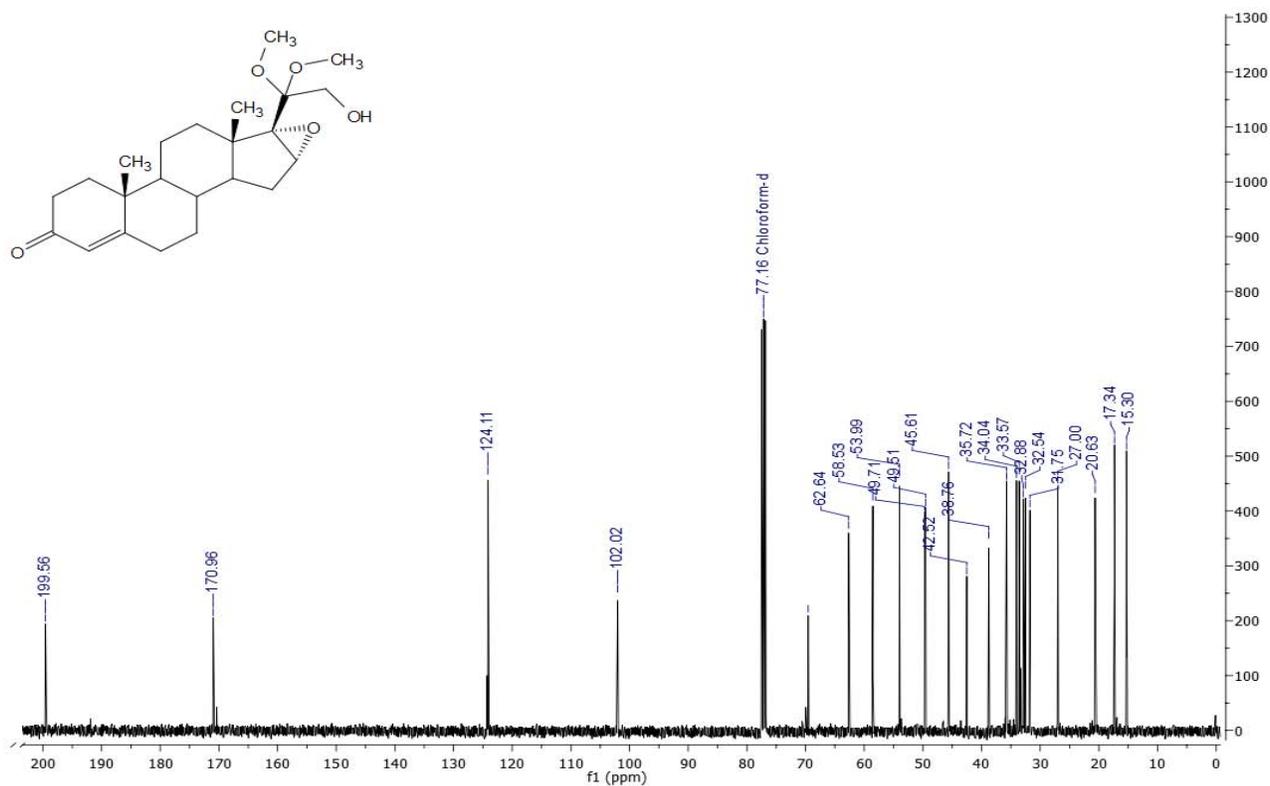
Espectro 11. UV (MeOH) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV).



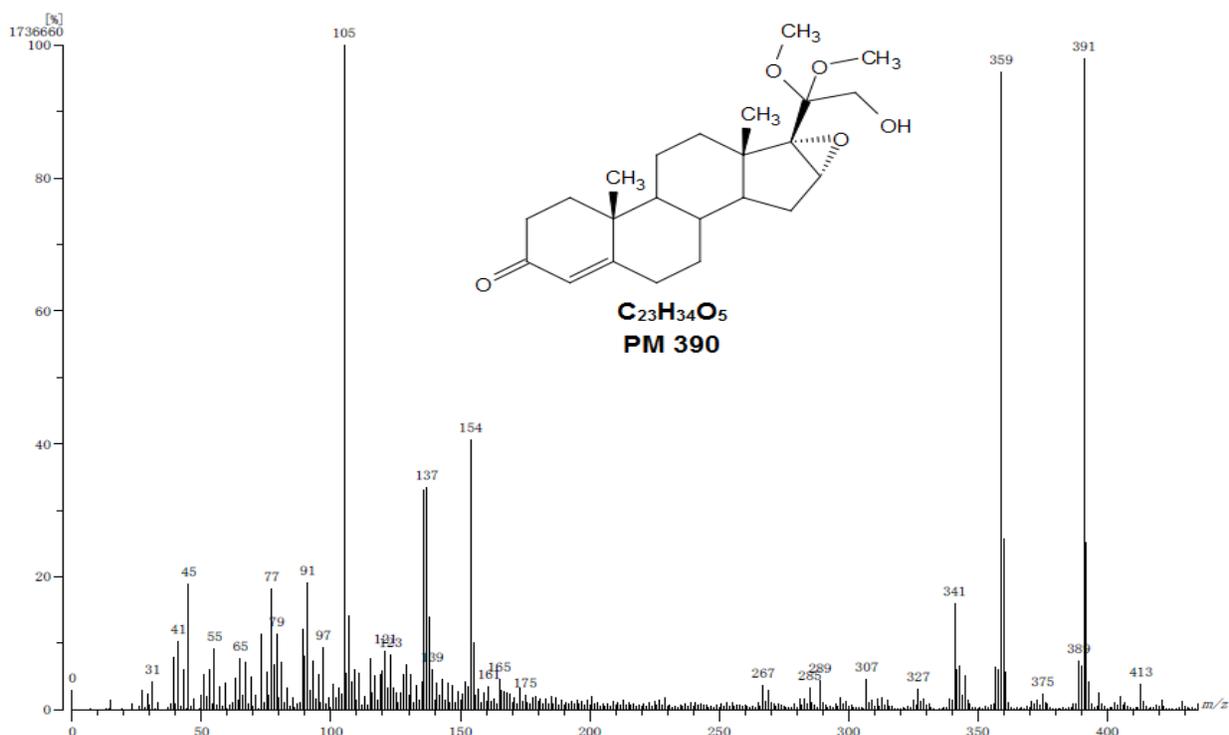
Espectro 12. RMN ^1H (CDCl_3) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV).



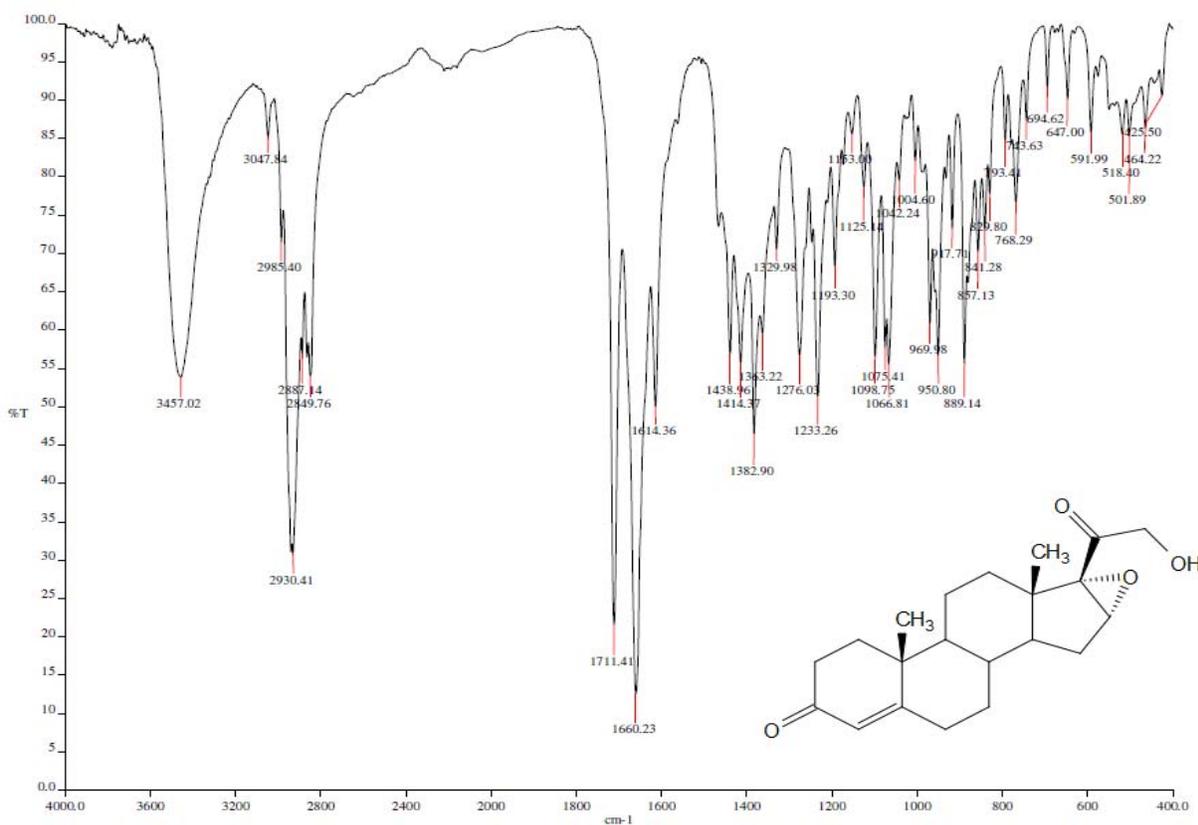
Espectro 13. RMN ^1H (CDCl_3) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV) con intercambio D_2O .



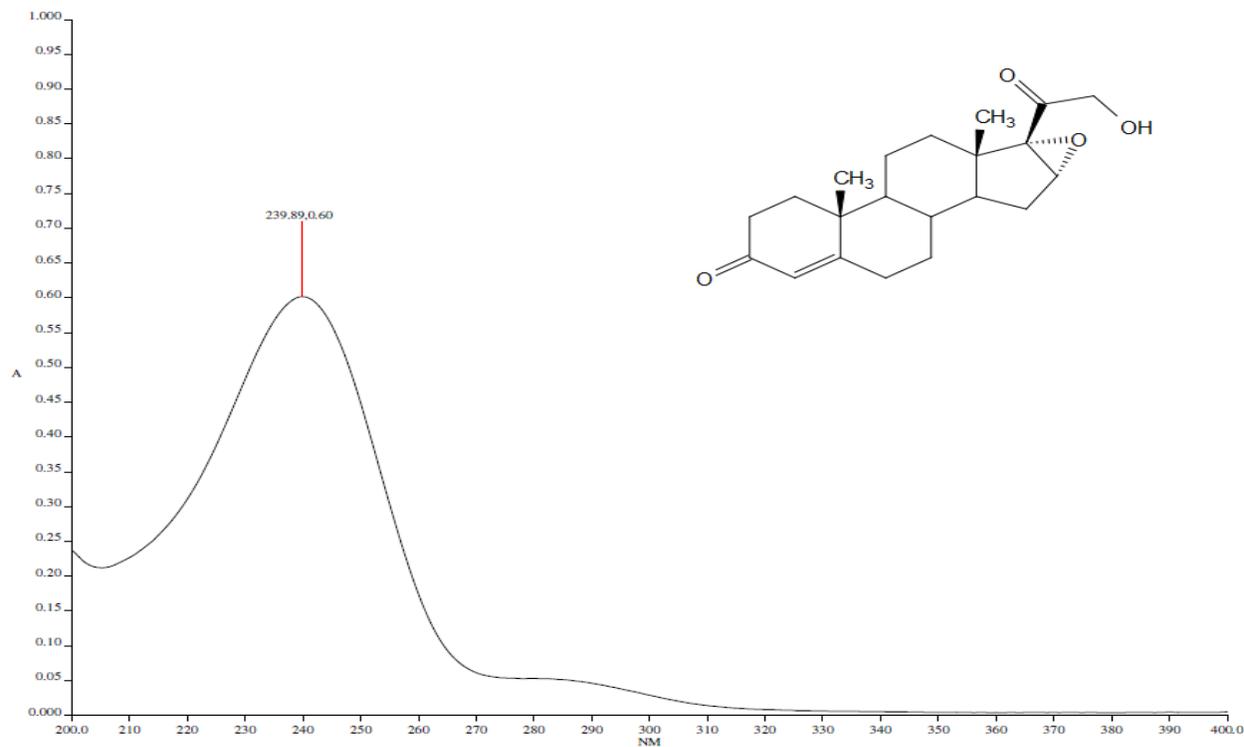
Espectro 14. RMN ^{13}C (CDCl_3) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (4).



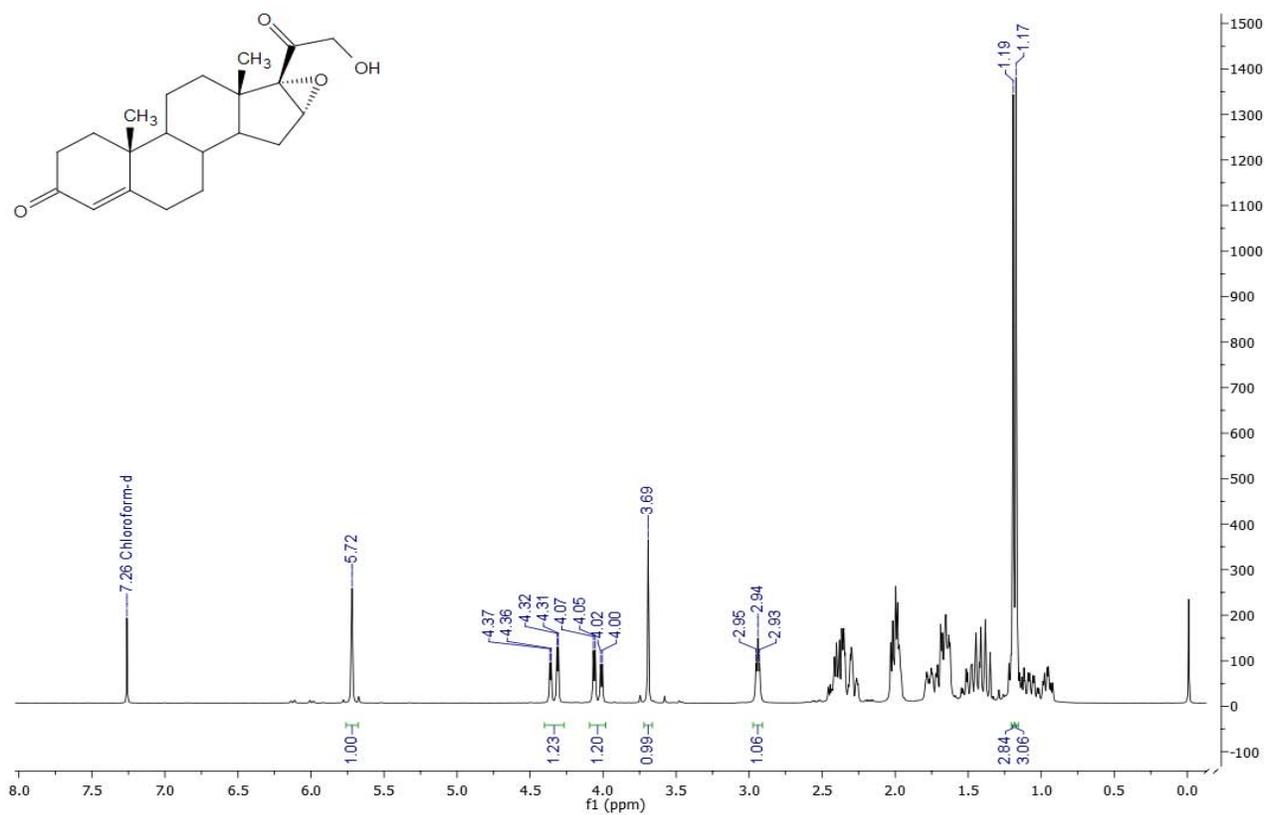
Espectro 15. EM (FAB, ID) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV).



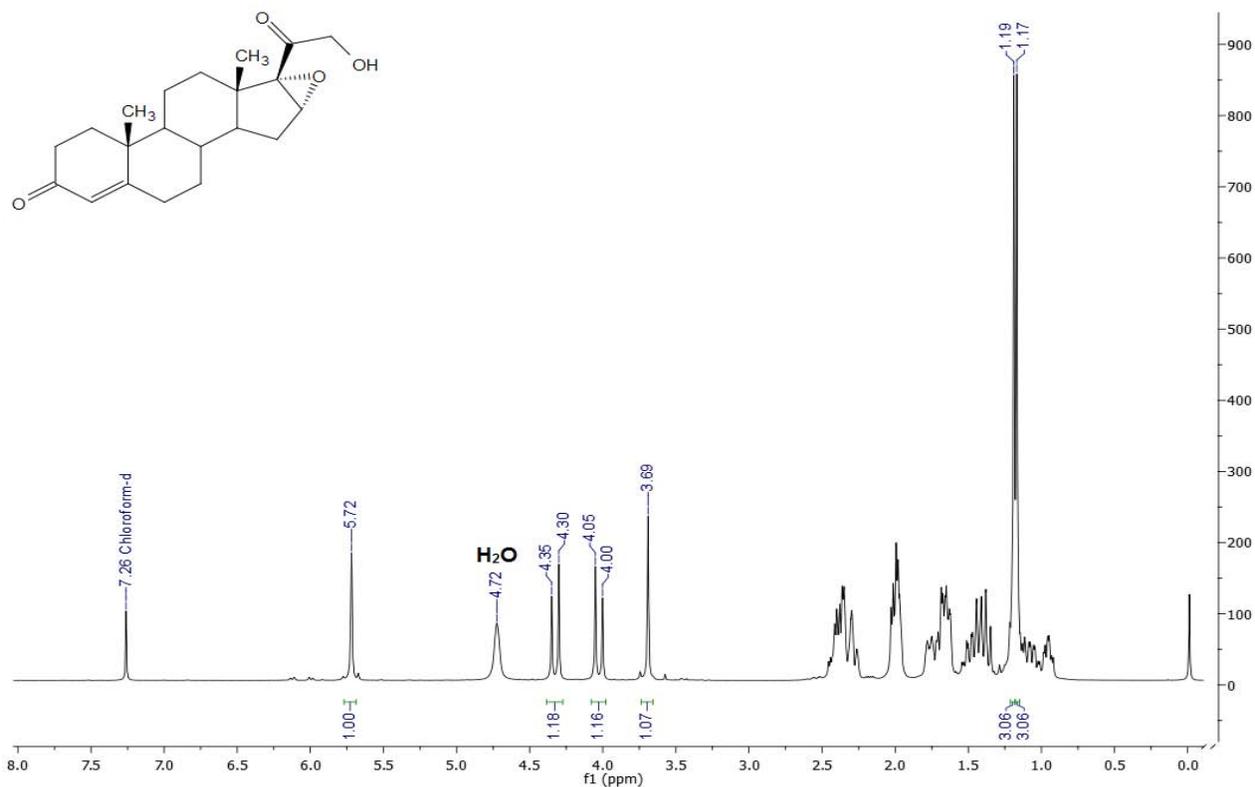
Espectro 16. IR (FTIR-ATR) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20,20-dimetoxipregn-4-en-3-ona (IV).



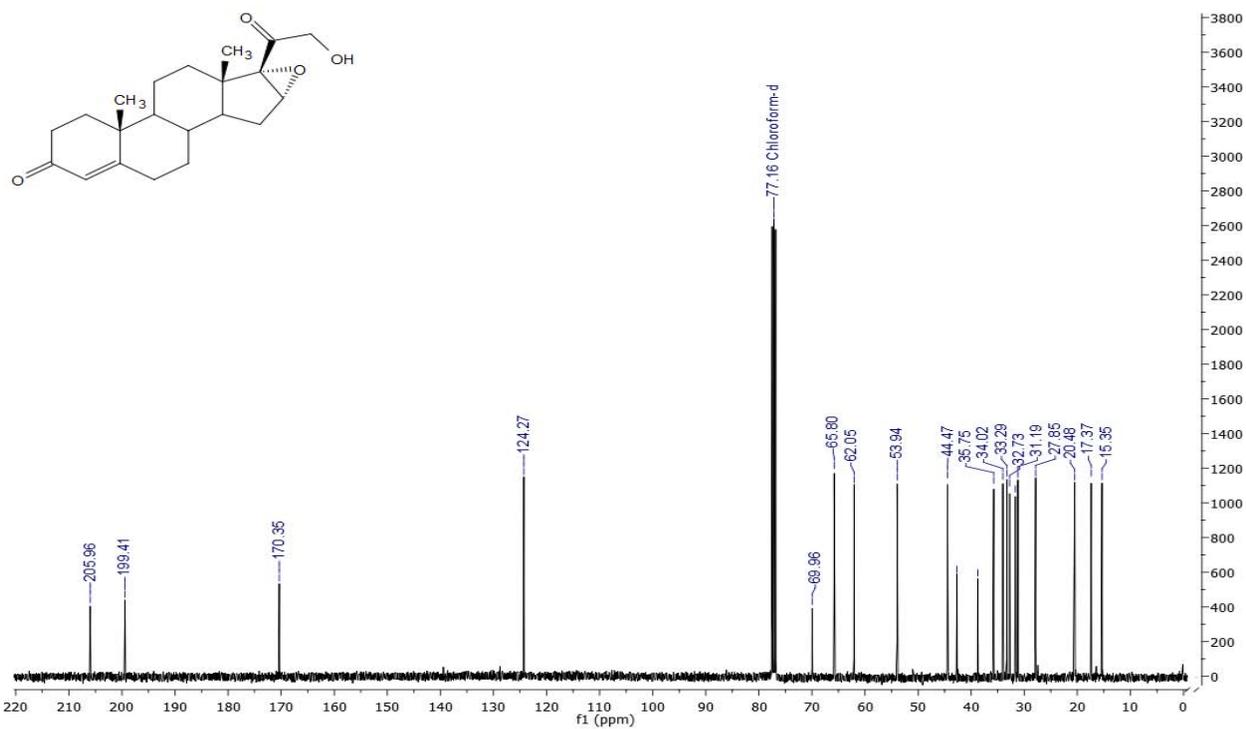
Espectro 17. UV (CHCl₃) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V).



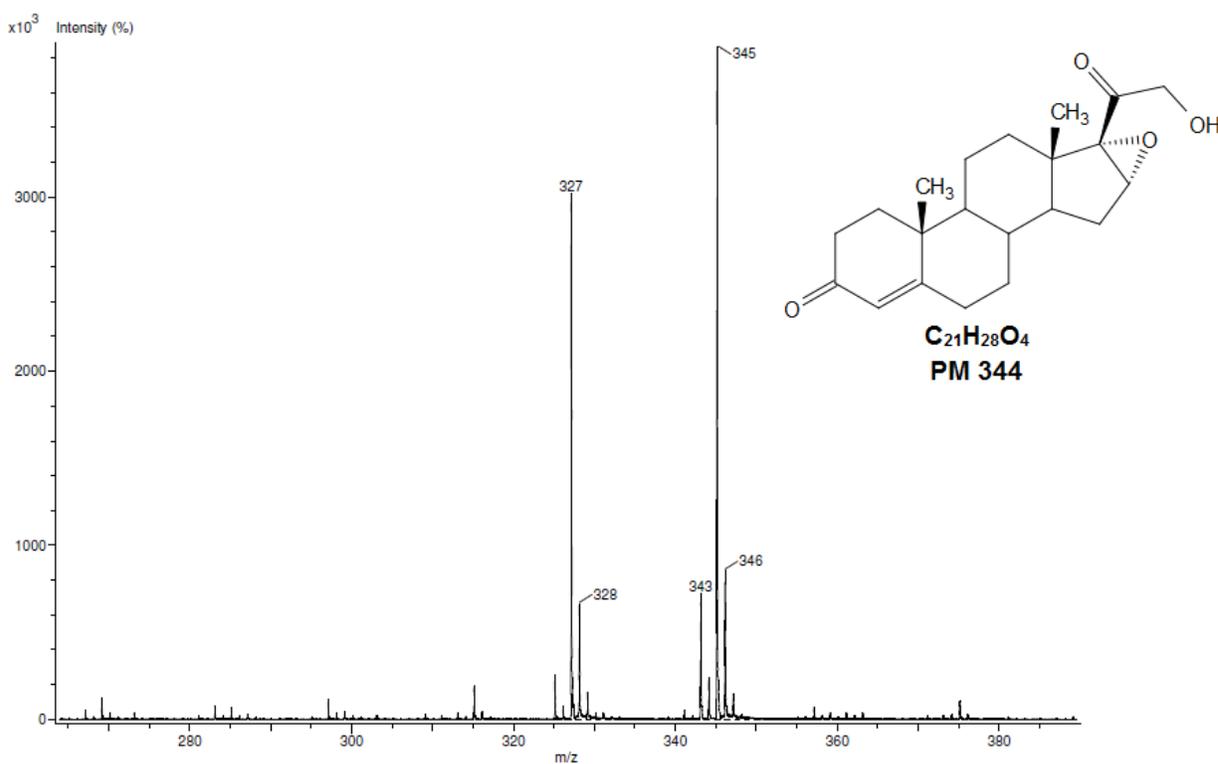
Espectro 18. RMN ¹H (CDCl₃) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V).



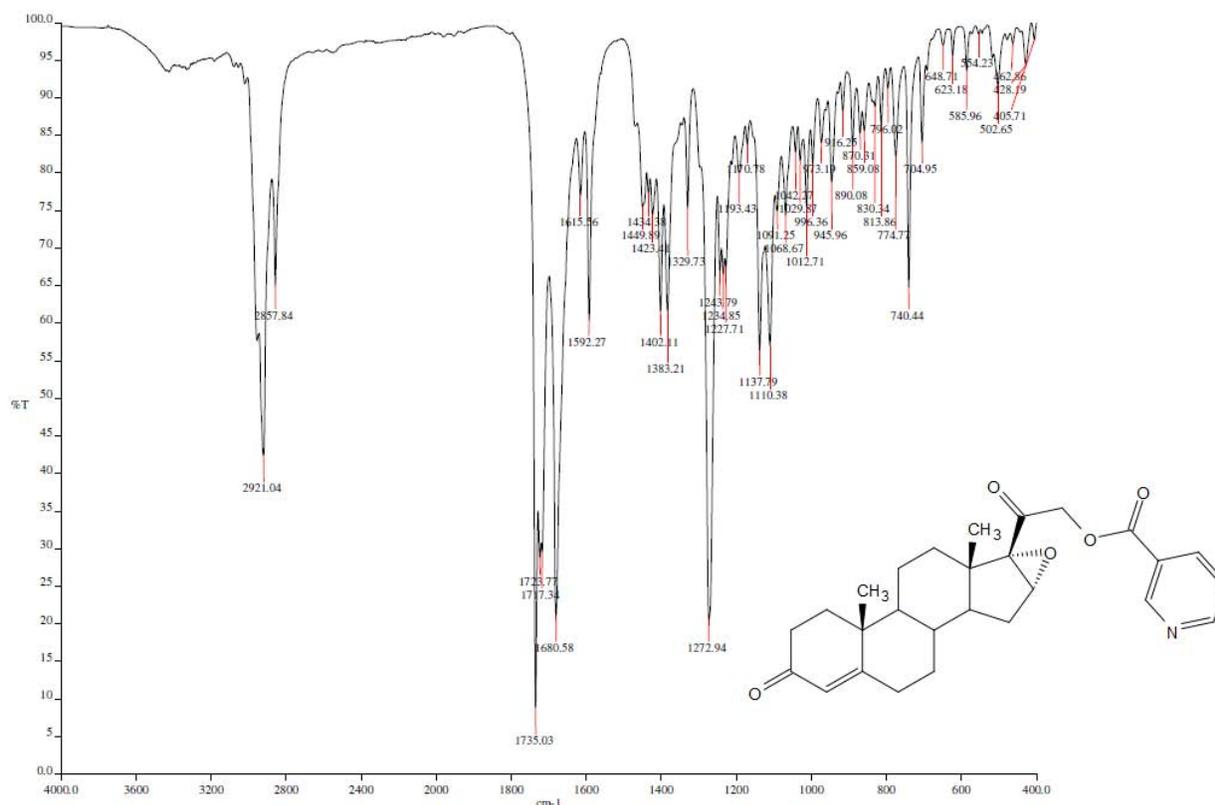
Espectro 19. RMN ^1H (CDCl₃) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V) con intercambio D₂O.

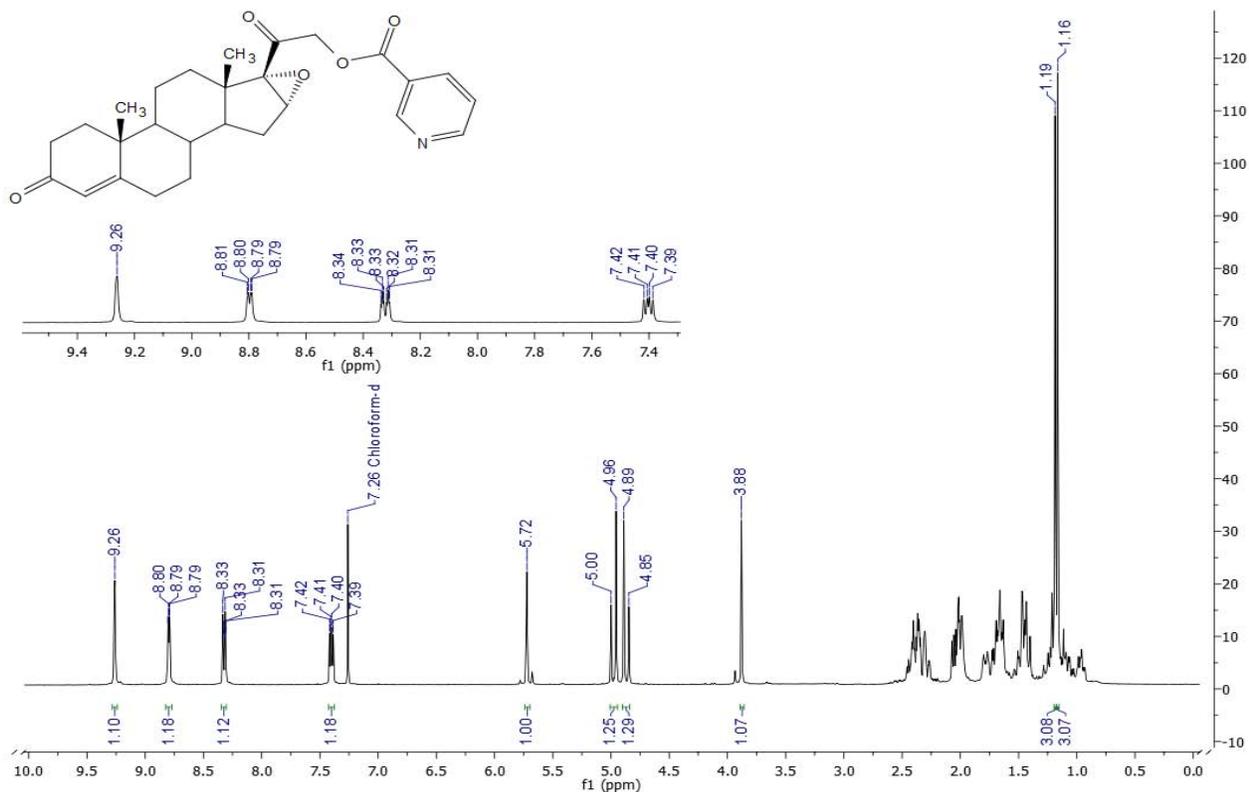


Espectro 20. RMN ^{13}C (CDCl₃) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V).

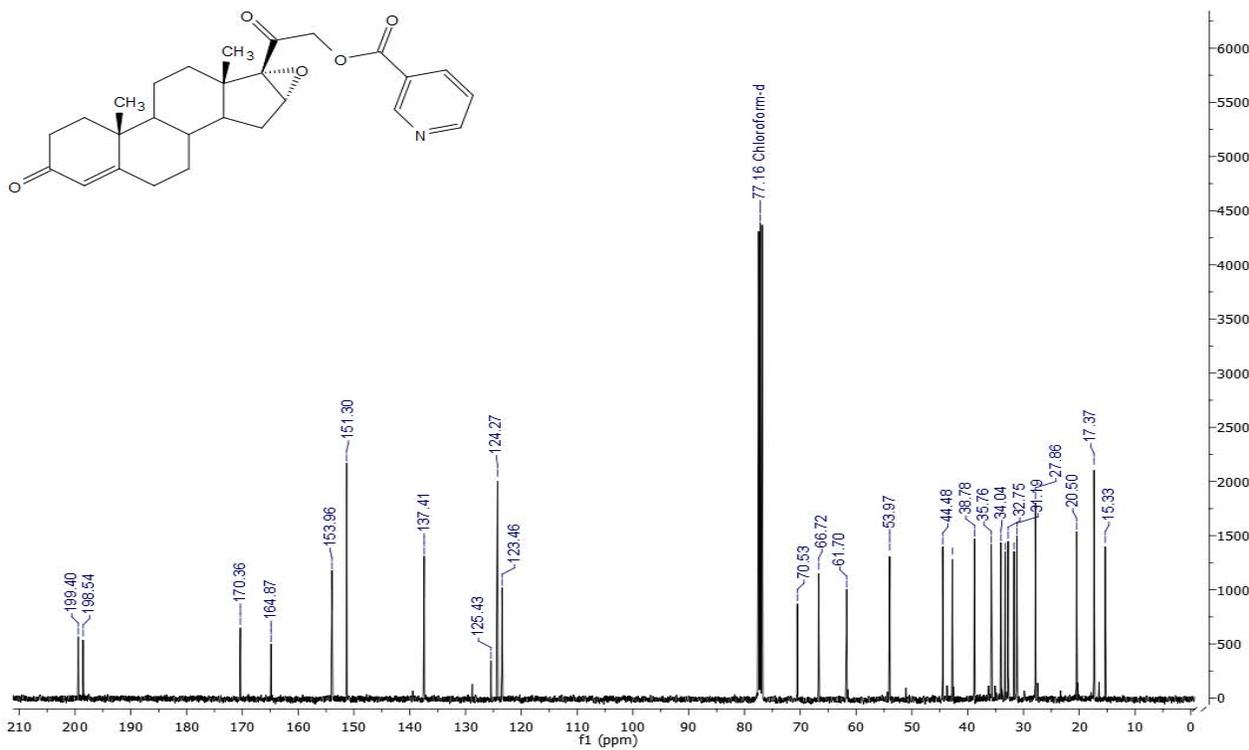


Espectro 21. EM (DART) de 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona (V).

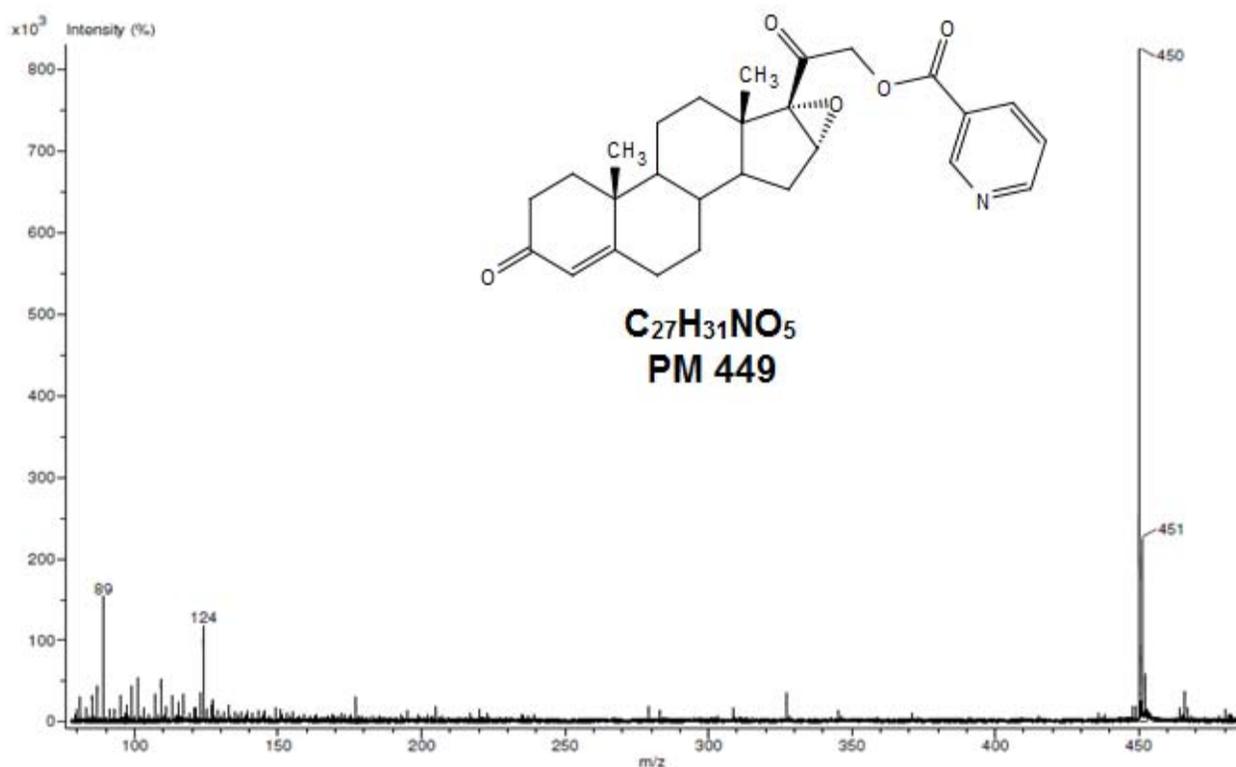




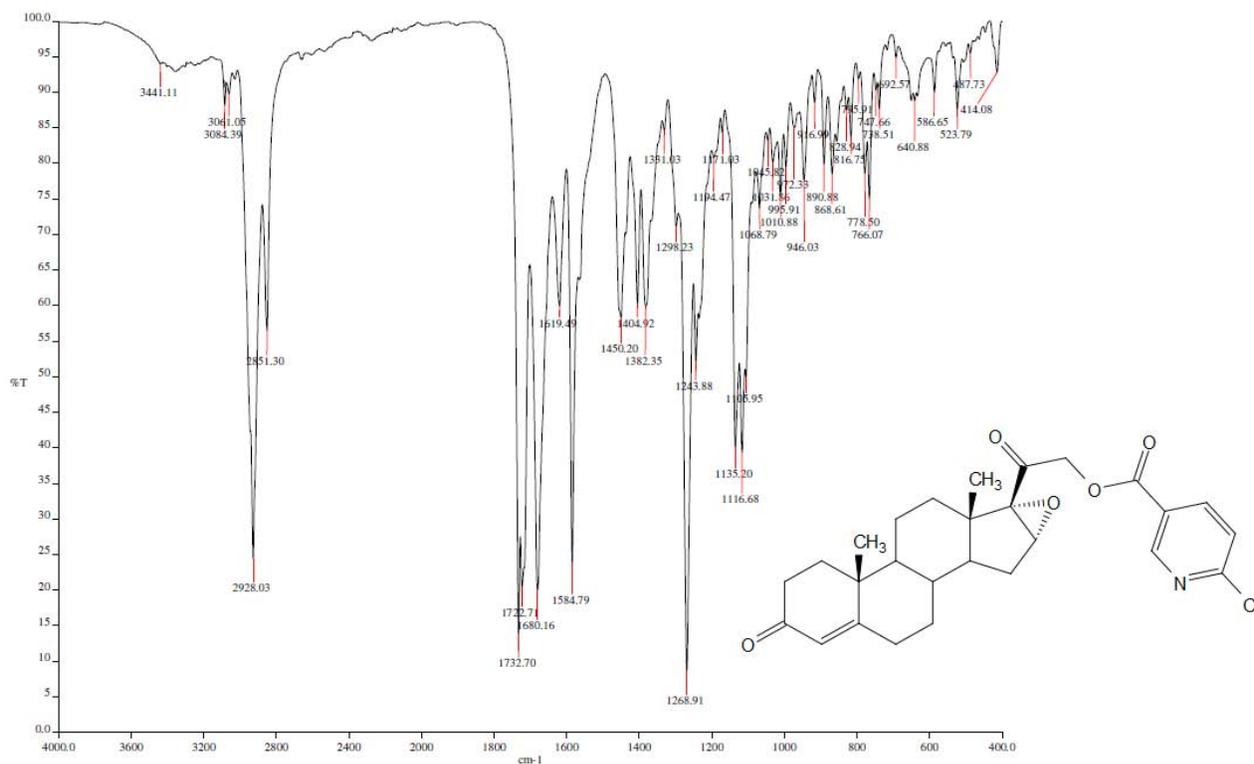
Espectro 23. RMN ¹H (CDCl₃) de 21-(pirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIa).



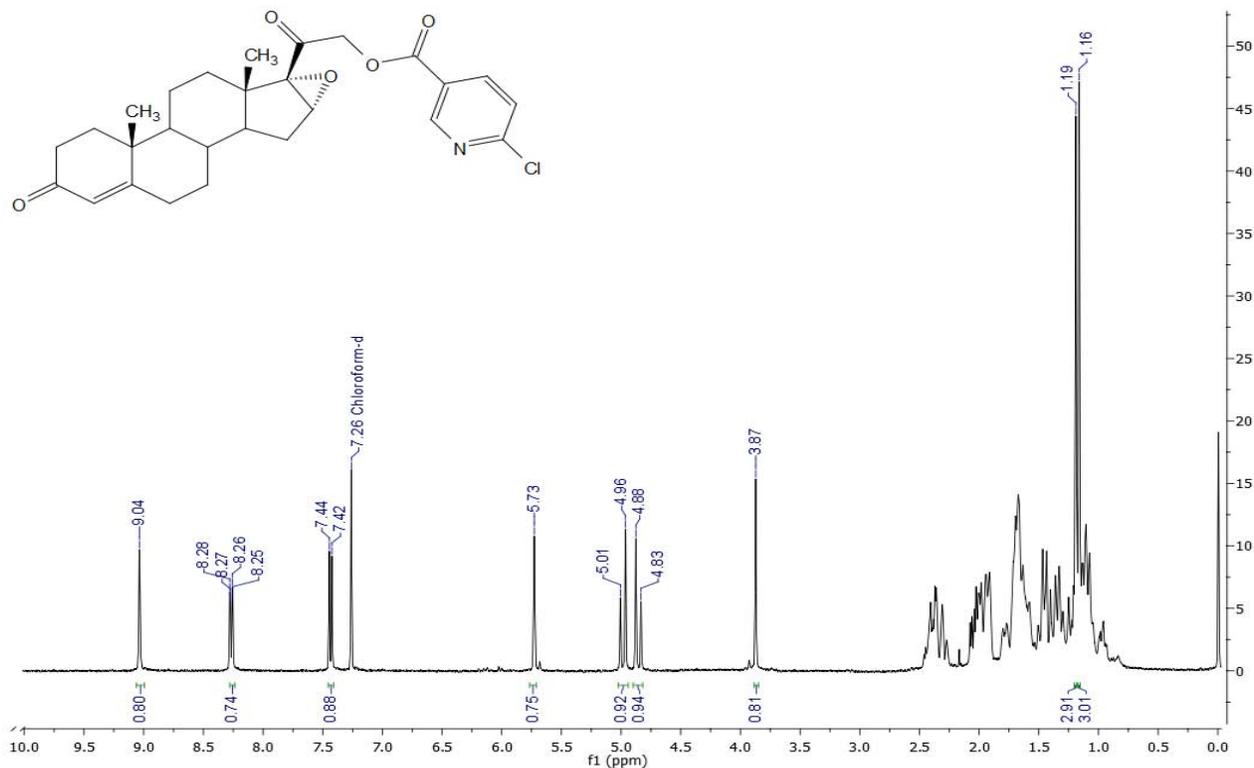
Espectro 24. RMN ¹³C (CDCl₃) de 21-(pirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIa).



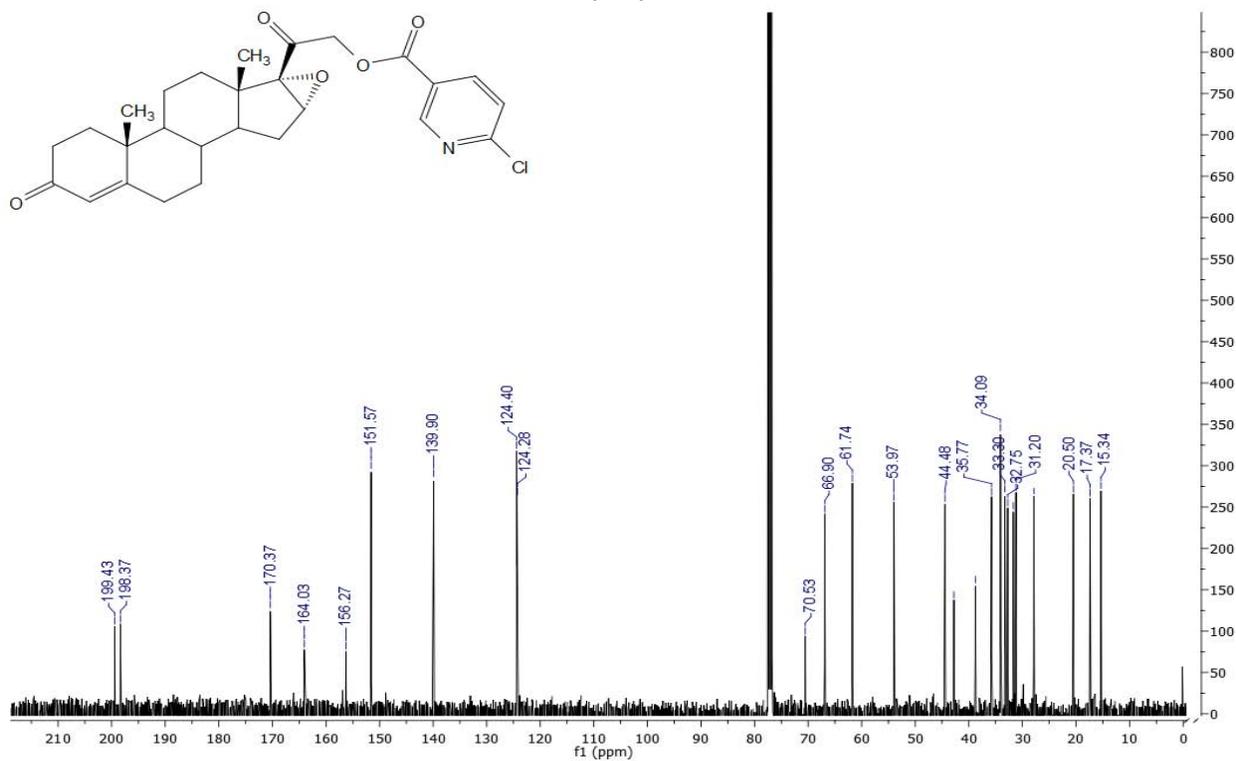
Espectro 25. EM (DART) de 21-(pirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIa).



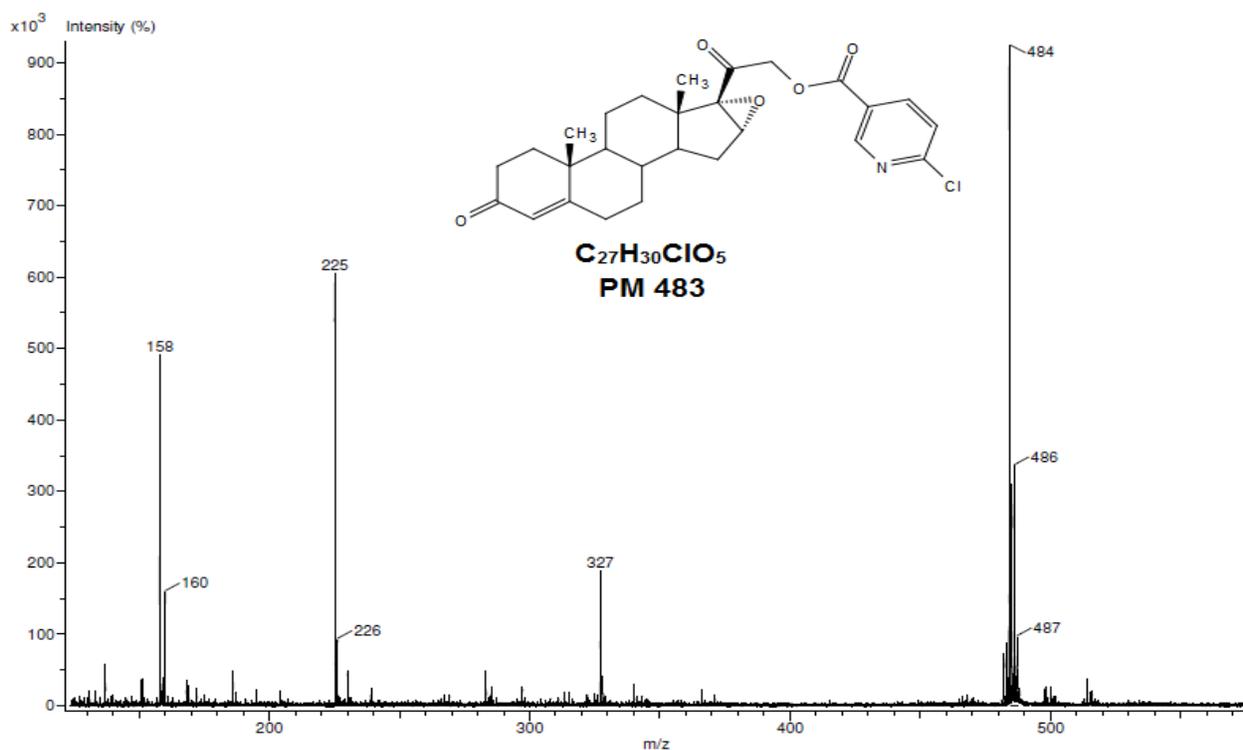
Espectro 26. IR (FTIR-ATR) de 21-(6-cloropirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIb).



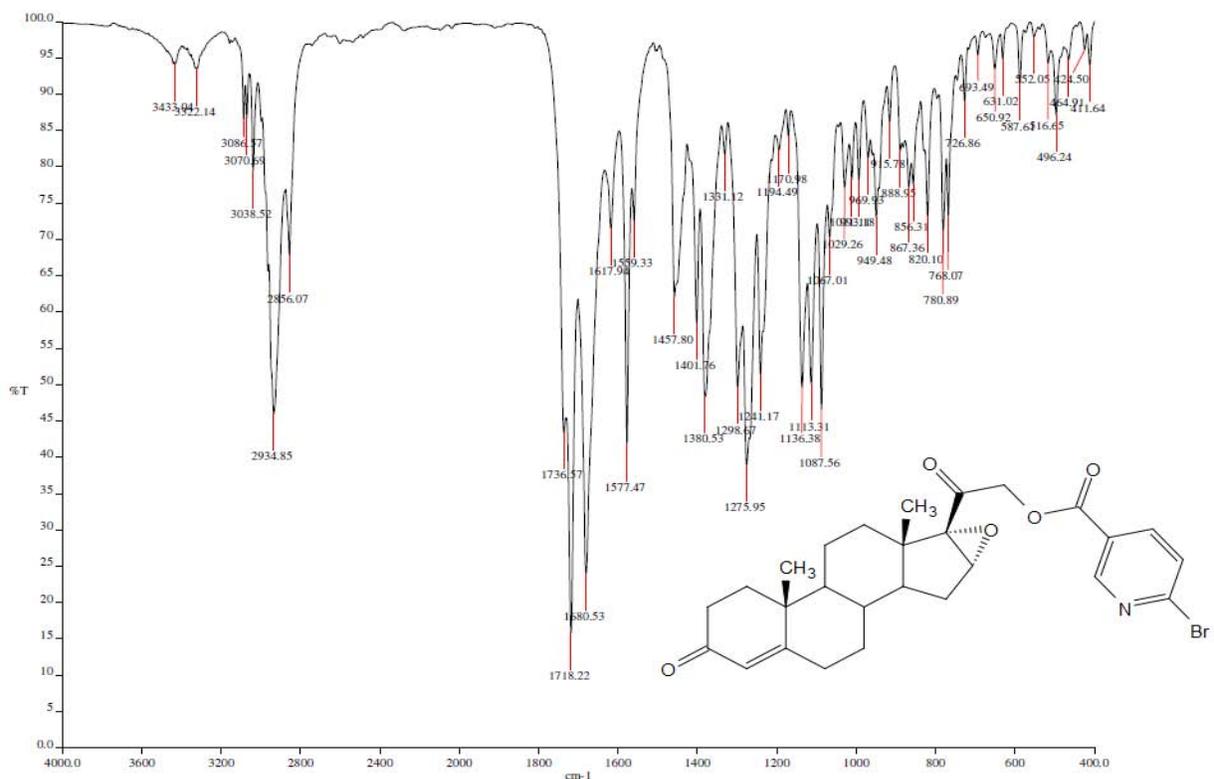
Espectro 27. RMN ^1H (CDCl_3) de 21-(6-cloropirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIb).



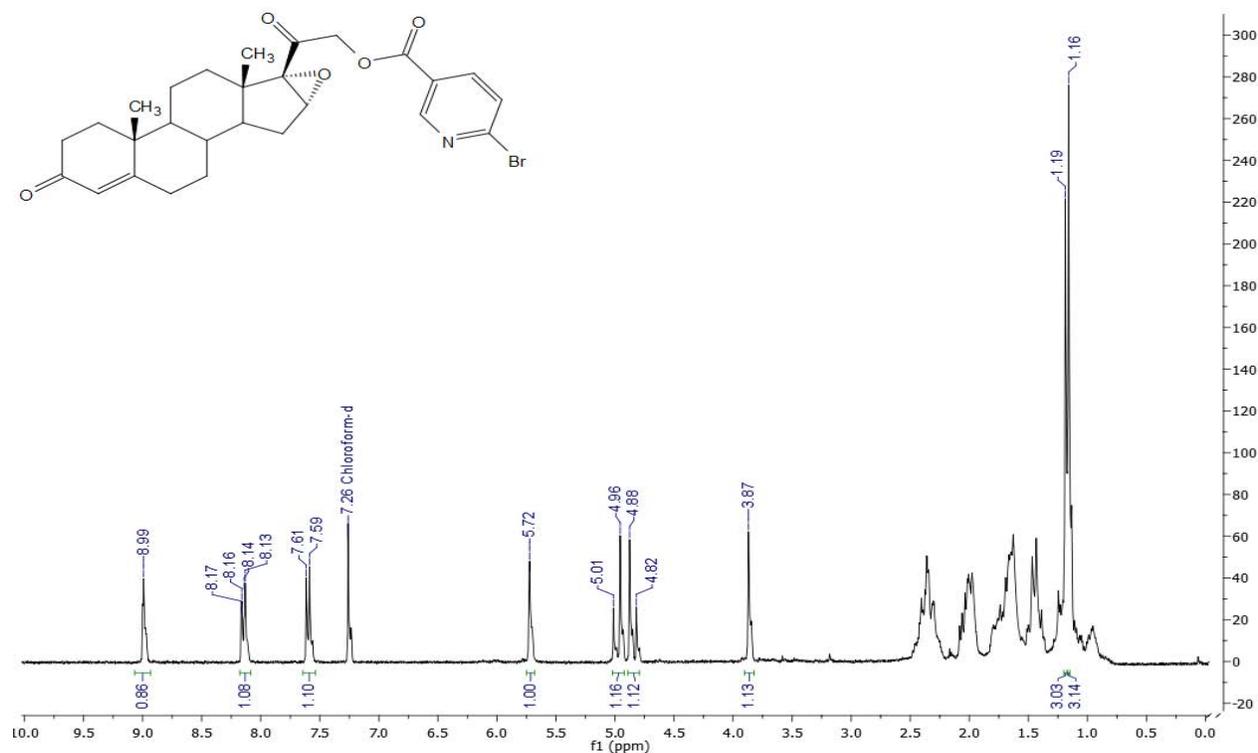
Espectro 28. RMN ^{13}C (CDCl_3) de 21-(6-cloropirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIb).



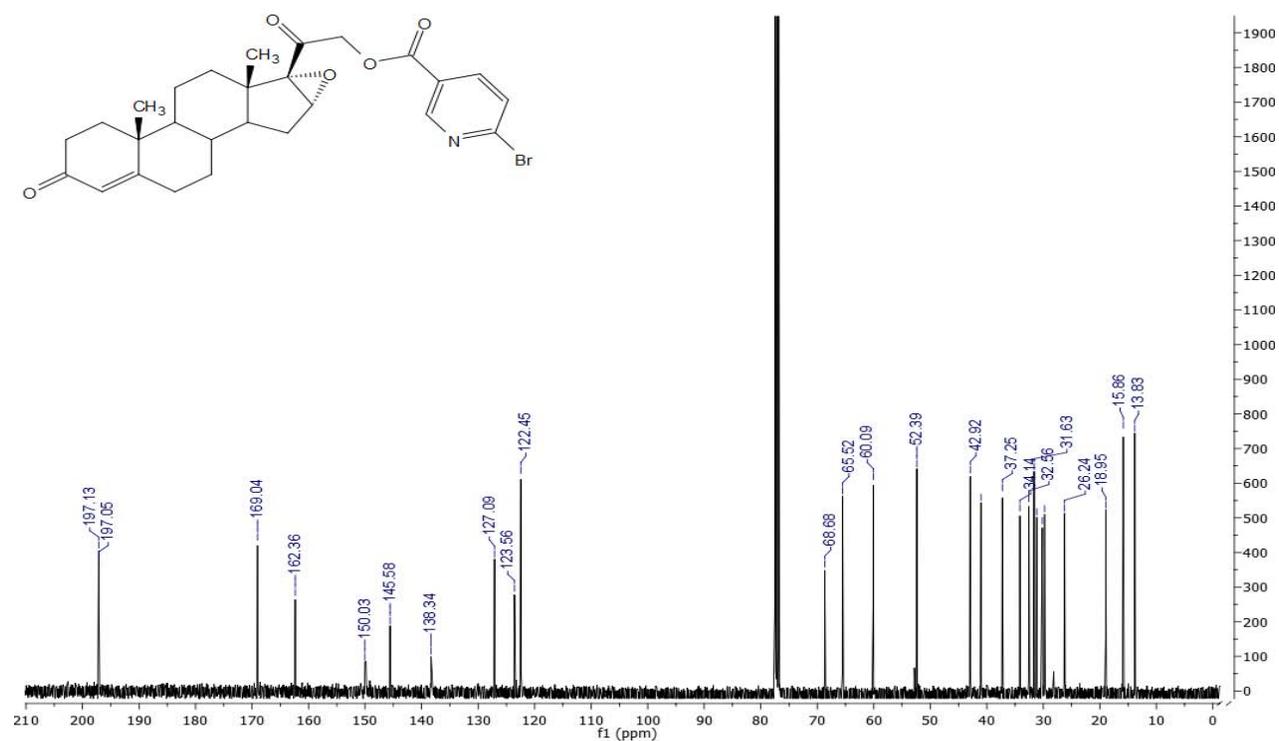
Espectro 29. EM (DART) de 21-(6-cloropirid-3-il)carboniloxi-16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIb).



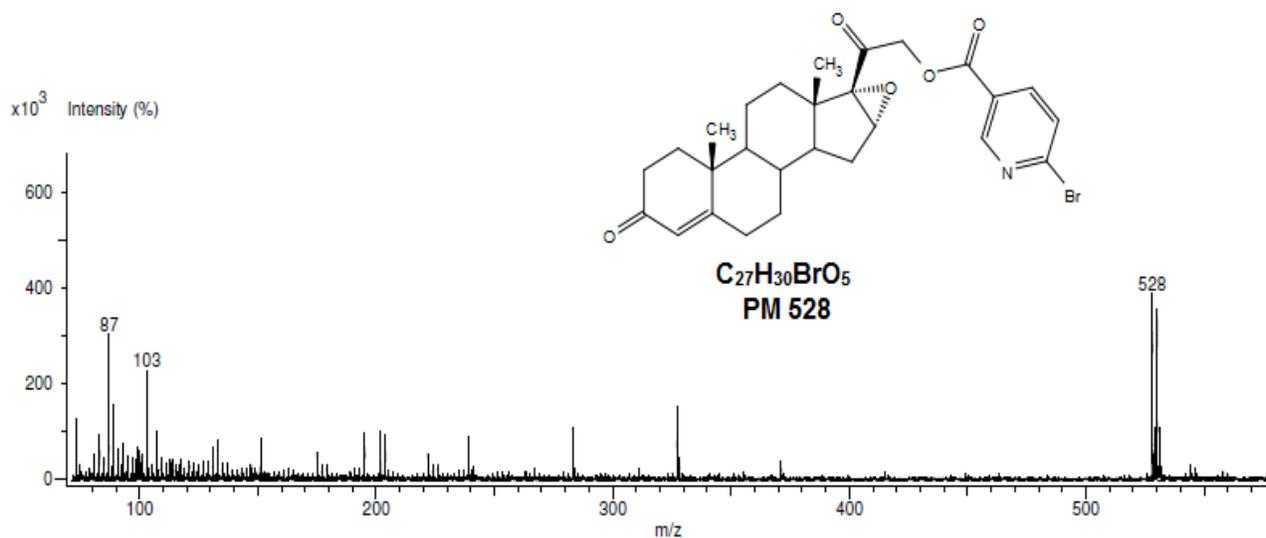
Espectro 30. IR (FTIR-ATR) de 21-(6-bromopirid-3-il)carboniloxi-16α,17α-epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIc).



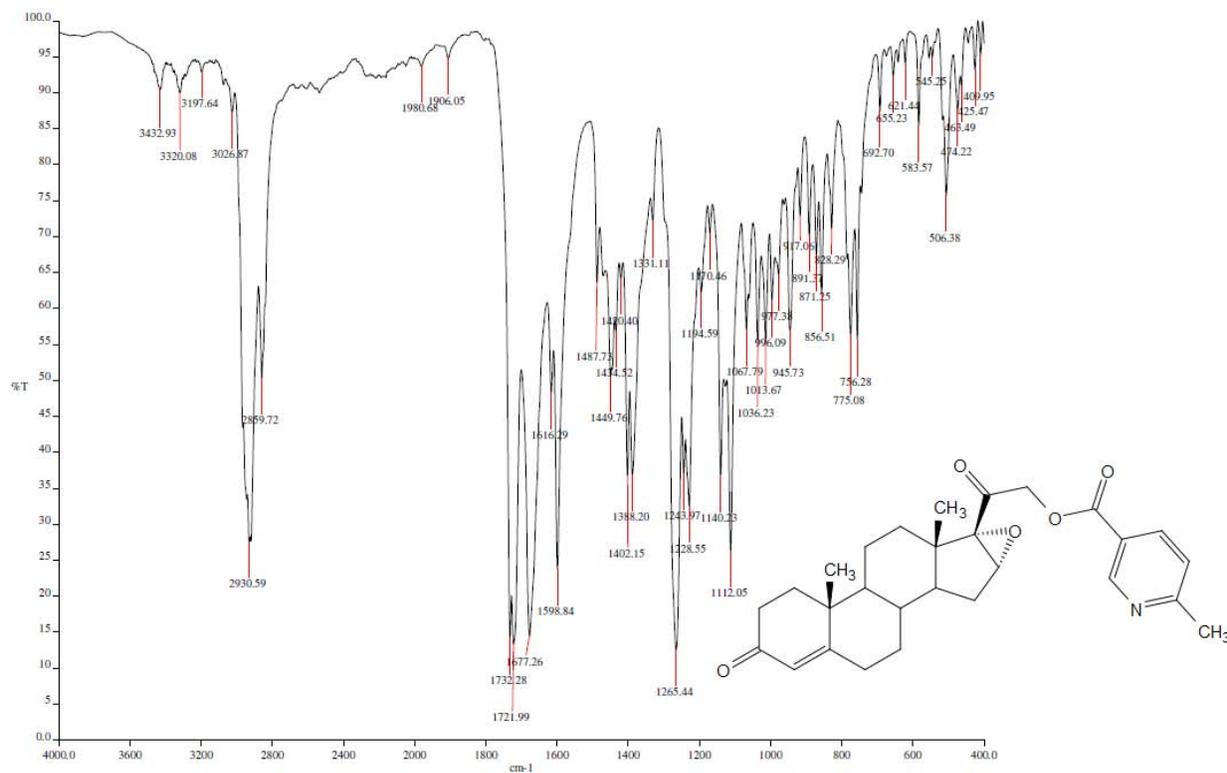
Espectro 31. RMN ^1H (CDCl₃) de 21-(6-bromopirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (16c).



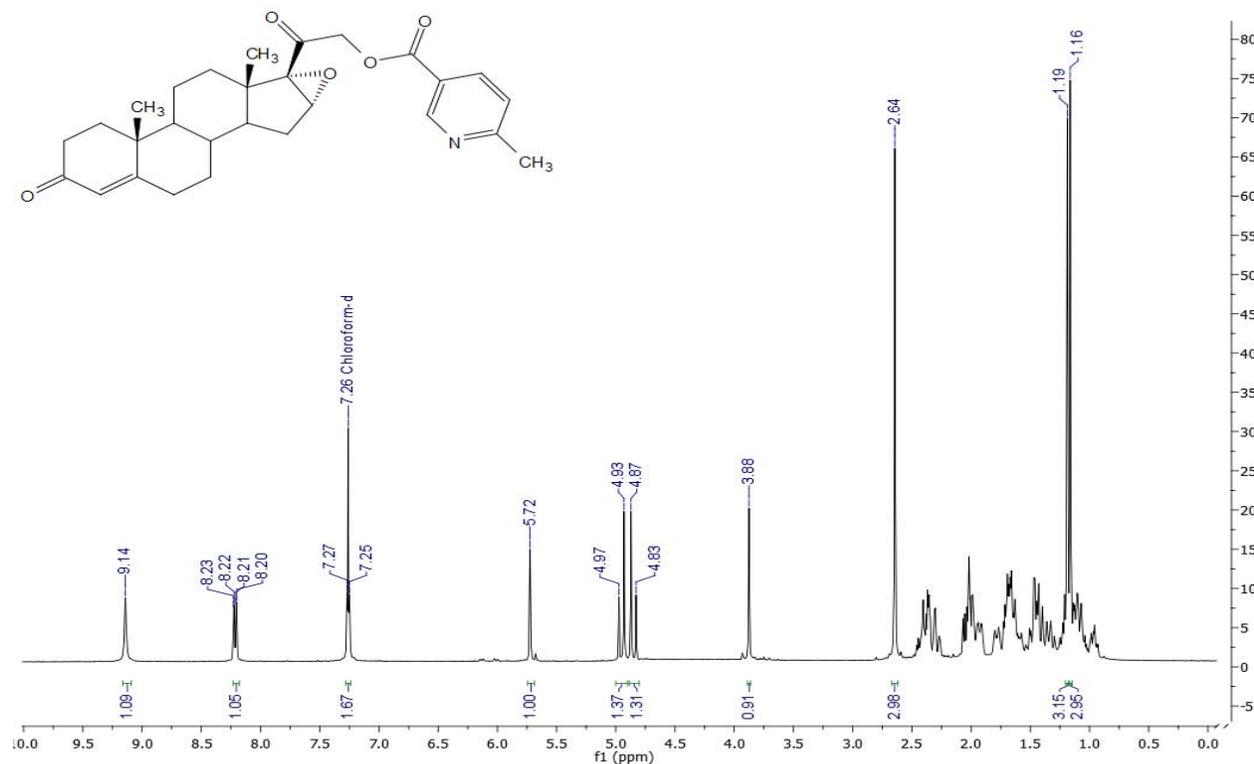
Espectro 32. RMN ^{13}C (CDCl₃) de 21-(6-bromopirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (16c).



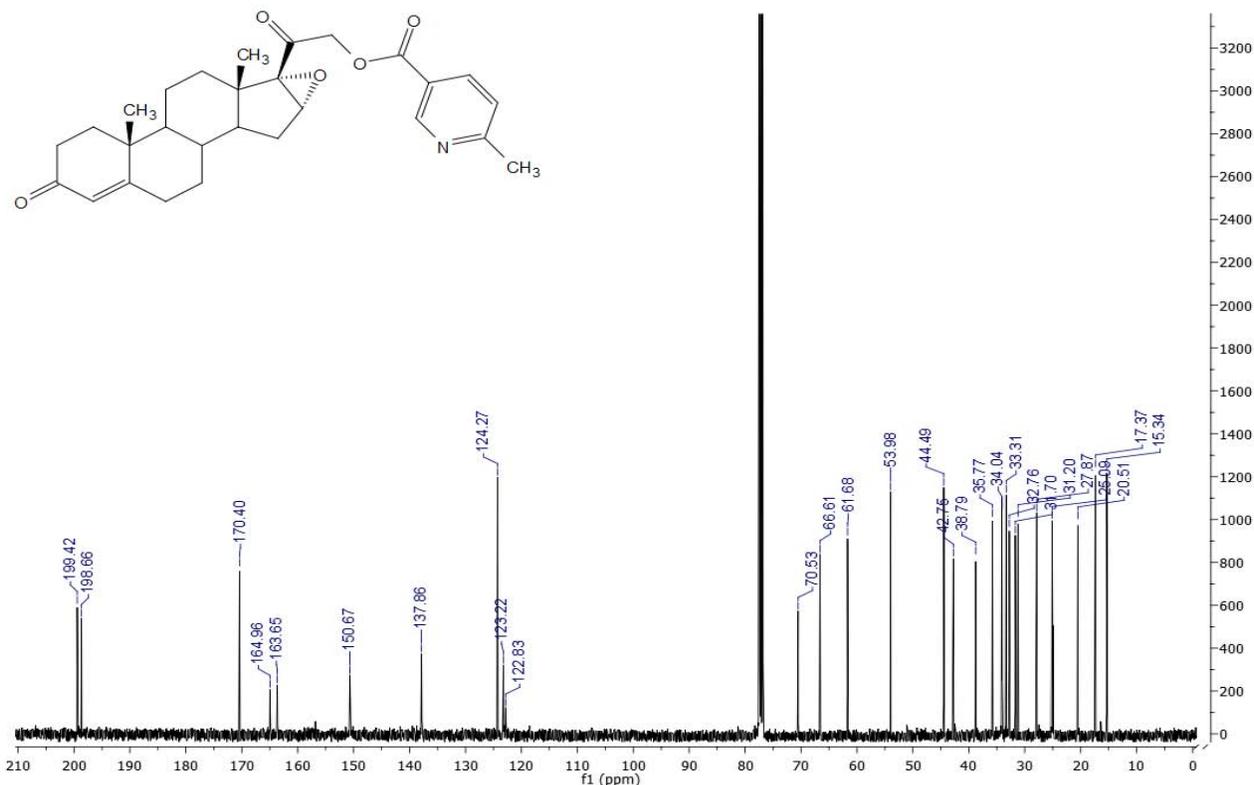
Espectro 33. EM (DART) de 21-(6-bromopirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIc).



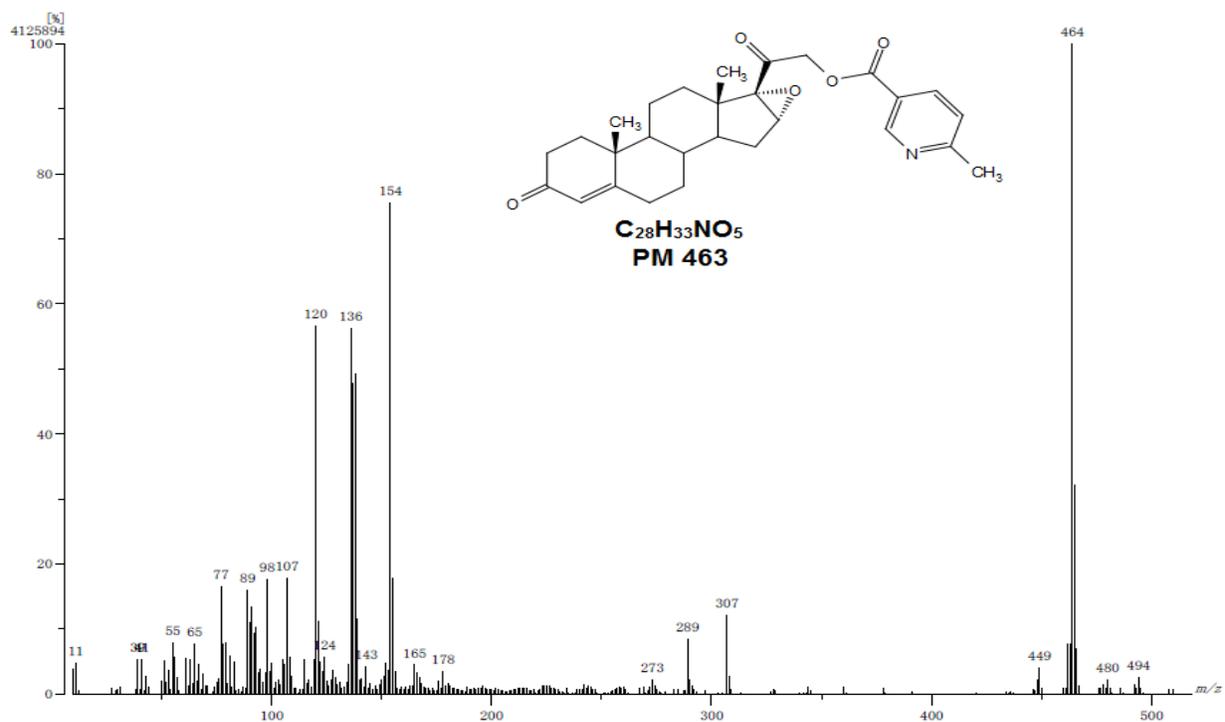
Espectro 34. IR (FTIR-ATR) de 21-(6-metilpirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIId).



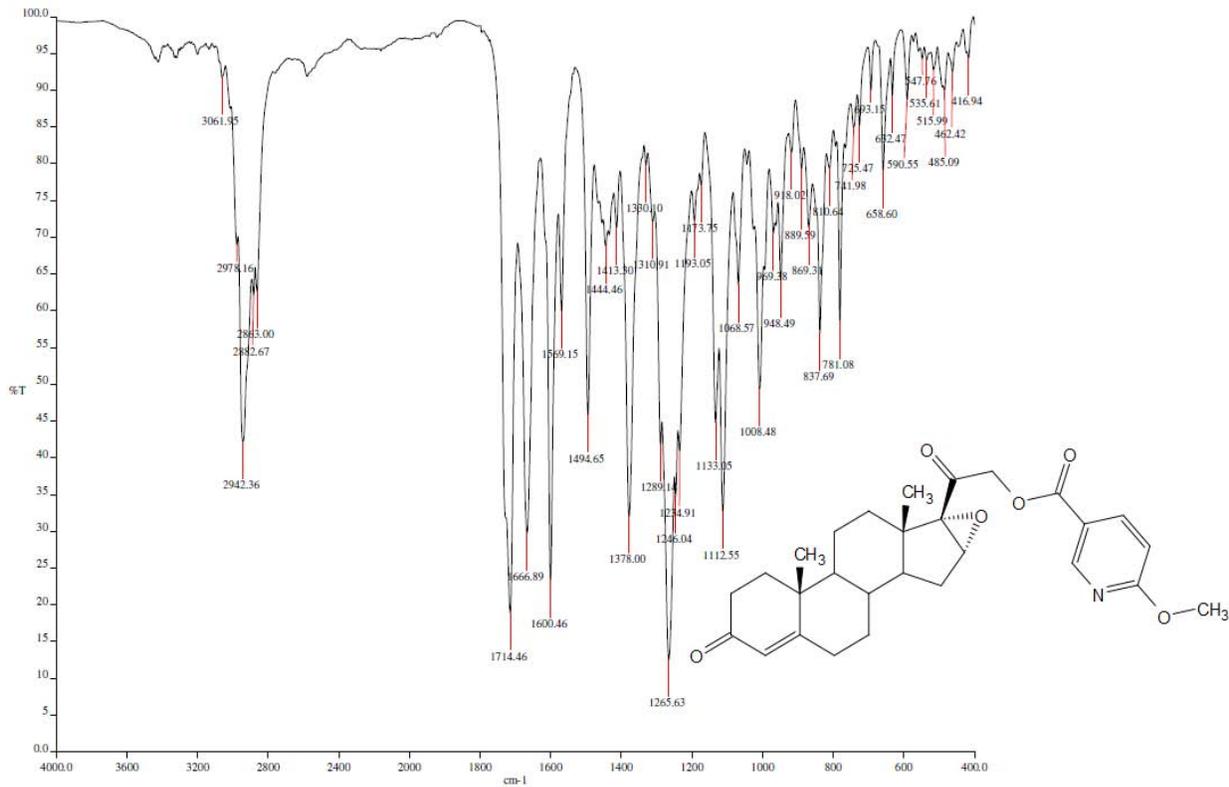
Espectro 35. RMN ^1H (CDCl_3) de 21-(6-metilpirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIId).



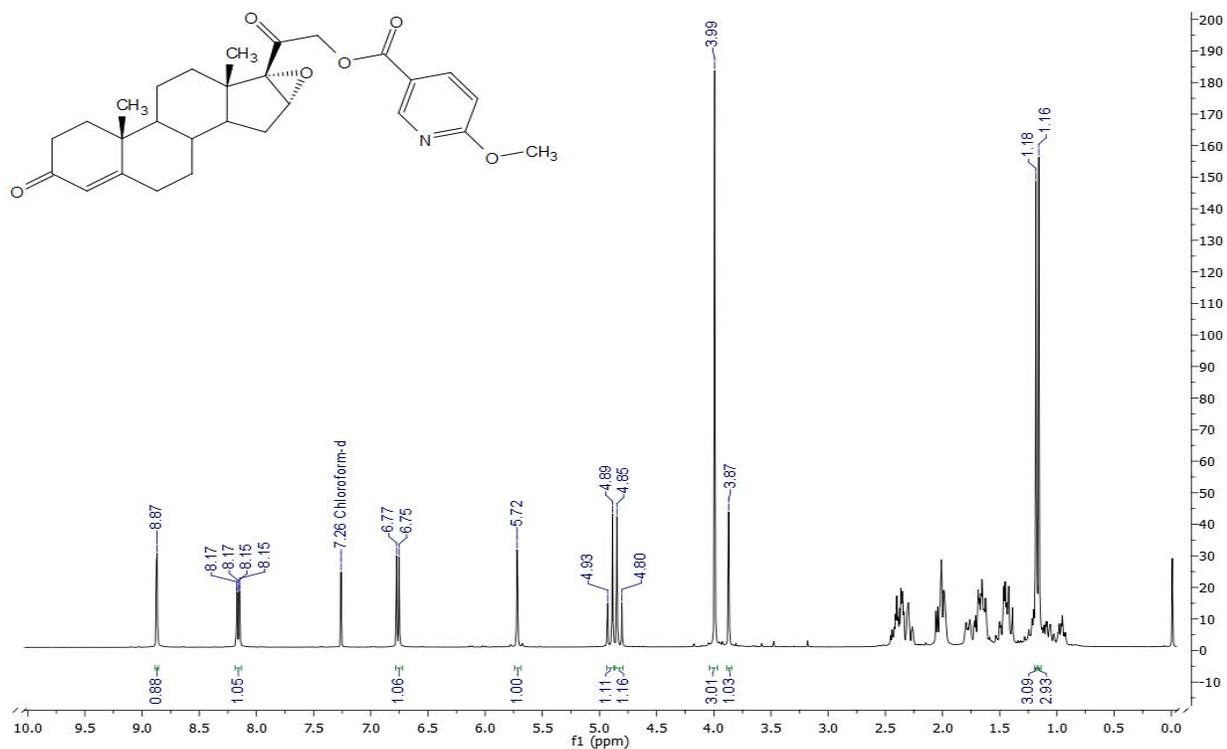
Espectro 36. RMN ^{13}C (CDCl_3) de 21-(6-metilpirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIId).



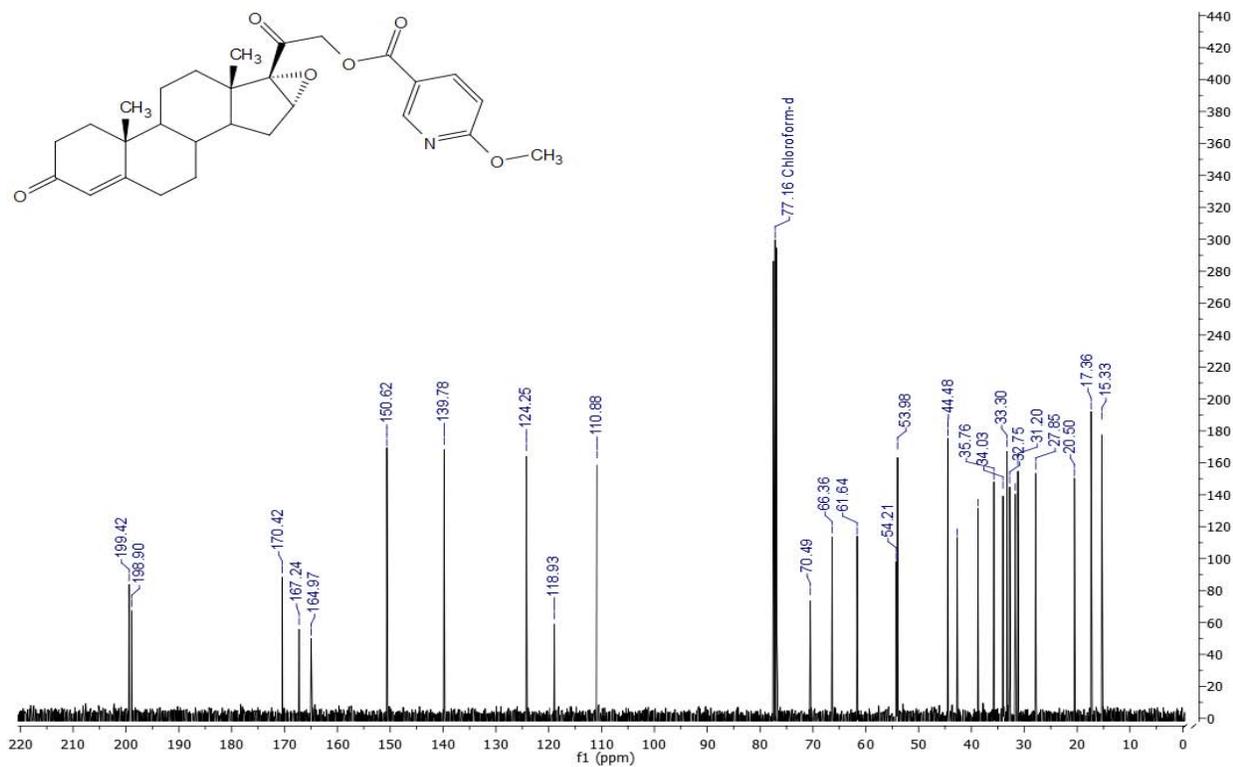
Espectro 37. EM (FAB, ID) de 21-(6-metilpirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIc).



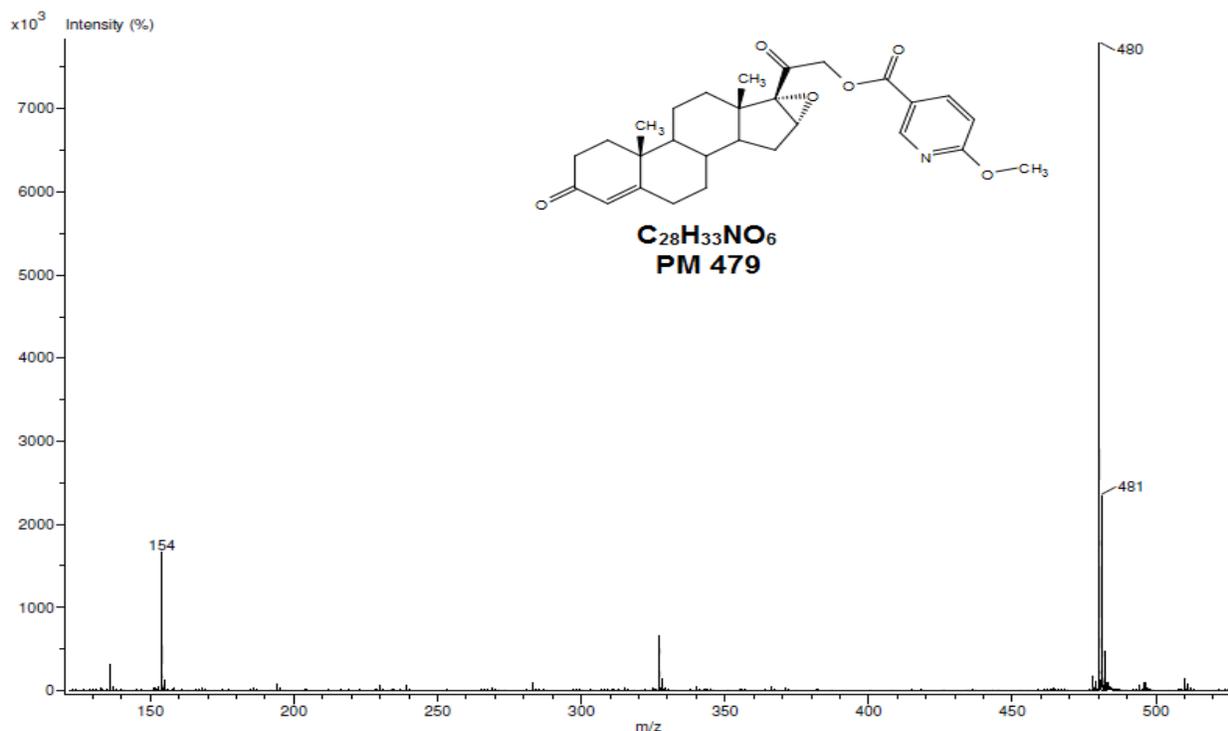
Espectro 38. IR (FTIR-ATR) de 21-(6-metoxipirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIe).



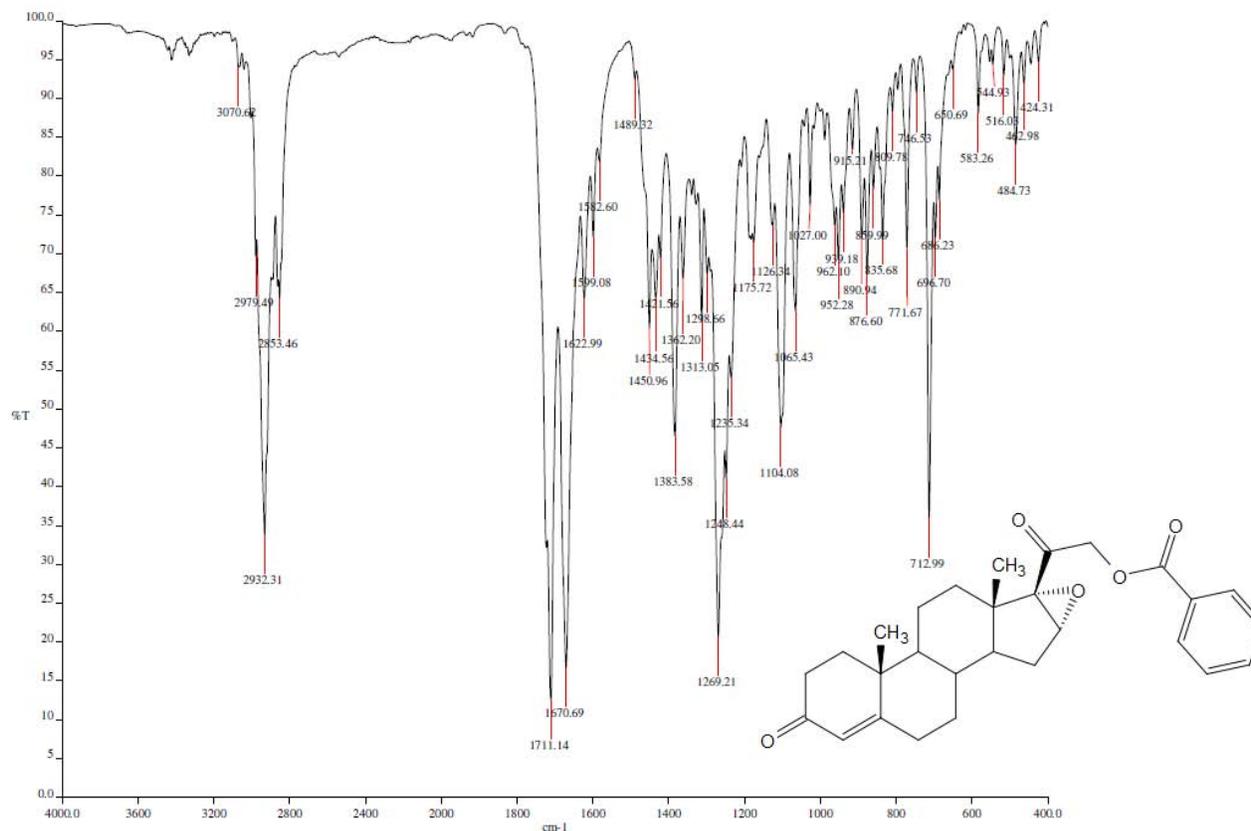
Espectro 39. RMN ^1H (CDCl_3) de 21-(6-metoxipirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIe).



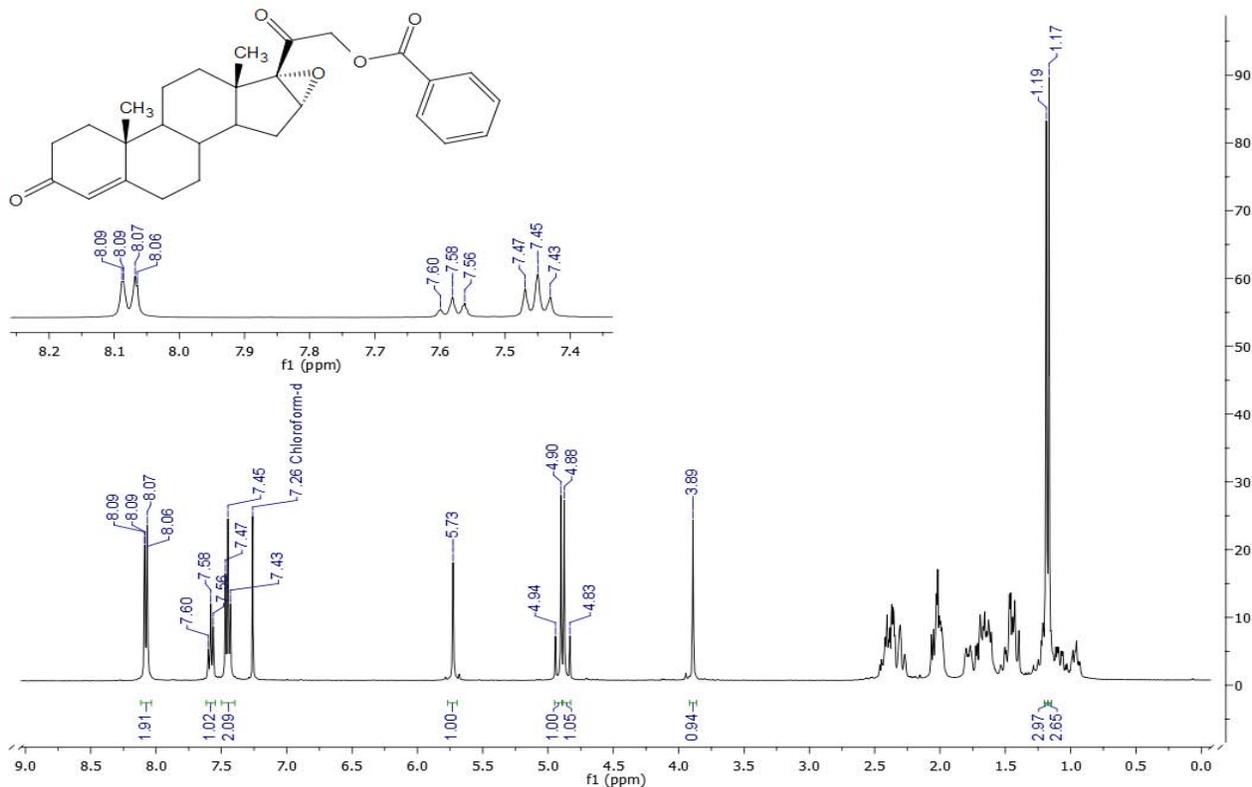
Espectro 40. RMN ^{13}C (CDCl_3) de 21-(6-metoxipirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIe).



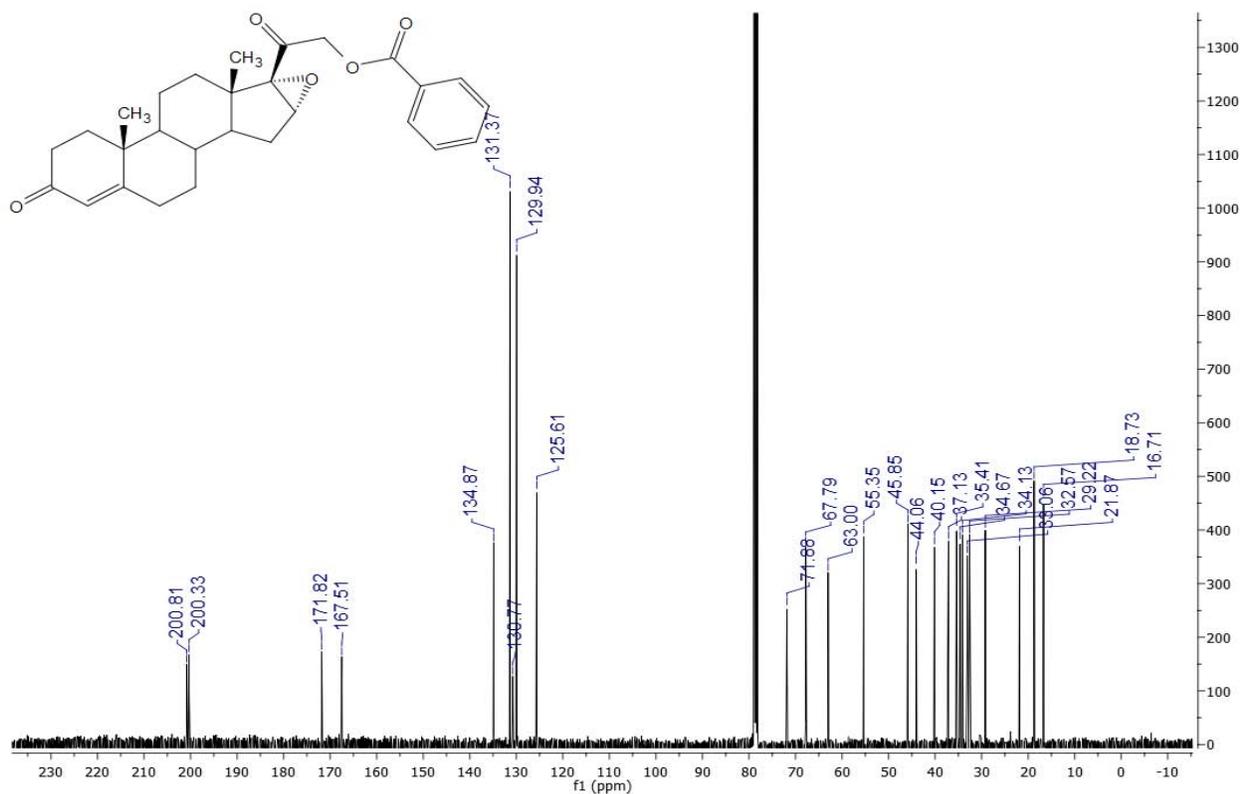
Espectro 41. EM (DART) de 21-(6-metoxipirid-3-il)carboniloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VIe).



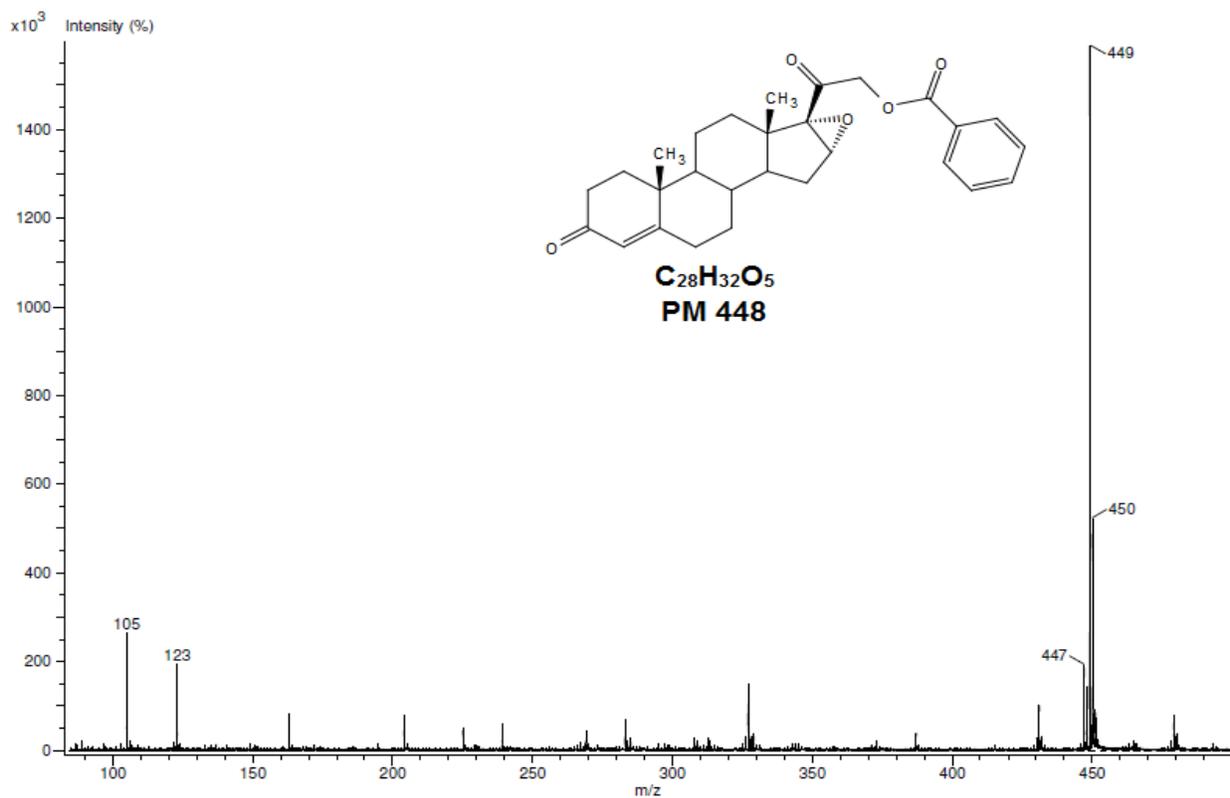
Espectro 42. IR (FTIR-ATR) de 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VI f).



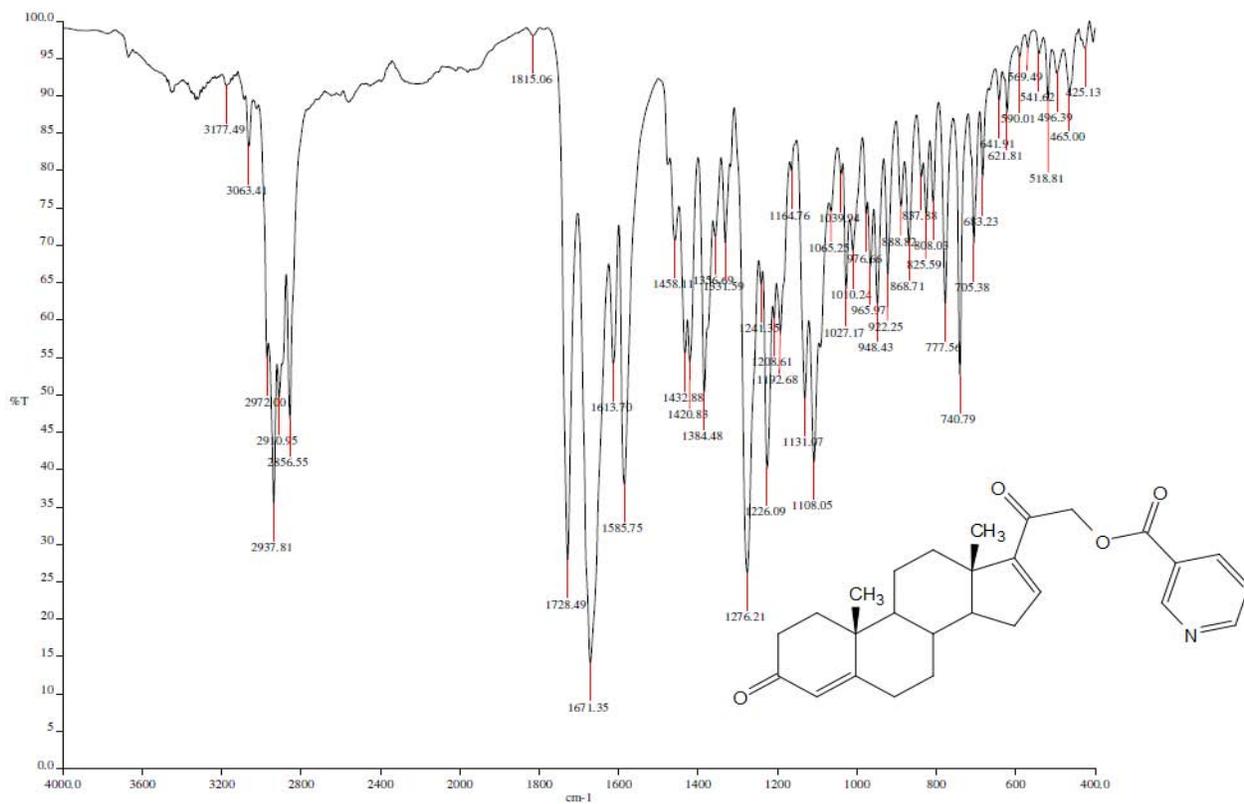
Espectro 43. RMN ^1H (CDCl_3) de 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VI f).



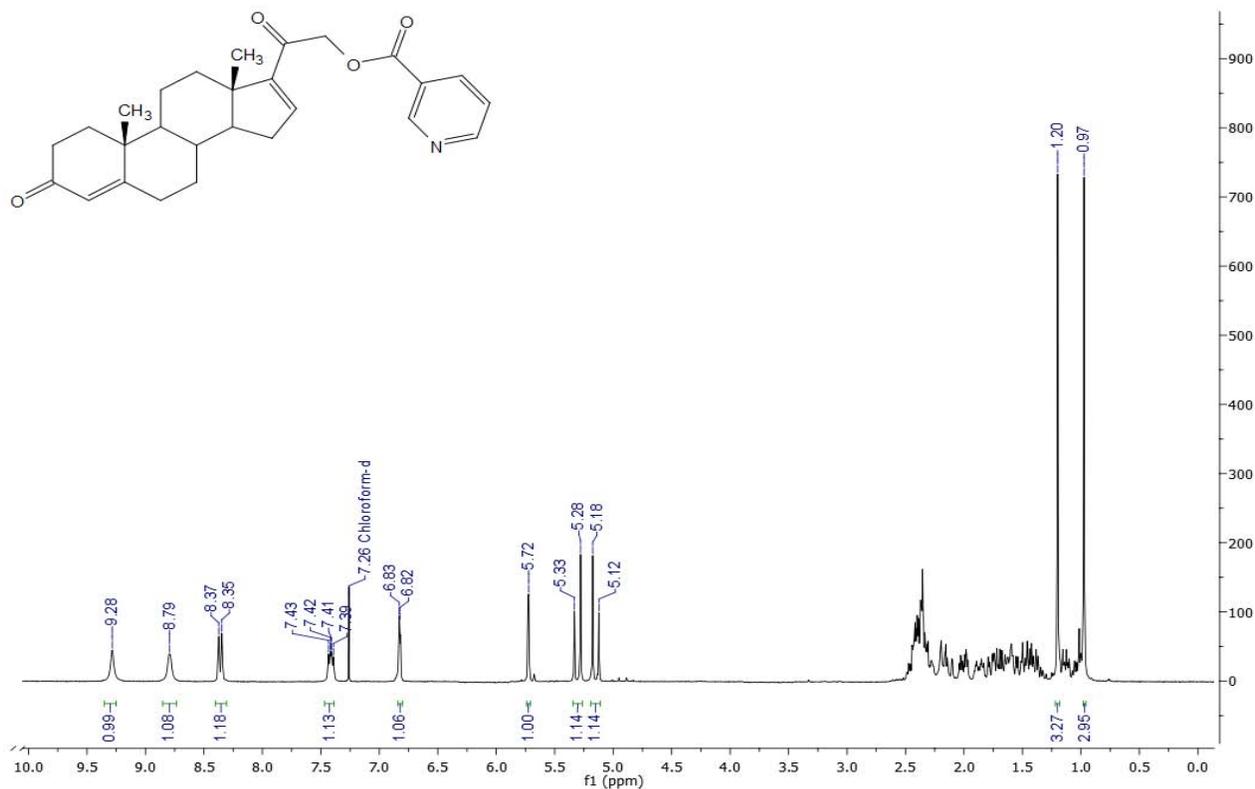
Espectro 44. RMN ^{13}C (CDCl_3) de 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VI f).



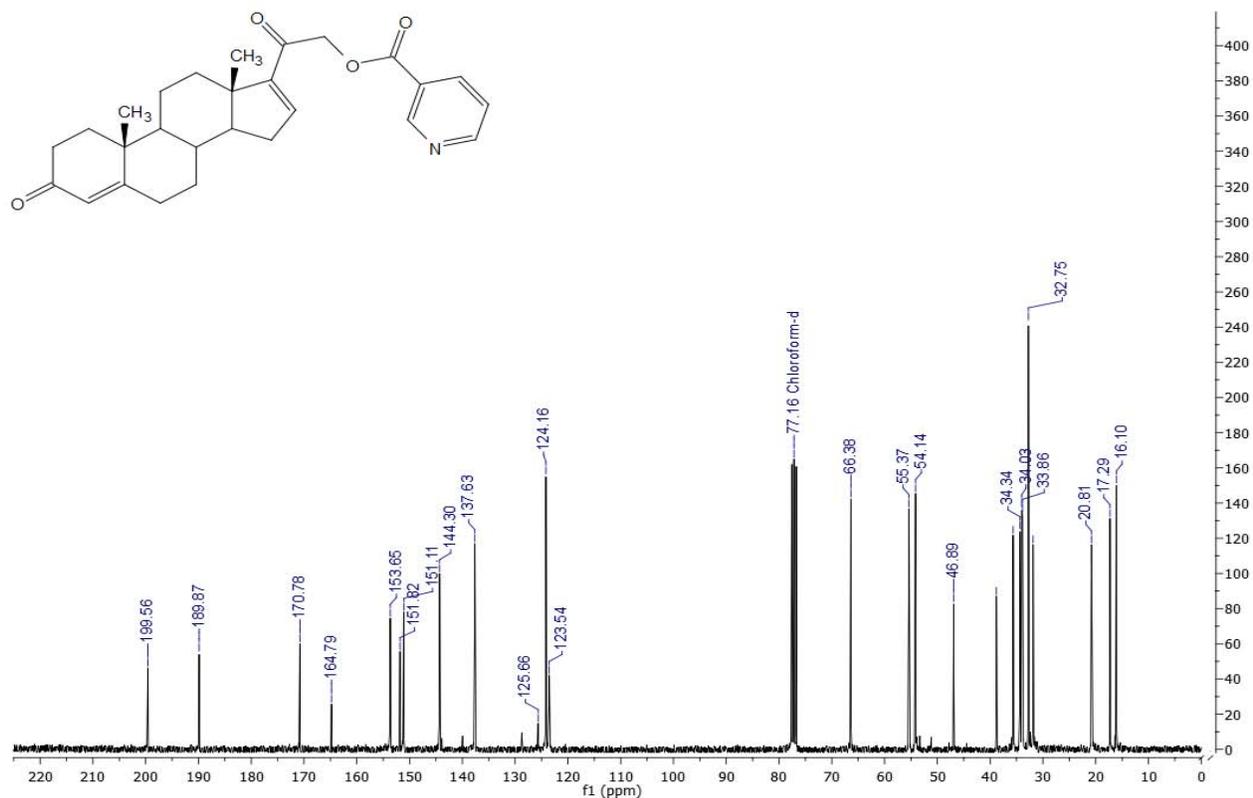
Espectro 45. EM (DART) de 21-(benzoiloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-4-eno-3,20-diona (VI f).



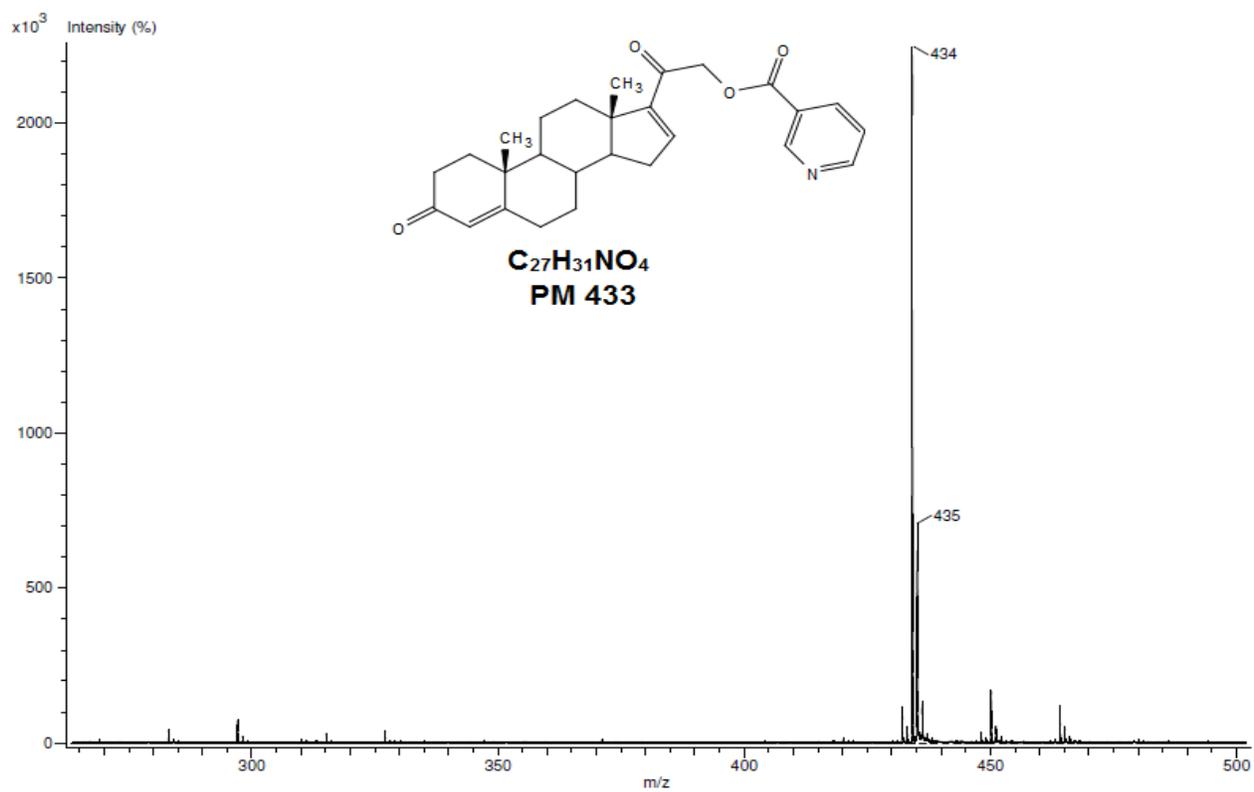
Espectro 46. IR (FTIR-ATR) de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VII a).



Espectro 47. RMN ^1H (CDCl_3) de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VIIa).



Espectro 48. RMN ^{13}C (CDCl_3) de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VIIa).



Espectro 49. EM (DART) de 21-(pirid-3-il)carboniloxipregna-4,16-dieno-3,20-diona (VIIa).