



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS

## **SÍNTESIS, ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR Y ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE NUEVOS DERIVADOS DEL PREGNANO**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

### **MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q.F.B. TANIA HERNÁNDEZ RÍOS**

**TUTOR: EUGENE A. BRATOEFF T. †**

**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**CDMX**

**JUNIO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

## JURADO ASIGNADO

<b>Presidente:</b> Dr. Roberto Martínez	Instituto de Química, UNAM
<b>Vocal:</b> Dr. Mariano Martínez Vázquez	Instituto de Química, UNAM
<b>Vocal:</b> Dr. Francisco Hernández Luis	Facultad de Química, UNAM
<b>Vocal:</b> Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	UAE Morelos
<b>Secretario:</b> Dr. José Guadalupe López Cortés	Instituto de Química, UNAM

### Lugar donde se desarrolló el trabajo:

Laboratorio 125, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.  
Bajo la dirección del Dr. Eugene A. Bratoeff<sup>†</sup>, y posterior supervisión del Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

### Parte de este trabajo fue presentado en:

**XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y VI Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas. 6-9 de Septiembre de 2015; Cancún, Quintana Roo.**

*Síntesis por química verde de 3β-hidroxi-21-(1H-imidazol-1-il)-pregna-5,16-dien-20-ona y su actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerosas. Hernández-Ríos Tania<sup>1</sup>, Silva-Ortiz Aylin V.<sup>1</sup>, Ramírez-Apan M. Teresa<sup>2</sup>, Bratoeff Eugene<sup>†</sup>*

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM. México, CDMX.

<sup>2</sup> Unidad de Pruebas Biológicas, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, UNAM. México, CDMX.

**Sustentante:** QFB Tania Hernández Ríos

**Supervisor:** Dr. Rafael Castillo Bocanegra

---

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la Facultad de Química por ser mi segunda casa estos años y por inculcarme valores que nutren la formación académica que me brindaron. Siempre será un placer haber formado parte de esta máxima casa de estudios.

Al Dr. Eugene Bratoeff<sup>†</sup> por todas sus enseñanzas, su ejemplo y por permitirme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

Al Dr. Rafael Castillo y a la Dra. Alicia Hernández por continuar con la labor de mi tutor y ayudarme a que pudiera concluir este proyecto.

Al Dr. Mario Figueroa por los resultados en espectrometría de masas y por todo el apoyo brindado dentro del laboratorio 125.

A la Dra. Adela Rodríguez y el M. en C. Baldomero Esquivel por los resultados de RMN que me permitieron poder concluir este trabajo, así como al personal del Instituto de Química por la realización de dichos espectros.

Al Q.F.B. Mario Ortiz y al candidato a doctor Francisco Cortés por la asesoría en la realización de los estudios de acoplamiento molecular.

A la M. en C. María Teresa Ramírez Apan por la realización de las pruebas *in vitro*.

Al personal de la USAI por la realización de los espectros IR, UV, EM y RMN.

Al Dr. Andrés Navarrete y al Departamento de Farmacia por permitirnos concluir nuestros proyectos en el laboratorio 125.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por el apoyo proporcionado durante mi permanencia en el posgrado.

A CONACyT por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de Maestría (núm. de CVU/Becario: 617784 / 335964). Así como al proyecto CONACyT (CB2011/165049) por financiar este proyecto.

---

A los miembros del jurado, así como a los candidatos a doctores Josué Velázquez y Francisco Cortés y la M. en C. María Eugenia Mendoza por sus valiosas aportaciones que enriquecieron este trabajo de tesis.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 125 por la convivencia diaria, por su amistad y gran apoyo que me brindaron para que pudiera culminar mi proyecto. ¡Muchas gracias! Aby, Ale, Fonsy, Iván, Mario, Maru, Paco y Sebas.

A Josué por su valiosa amistad, los buenos momentos y todo el apoyo incondicional fuera y dentro del laboratorio. Gracias por creer en mí.

A mi madre y hermanos por todo el cariño y confianza. Son un gran ejemplo a seguir para mí. Sin su apoyo y comprensión no hubiera podido concluir esta etapa. Muchísimas gracias.

A mi padre, si me estás viendo, espero te sientas orgulloso de mí.

A mi familia y amigos.

---

## ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras .....	vii
Índice de Tablas .....	viii
Índice de Esquemas .....	ix
Índice de Anexos .....	x
Abreviaturas .....	xii
<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
2.1. <b><i>Esteroides</i></b> .....	3
2.1.1. Generalidades .....	3
2.1.2. Clases de esteroides .....	5
2.1.3. Estereidogénesis .....	7
2.1.4. Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas .....	9
2.2. <b><i>Andrógenos y su regulación en la función de la próstata</i></b> .....	10
2.3. <b><i>Cáncer de Próstata</i></b> .....	11
2.3.1. Fisiopatología .....	12
2.3.2. Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CPRP) .....	14
2.3.3. Diagnóstico .....	14
2.3.4. Tratamientos .....	15
2.4. <b><i>CYP17A1: diana farmacológica contra Cáncer de Próstata</i></b> .....	18
2.4.1. Inhibidores de CYP17A1 .....	19
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>24</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
5.1. Objetivo general .....	24
5.2. Objetivos particulares .....	24
<b>6. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>

6.1. <b>Análisis computacional</b> .....	25
6.2. <b>Análisis químico</b> .....	34
6.2.1. Síntesis de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxipregn-5-en-20-ona (2) .....	35
6.2.2. Síntesis de 21-cloro-3 $\beta$ -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (3).....	37
6.2.3. Síntesis de 3 $\beta$ -hidroxi-21-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-pregna-5,16-dien-20-ona (4) .....	40
6.2.4. Síntesis de acetato de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (5a) .....	43
6.2.5. Síntesis de benzoatos de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (5b-5f) .....	45
6.3. <b>Análisis biológico</b> .....	49
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>54</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>55</b>
<b>9. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>56</b>
8.1. <b>Desarrollo computacional</b> .....	56
8.1.1. <i>Estudios de acoplamiento molecular</i> .....	56
8.1.1.1. Selección de diana biológica.....	56
8.1.1.2. Preparación de la proteína .....	57
8.1.1.3. Preparación de los ligandos .....	58
8.1.1.4. Acoplamiento molecular.....	58
8.1.2. <i>Determinación de cLog P</i> .....	58
8.2. <b>Desarrollo químico</b> .....	59
8.2.1. Materiales y métodos .....	59
8.2.2. Materia prima.....	60
8.2.3. Síntesis de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxipregn-5-en-20-ona (2) .....	61
8.2.4. Síntesis de 21-cloro-3 $\beta$ -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (3).....	62
8.2.5. Síntesis de 3 $\beta$ -hidroxi-21-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-pregna-5,16-dien-20-ona (4).....	63
8.2.6. Síntesis de acetato de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (5a).....	64
8.2.7. Síntesis de benzoatos de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (5b-5f) .....	65
8.3. <b>Desarrollo biológico</b> .....	68
8.3.1. Ensayo <i>in vitro</i> : inhibición de la proliferación de la línea celular PC-3 .....	68
8.3.2. Ensayo de toxicidad <i>in vitro</i> : inhibición de la proliferación de HGF .....	69
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	<b>70</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>78</b>

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano .....	<b>3</b>
<b>Fig. 2.</b> Comparación conformacional transoide y cisoide de los anillos A:B .....	<b>4</b>
<b>Fig. 3.</b> Descriptores estereoquímicos alfa – beta y su disposición en el espacio .....	<b>4</b>
<b>Fig. 4.</b> Clasificación de las siete principales familias de esteroides .....	<b>5</b>
<b>Fig. 5.</b> Biosíntesis de las hormonas esteroideas .....	<b>9</b>
<b>Fig. 6.</b> Mecanismo de acción general de las hormonas esteroideas .....	<b>10</b>
<b>Fig. 7.</b> Etapas generales de desarrollo del cáncer .....	<b>11</b>
<b>Fig. 8.</b> Tipos de cáncer más diagnosticados en el sexo masculino a nivel mundial .....	<b>11</b>
<b>Fig. 9.</b> Representación del sistema reproductor masculino con CaP .....	<b>12</b>
<b>Fig. 10.</b> Conversión de T a DHT en la próstata mediante la enzima 5 $\alpha$ -reductasa .....	<b>13</b>
<b>Fig. 11.</b> Tratamientos contra el CaP y sus sitios de acción .....	<b>16</b>
<b>Fig. 12.</b> Fármacos empleados para el tratamiento de CPRC aprobados por la FDA .....	<b>17</b>
<b>Fig. 13.</b> Ciclo catalítico de CYP17A1 .....	<b>18</b>
<b>Fig. 14.</b> Sitio de acción de un inhibidor de CYP17A1.....	<b>19</b>
<b>Fig. 15.</b> Inhibidores de CYP17A1 y la incidencia del núcleo de imidazol en sus estructuras ....	<b>20</b>
<b>Fig. 16.</b> Cristalografía de rayos X de CYP17A1 co-cristalizada con Abiraterona y TOK-001....	<b>21</b>
<b>Fig. 17.</b> Derivados del pregnano funcionalizados en C-3 y C-21 .....	<b>25</b>
<b>Fig. 18.</b> Comparación entre la cristalografía de rayos X y el acoplamiento molecular de CYP17A1 con Abiraterona .....	<b>28</b>
<b>Fig. 19.</b> Gráfica de la energía de unión de la serie de compuestos con la enzima CYP17A1 en el acoplamiento molecular.....	<b>29</b>
<b>Fig. 20.</b> Interacción de los compuestos con mayor energía de unión con la enzima CYP17A1. ....	<b>31</b>
<b>Fig. 21.</b> Interacción del compuesto 5b con la enzima CYP17A1 .....	<b>31</b>
<b>Fig. 22.</b> Comparación de los compuestos 4 y 4b en los estudios de acoplamiento molecular .	<b>32</b>
<b>Fig. 23.</b> Cavidades de los sitios activos de la enzima CYP17A1 con respecto al volumen ocupado por sus ligandos naturales .....	<b>33</b>
<b>Fig. 24.</b> Sistema ABq correspondiente a los protones diasterotópicos de C-21 en el espectro del compuesto <b>3</b> en RMN <sup>1</sup> H. ....	<b>39</b>



---

<b>Fig. 25.</b> Comparación del desplazamiento de los protones diasterotópicos según el sustituyente en C-21 en RMN <sup>1</sup> H .....	<b>41</b>
<b>Fig. 26.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 4.....	<b>42</b>
<b>Fig. 27.</b> Cambio de fase de sólido a líquido pasando por cristal líquido al incrementar la temperatura .....	<b>47</b>
<b>Fig. 28.</b> Compuestos <b>5e</b> y <b>5f</b> que presentaron el fenómeno de cristal líquido .....	<b>48</b>
<b>Fig. 29.</b> Gráfico de la actividad antiproliferativa sobre PC-3 y toxicidad en HGF de los compuestos sintetizados.....	<b>49</b>
<b>Fig. 30.</b> Comparación estructural de los compuestos con mayor actividad antiproliferativa. ....	<b>50</b>
<b>Fig. 31.</b> Comparación estructura-actividad de los compuestos con ésteres de benzoilo .....	<b>51</b>
<b>Fig. 32.</b> Mecanismo de acción independiente de andrógenos de VN/124-1 y Econazol .....	<b>53</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resultados de las posibles dianas farmacológicas de los compuestos de interés. ....	<b>26</b>
<b>Tabla 2.</b> Comparación de distancias de las interacciones de la Abiraterona con la enzima CYP17A1 entre la cristalografía de rayos X y el acoplamiento molecular. ....	<b>28</b>
<b>Tabla 3.</b> Resultados del estudio de acoplamiento molecular de la serie de compuestos .....	<b>30</b>
<b>Tabla 4.</b> Caracterización de la serie de compuestos 5b-5f en RMN.....	<b>46</b>
<b>Tabla 5.</b> Caracterización de la serie de compuestos 5b-5f .....	<b>47</b>
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de inhibición de la proliferación de PC-3 y HGF de los compuestos sintetizados.....	<b>49</b>
<b>Tabla 7.</b> Log P calculado para los compuestos sintetizados.....	<b>50</b>
<b>Tabla 8.</b> Minimización de la energía de la proteína CYP17A1 empleando el programa YASARA .....	<b>57</b>
<b>Tabla 9.</b> Sistemas de elución para CCF .....	<b>59</b>

---

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Ruta sintética para derivados del pregnano con un triazol en C-21.....	<b>22</b>
<b>Esquema 2.</b> Ruta sintética para derivados del pregnano funcionalizados en C-3 y C-21 .....	<b>34</b>
<b>Esquema 3.</b> Reacción de epoxidación en C-16 y C-17. ....	<b>35</b>
<b>Esquema 4.</b> Mecanismo de reacción de la epoxidación en C-16 y C-17. ....	<b>35</b>
<b>Esquema 5.</b> Mecanismo de reacción de la hidrólisis del acetato en C-3 en medio básico.....	<b>36</b>
<b>Esquema 6.</b> Reacción para la cloración en C-21 y formación de la insaturación en C16 y C17. .....	<b>37</b>
<b>Esquema 7.</b> Reacciones que se optimizan con la reacción de Girdhar e Ishar.....	<b>37</b>
<b>Esquema 8.</b> Mecanismos de reacción propuestos para la reacción II. ....	<b>38</b>
<b>Esquema 9.</b> Reacción de adición del imidazol en C-21.....	<b>40</b>
<b>Esquema 10.</b> Mecanismo de reacción de la adición del imidazol en C-21.....	<b>40</b>
<b>Esquema 11.</b> Reacción de acetilación en C-3.....	<b>43</b>
<b>Esquema 12.</b> Mecanismo de reacción de la acetilación en C-3.....	<b>43</b>
<b>Esquema 13.</b> Esterificación de Steglich en C-3.....	<b>45</b>
<b>Esquema 14.</b> Mecanismo de reacción de la esterificación de Steglich.....	<b>45</b>

---

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>A1.</b> Espectro de IR del compuesto 1.....	<b>78</b>
<b>A2.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 1 .....	<b>78</b>
<b>A3.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto 1 .....	<b>79</b>
<b>A4.</b> Espectro de masas del compuesto 1 .....	<b>79</b>
<b>A5.</b> Espectro de IR del compuesto 2 .....	<b>80</b>
<b>A6.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 2 .....	<b>80</b>
<b>A7.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto 2 .....	<b>81</b>
<b>A8.</b> Espectro de masas del compuesto 2 .....	<b>81</b>
<b>A9.</b> Espectro de UV del compuesto 3 .....	<b>82</b>
<b>A10.</b> Espectro de IR del compuesto 3 .....	<b>82</b>
<b>A11.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 3 .....	<b>83</b>
<b>A12.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto 3 .....	<b>83</b>
<b>A13.</b> Espectro de masas del compuesto 3 .....	<b>84</b>
<b>A14.</b> Espectro de UV del compuesto 4 .....	<b>84</b>
<b>A15.</b> Espectro de IR del compuesto 4.....	<b>85</b>
<b>A16.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 4 .....	<b>85</b>
<b>A17.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto 4 .....	<b>86</b>
<b>A18.</b> Espectro de masas del compuesto 4 .....	<b>86</b>
<b>A19.</b> Espectro de UV del compuesto 5a .....	<b>87</b>
<b>A20.</b> Espectro de IR del compuesto 5a .....	<b>87</b>
<b>A21.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 5a .....	<b>88</b>
<b>A22.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto 5a .....	<b>88</b>
<b>A23.</b> Espectro de masas del compuesto 5a .....	<b>89</b>
<b>A24.</b> Espectro de UV del compuesto 5b .....	<b>89</b>
<b>A25.</b> Espectro de IR del compuesto 5b .....	<b>90</b>
<b>A26.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 5b .....	<b>90</b>
<b>A27.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto 5b .....	<b>91</b>
<b>A28.</b> Espectro de masas del compuesto 5b .....	<b>91</b>
<b>A29.</b> Espectro de UV del compuesto 5c .....	<b>92</b>
<b>A30.</b> Espectro de IR del compuesto 5c .....	<b>92</b>

---

<b>A31.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto <b>5c</b> .....	<b>93</b>
<b>A32.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>5c</b> .....	<b>93</b>
<b>A33.</b> Espectro de masas del compuesto <b>5c</b> .....	<b>94</b>
<b>A34.</b> Espectro de UV del compuesto <b>5d</b> .....	<b>94</b>
<b>A35.</b> Espectro de IR del compuesto <b>5d</b> .....	<b>95</b>
<b>A36.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto <b>5d</b> .....	<b>95</b>
<b>A37.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>5d</b> .....	<b>96</b>
<b>A38.</b> Espectro de masas del compuesto <b>5d</b> .....	<b>96</b>
<b>A39.</b> Espectro de UV del compuesto <b>5e</b> .....	<b>97</b>
<b>A40.</b> Espectro de IR del compuesto <b>5e</b> .....	<b>97</b>
<b>A41.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto <b>5e</b> .....	<b>98</b>
<b>A42.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>5e</b> .....	<b>98</b>
<b>A43.</b> Espectro de masas del compuesto <b>5e</b> .....	<b>99</b>
<b>A44.</b> Espectro de UV del compuesto <b>5f</b> .....	<b>99</b>
<b>A45.</b> Espectro de IR del compuesto <b>5f</b> .....	<b>100</b>
<b>A46.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto <b>5f</b> .....	<b>100</b>
<b>A47.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>5f</b> .....	<b>101</b>
<b>A48.</b> Espectro de masas del compuesto <b>5f</b> .....	<b>101</b>

## ABREVIATURAS

<b>5<math>\alpha</math>-R</b>	Enzima 5 $\alpha$ -reductasa	<b>ID</b>	Introducción directa
<b>ABq</b>	Sistema AB cuarteto	<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo	<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>AcOH</b>	Ácido acético	<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<b>ADT</b>	Auto Dock Tools	<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>AR</b>	Abundancia relativa	<b>LHRH</b>	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero	<b>M</b>	Señal múltiple
<b>ATR</b>	Reflexión total atenuada	<b>MCF-7</b>	Línea celular de cáncer de mama
<b>CaP</b>	Cáncer de próstata	<b>NAD<sup>+</sup> / NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
<b>CC</b>	Cromatografía por columna	<b>NADP<sup>+</sup> / NADPH</b>	Fosfato de Dinucleótido de nicotinamida y adenina
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina	<b>nm</b>	Nanómetros
<b>CYP17A1</b>	Citocromo P450 17A1	<b>Pf</b>	Punto de fusión
<b>CPRC</b>	Cáncer de Próstata Resistente a la Castración	<b>PC-3</b>	Línea celular de adenocarcinoma de próstata
<b>d</b>	Señal doble	<b>PM</b>	Peso molecular
<b>DCC</b>	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida	<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>DCU</b>	Diciclohexilurea	<b>PSA</b>	Antígeno prostático específico
<b>dd</b>	Doble de dobles	<b>Py</b>	Piridina
<b>DHEA</b>	Dehidroepiandrosterona	<b>RA</b>	Receptor de andrógenos
<b>DHT</b>	Dihidrotestosterona	<b>R<sub>f</sub></b>	Factor de referencia
<b>DMAP</b>	4-( <i>N,N</i> -dimetilamino)piridina	<b>RE</b>	Reticulo endoplasmático
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -dimetilformamida	<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup> C
<b>EM</b>	Espectrometría de masas	<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup> H
<b>EM-ESI</b>	Espectrometría de masas por electrospray	<b>SHGB</b>	Globulina transportadora de hormonas sexuales
<b>EM-IE</b>	Espectrometría de masas por impacto electrónico	<b>SKLU-1</b>	Línea celular de adenocarcinoma pulmonar
<b>EM-FAB</b>	Espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos	<b>TBDMS-Cl</b>	Cloruro de <i>tert</i> -butildimetilsilano
<b>ERSR</b>	Estrés del retículo endoplásmico	<b>S</b>	Señal simple
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	<b>T</b>	Testosterona
<b>HGF</b>	Fibroblastos gingivales humanos	<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>HPB</b>	Hiperplasia prostática benigna	<b>UPR</b>	Respuesta a proteínas mal plegadas
<b>HSD</b>	Hidroxiesteroide deshidrogenasa	<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Hz</b>	Hertz	<b><math>\delta</math></b>	Desplazamiento
		<b><math>\lambda</math></b>	Longitud de onda

---

## 1. RESUMEN

El cáncer es una enfermedad con alta incidencia en todo el mundo. Específicamente, el cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer con mayor índice de morbilidad en hombres a nivel mundial, y la principal causa de muerte por cáncer en la población masculina de nuestro país.

Actualmente, el uso de una terapia hormonal se ha convertido en la opción menos invasiva para tratar el CaP y otras enfermedades andrógeno-dependientes. Esta terapia está basada en el uso de fármacos que evitan que las hormonas endógenas del organismo lleguen a sus órganos diana mediante diferentes mecanismos agonistas, antagonistas o por la inhibición de diferentes enzimas. Uno de los tratamientos contra el CaP es el uso de inhibidores de la enzima CYP17A1.

Debido a la incidencia de este tipo de padecimientos en la población a nivel mundial, la búsqueda de nuevos antiandrógenos más potentes es de crucial importancia. En nuestro grupo de investigación, diferentes derivados del esqueleto del pregnano han demostrado poseer actividad antiproliferativa significativa en diferentes líneas celulares cancerosas.

De esta manera, el presente trabajo se enfoca en estudios de acoplamiento molecular, síntesis, evaluación *in vitro* de derivados del pregnano funcionalizados en C-3 y C-21 como posibles inhibidores de la enzima CYP17A1.

Se realizaron estudios de acoplamiento molecular con compuestos derivados del pregnano funcionalizados en C-3 y C-21, de los cuales **3**, **4** y **5a-5f** fueron los que mostraron una mejor energía de unión en la enzima CYP17A1, superior al fármaco de referencia y a los sustratos naturales de la enzima. Estos compuestos se sintetizaron mediante una ruta sintética optimizada que disminuye el número de intermediarios y la cantidad de residuos, mejora la economía atómica y es menos costosa en comparación con la reportada anteriormente en nuestro grupo de trabajo.

---

En los ensayos de actividad antiproliferativa *in vitro*, los compuestos con mayor potencia sobre la línea celular PC-3 fueron **3** y **5a**; sin embargo, no fueron selectivos. Por su parte, los compuestos **4** y **5b** presentaron selectividad hacia esta línea celular con un porcentaje de inhibición de proliferación celular superior al 60% y una toxicidad inferior al 40% en células sanas a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  (para el compuesto **4**) y 25  $\mu\text{M}$  (para el compuesto **5b**). Mientras que los compuestos con ésteres de benzoilo en C-3 (**5c-5f**) aunque mostraron selectividad a la línea celular PC-3, no mejoraron la actividad antiproliferativa debido a factores estéricos y de alta lipofilia.

De la misma manera, en este trabajo se propone que la actividad antiproliferativa del compuesto **4** en células PC-3 se debe a un mecanismo de acción no relacionado con la estereoidogénesis ni al receptor de andrógenos.

---

## 2. ANTECEDENTES

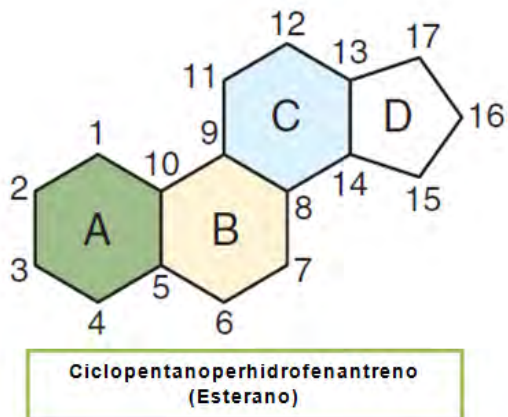
### 2.1. Esteroides

#### 2.1.1. Generalidades

Los esteroides son compuestos de naturaleza lipídica que participan en mecanismos de transcripción celular regulando múltiples funciones en el organismo, de carácter sexual, inmunológico y metabólico, siendo su liberación de tipo hormonal.

De acuerdo con la IUPAC, los esteroides se definen como compuestos que poseen el esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno o un esqueleto derivado del mismo. Así también, pueden poseer dos grupos metilo presentes normalmente en C-10 y C-13, así como una cadena lateral de alquilo en el C-17.<sup>1</sup>

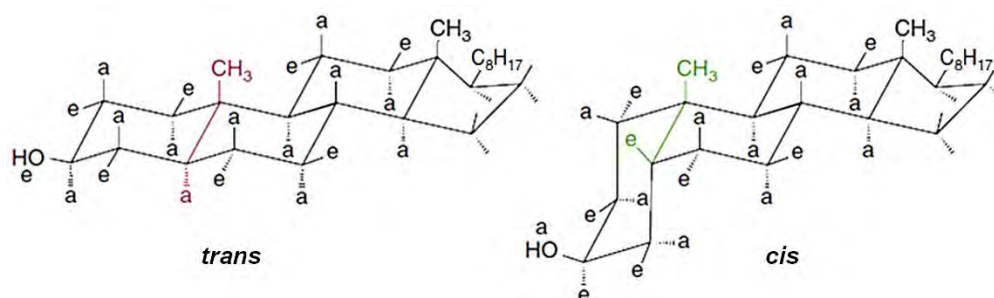
El ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano, es la forma completamente hidrogenada del fenantreno más un ciclopentano unido en su estructura. En total son 17 átomos de carbono formando 4 anillos fusionados: 3 ciclohexanos (anillos A, B y C) y un ciclopentano (anillo D).<sup>2</sup>



**Figura 1.** Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano.  
(Figura tomada y modificada de Norman A., 2015).<sup>3</sup>

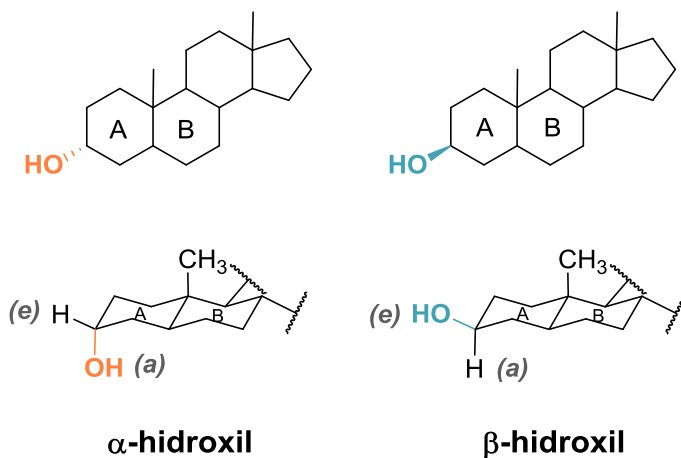


Aunque sólo existen 2 familias de esteroides que pueden tener la fusión de A:B *cis* o *trans*, se conoce que la fusión de los anillos B:C y C:D naturalmente es transoide (**Figura 3**).<sup>3</sup>



**Figura 2.** Comparación conformacional transoide y cisoides de los anillos fusionados A:B del núcleo esteroide. El de la izquierda es el colestanol con la conformación *trans*, mientras que el de la derecha es el coprostanol con la conformación *cis*. (Figura tomada y modificada de Norman A., 2015).<sup>3</sup>

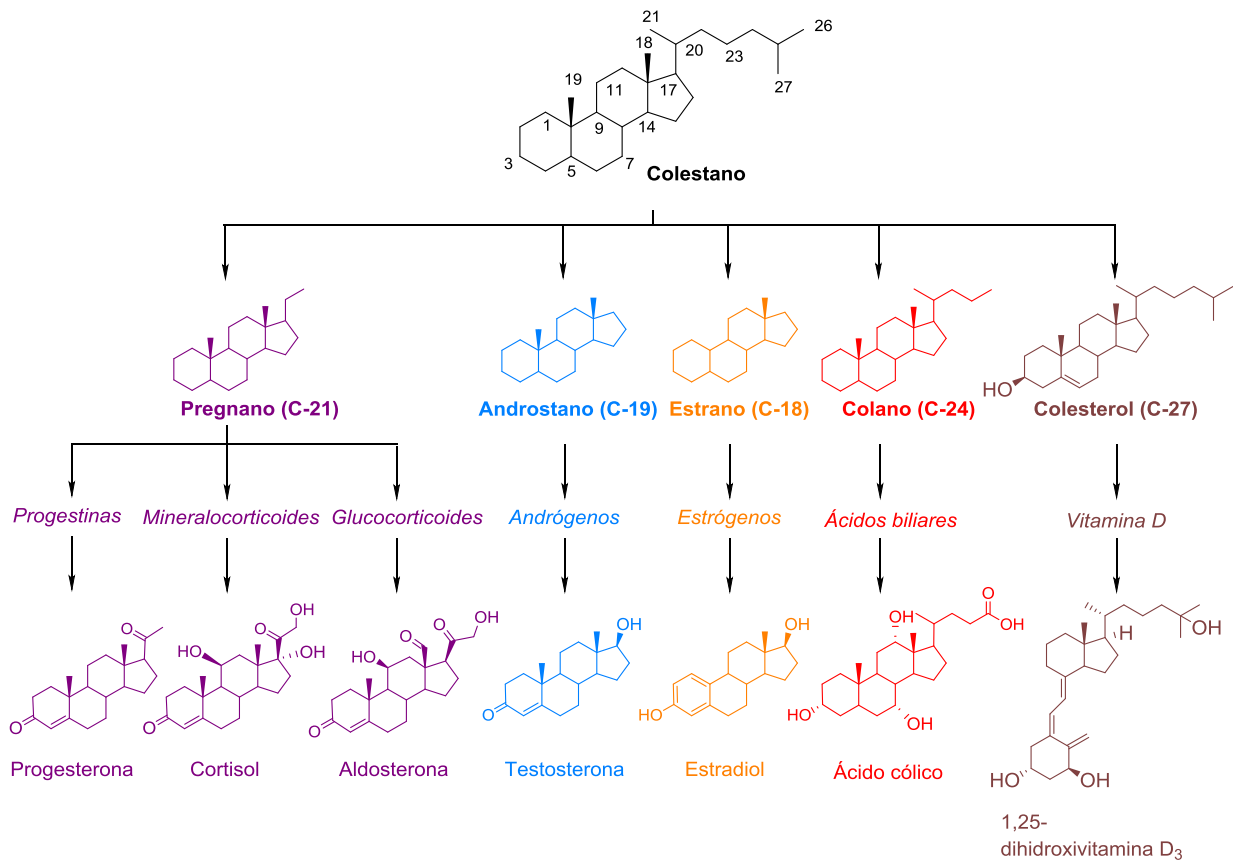
A su vez, existen dos descriptores estereoquímicos usualmente usados en la nomenclatura de esteroides, los cuales señalan la disposición espacial de los sustituyentes con respecto al plano del núcleo esteroide. Se asigna el descriptor “ $\beta$ ” cuando el sustituyente se encuentra arriba del plano de la molécula y el enlace se indica con cuñas; mientras que el descriptor “ $\alpha$ ” se utiliza cuando el sustituyente se encuentra por debajo del plano y el enlace se indica con línea sesgada (**Figura 3**).<sup>1,4</sup>



**Figura 3.** Descriptores estereoquímicos alfa – beta y su disposición en el espacio. (e) ecuatorial, (a) axial. (Figura tomada y modificada de Norman A., 2015).<sup>3</sup>

### 2.1.2. Clases de esteroides

En general, las hormonas esteroidales regulan una gran variedad de procesos relacionados con el desarrollo fisiológico desde la vida fetal hasta la adultez. En los mamíferos las hormonas esteroidales están clasificadas por su estructura química o por su función biológica (**Figura 4**). Estas son: hormonas sexuales, mineralocorticoides, glucocorticoides, ácidos biliares y derivados de la vitamina D. Todos son biológicamente derivados del colesterol.<sup>3</sup>



**Figura 4.** Clasificación de las siete principales familias de esteroides.  
(Figura tomada y modificada de Norman A., 2015).<sup>3</sup>

Las hormonas sexuales abarcan tres familias de esteroides: andrógenos (hormonas sexuales masculinas), progestinas y estrógenos (hormonas sexuales femeninas).

---

Los andrógenos son derivados del androstano, el cual consta de 19 átomos de carbono, siendo la testosterona el andrógeno más importante en la función reproductiva masculina.<sup>2</sup> En contraste, los estrógenos son derivados del estrano (núcleo de 18 átomos de carbono) y se caracterizan por tener el anillo A aromático, así como de la ausencia del metilo en C-19, utilizándose principalmente como anticonceptivos orales.<sup>2</sup> Por su parte, las progestinas son derivadas del pregnano, el cual está conformado por un núcleo de 21 átomos de carbono, siendo la progesterona la más representativa de este grupo.<sup>2</sup>

Otros derivados del núcleo del pregnano son los corticoesteroides, los cuales deben su nombre a que son sintetizados en la corteza de la glándula adrenal. Estos se encuentran conformados por los mineralocorticoides y los glucocorticoides. Los primeros se encargan de mantener el equilibrio electrolítico, así como de regular la cantidad de agua en el organismo, específicamente, la aldosterona. De la misma manera, la función de los glucocorticoides es principalmente controlar el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos; al mismo tiempo de poseer actividad antiinflamatoria, por ejemplo, el cortisol.<sup>2</sup>

Del mismo modo, la vitamina D es importante en el organismo para la fijación de calcio en los huesos. En la piel, el colesterol es convertido a 7-dehidrocolesterol, el cual por irradiación UV es convertido a pre-vitamina D<sub>3</sub> rompiendo el anillo B del esteroide. Posteriormente, la vitamina D<sub>3</sub> viaja por el flujo sanguíneo hasta el hígado y los riñones donde es hidroxilada para generar otros derivados de la vitamina D como la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> o la 24,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.<sup>3,5</sup>

A su vez, el exceso de colesterol en el organismo es oxidado en el hígado a compuestos más polares llamados ácidos biliares. Este proceso convierte la cadena terminal del colesterol en un ácido carboxílico y se hidroxila el núcleo esteroideal. Estos ácidos polihidroxilados son derivados del colano, es decir, su núcleo es de 24 átomos de carbono y juegan un papel esencial en la absorción y excreción de lípidos.<sup>2</sup>

Por su lado, el núcleo del colestano es la estructura que generalmente sirve de base de moléculas con largas cadenas en la posición 17, tales como el colesterol, el ergosterol y sus derivados.<sup>2</sup> Asimismo, se les llama esteroleos a aquellos esteroides que llevan un grupo hidroxilo en C-3 y la mayor parte del esqueleto de colestano.<sup>1</sup>

---

### 2.1.3. Estereidogénesis

El colesterol es el esteroide de mayor prevalencia en la mayoría de las especies animales. Una de sus principales funciones es la de mantener la rigidez de la membrana plasmática y es el precursor principal en la biosíntesis tanto de las hormonas esteroidales, la vitamina D<sub>3</sub>, así como de los ácidos biliares.<sup>3</sup>

Se le llama estereidogénesis al proceso por el cual el colesterol se convierte a hormonas esteroidales biológicamente activas (**Figura 5**). Este proceso incluye una serie de reacciones catalizadas por dos familias de enzimas: la familia de citocromo P450 e hidroxisteroide deshidrogenasas (HSD's).<sup>6</sup>

La familia del citocromo P450 se puede clasificar dependiendo de su localización a nivel celular: tipo 1 si se encuentra localizado en la mitocondria o de tipo 2 si se encuentra en el retículo endoplasmático liso. Esta familia de enzimas son un grupo de monooxigenasas de función mixta, las cuales se caracterizan por poseer un grupo hemo (un anillo de protoporfirina quelatado a un átomo de Fe<sup>3+</sup>). Se denominan P450 (pigmento 450), debido a que absorben la luz a 450 nm en su estado reducido (Fe<sup>2+</sup>).<sup>7</sup>

Para el caso de las HSD's, pertenecen a la familia de aldo-ceto reductasas o deshidrogenasas reductasas de cadena corta.<sup>6</sup> Ambos grupos, no cuentan con grupos hemo y requieren de los cofactores NADH/NAD<sup>+</sup> o NADPH/NADP<sup>+</sup> para realizar reacciones de reducción u oxidación sobre el esteroide mediante la transferencia de hidruro.<sup>7</sup>

El primer paso limitante en la estereidogénesis es la conversión de colesterol a pregnenolona por la enzima P450<sub>scc</sub> (enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol) perteneciente al grupo de CYP11A1, la cual es una "20,22 desmolasa" por romper en esas posiciones la cadena lateral del colesterol.<sup>7</sup>

Los pasos consecuentes en la biosíntesis son modulados por las familias de enzimas antes mencionadas, y éstas, son reguladas por modificaciones post-traduccionales y cofactores, especialmente por fuentes donadoras de electrones.<sup>7</sup>

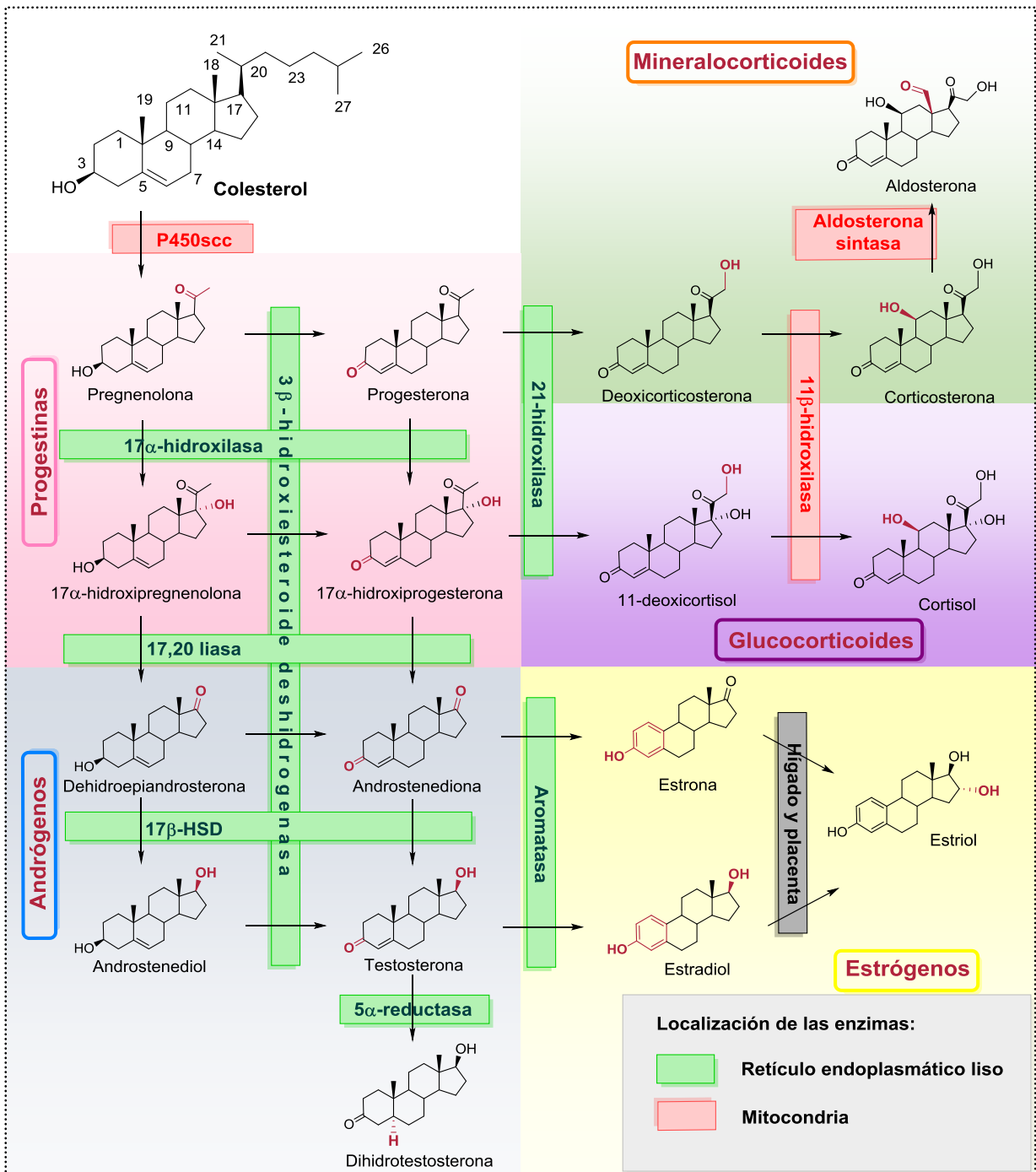


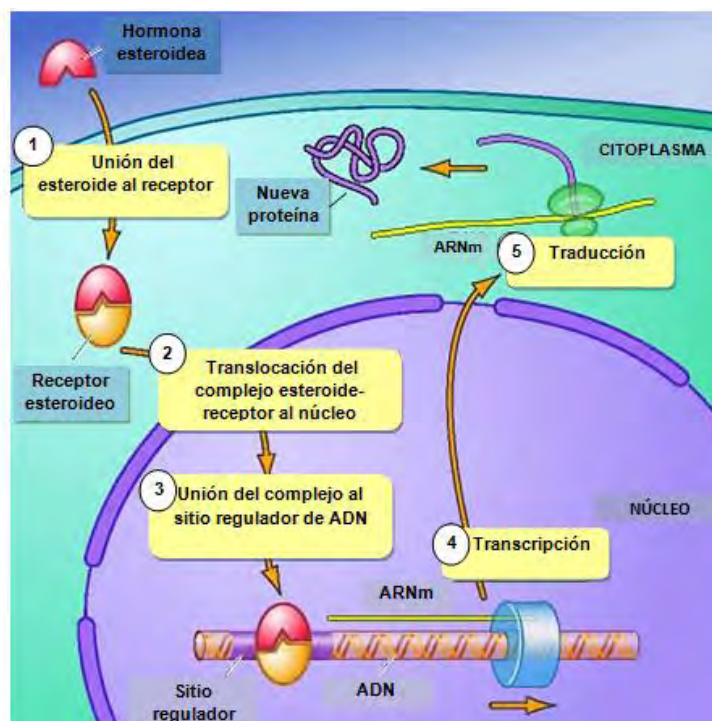
Figura 5. Biosíntesis de las hormonas esteroideas. (Figura tomada y modificada de Boron, W., 2003).

#### 2.1.4. Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas

Es bien sabido que las hormonas esteroideas son ligandos biológicos de los receptores nucleares. Por lo tanto, es necesario que atraviesen la membrana celular para poder unirse al receptor, por lo que se caracterizan por ser moléculas lipofílicas.<sup>8</sup>

El término receptores nucleares puede resultar equivocado, debido a que no están insertados en la membrana, sino que se encuentran en el citosol. Algunos de ellos, como los receptores esteroideos, adquieren movilidad tras unirse a su ligando y se trasladan al núcleo desde el citoplasma.<sup>8</sup>

En ausencia de su ligando, estos receptores se localizan fundamentalmente en el citoplasma formando complejos con proteínas o posiblemente se encuentren unidos de forma reversible al citoesqueleto u otras estructuras celulares. Como consecuencia de la difusión de su ligando al interior de la célula y su unión de gran afinidad al mismo, estos receptores suelen formar homodímeros, trasladarse al núcleo y regular la transcripción génica para la síntesis de proteínas (**Figura 6**).<sup>9</sup> De esta manera, este mecanismo basado en un solo ligando puede regular numerosos genes.<sup>8,10</sup>



**Figura 6.** Mecanismo de acción general de las hormonas esteroideas. (Figura tomada y modificada de thepeproject.net).<sup>9</sup>

---

## 2.2. Andr6genos y su regulaci3n en la funci3n de la pr3stata

Los andr6genos son las principales hormonas sexuales masculinas y son los responsables del desarrollo fenot3pico masculino durante la embriog3nesis y la maduraci3n sexual. El principal andr6geno circulante en el hombre es la testosterona (T), pero su metabolito m3s activo, la dihidrotestosterona (DHT), es la que participa en varios procesos biol3gicos dentro de los que se incluyen el desarrollo normal del sistema reproductor masculino y la presencia de las caracter3sticas sexuales secundarias en la pubertad.<sup>11-14</sup>

A su vez, los andr6genos son principalmente sintetizados en las c3lulas de Leydig en los test3culos, y en menor cantidad, en la corteza de las gl3ndulas suprarrenales.<sup>10</sup> Pero, la s3ntesis de los andr6genos se regula por el eje hipot3lamo-hip3fisis-gonadal, donde la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) es liberada del hipot3lamo para estimular la secreci3n de la hormona luteinizante (LH) en la adenohip3fisis, la cual posteriormente estimula a las c3lulas de Leydig en los test3culos para inducir la s3ntesis de testosterona. Ya liberada, la testosterona pasa a la circulaci3n sangu3nea, unida a la alb3mina o a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), o tambi3n en forma libre, para alcanzar sus 3rganos blancos y ejercer sus efectos.<sup>10,15</sup>

Uno de los 3rganos blanco destacado en donde la testosterona ejerce un papel importante en su desarrollo y crecimiento es la pr3stata.<sup>10</sup> La pr3stata es una gl3ndula firme que se encuentra debajo de la vejiga y rodea la uretra. Su principal funci3n es producir l3quido seminal, y a su vez, en ella la testosterona es convertida a DHT a trav3s de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa.<sup>16,17</sup>

En t3rminos de influencias hormonales, se considera que los andr6genos cumplen una funci3n en ciertas patolog3as de la pr3stata, por ejemplo la hiperplasia prost3tica benigna (HPB) y el c3ncer de pr3stata (CaP).<sup>16</sup> Las evidencias que respaldan la influencia hormonal incluyen la presencia de receptores esteroideos en la pr3stata, el requerimiento de hormonas para su crecimiento y desarrollo normal, y el hecho de que el CaP casi nunca se desarrolla en hombres castrados. La respuesta del CaP a la privaci3n androg3nica respalda en forma adicional la correlaci3n de la enfermedad y los niveles de testosterona.<sup>13,15,18</sup>

### 2.3. Cáncer de Próstata

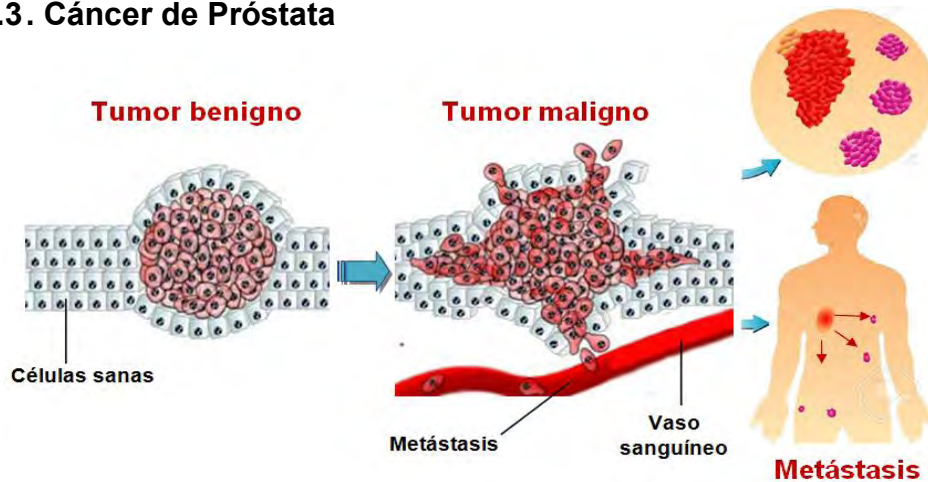


Figura 7. Etapas generales de desarrollo del cáncer.

El cáncer es un término genérico que designa un grupo de enfermedades relacionadas que se caracterizan por la proliferación descontrolada de células poco diferenciadas, las cuales pueden formar agregados celulares llamados *tumores*. Los tumores cancerosos son malignos, es decir, invaden tejidos adyacentes o desprenden células cancerosas que viajan a lugares distantes en el cuerpo a través de la sangre o el sistema linfático y forman nuevos tumores diseminados en todo el organismo, proceso conocido como *metástasis* (Fig. 7).<sup>19,20</sup>

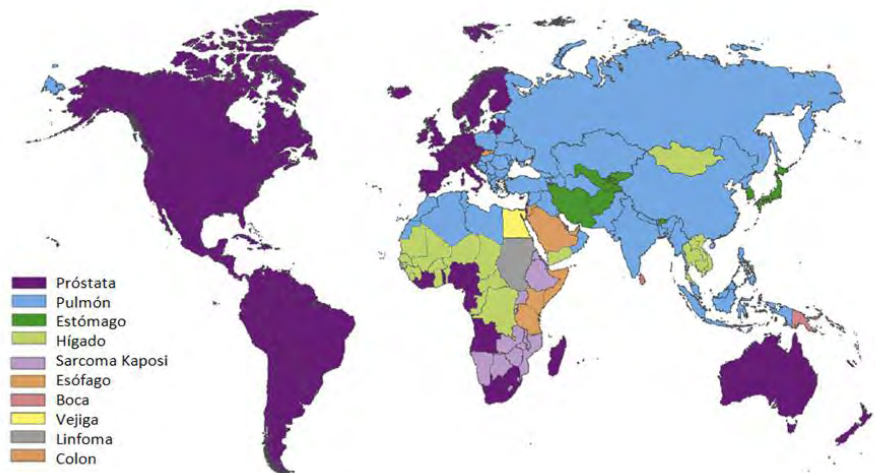


Figura 8. Tipos de cáncer más diagnosticados en el sexo masculino a nivel mundial, GLOBOCAN 2008.<sup>20</sup>

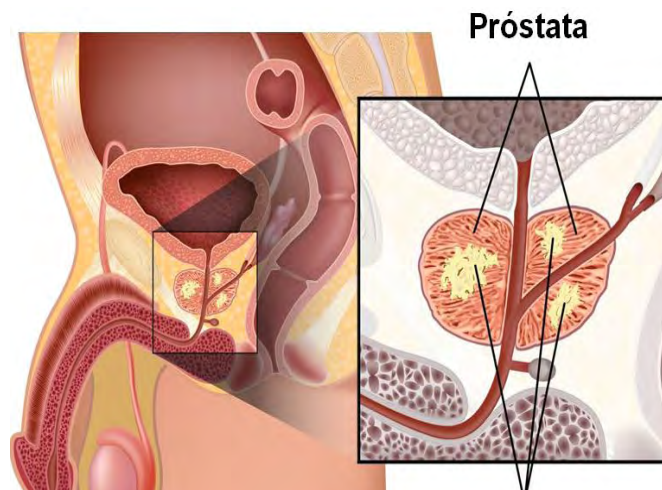
En términos estadísticos, el cáncer de próstata (CaP) es de gran interés puesto que es el segundo cáncer con mayor índice de morbilidad diagnosticado en hombres a nivel mundial (Figura 8)<sup>21,22</sup> y la principal causa de muerte por cáncer en la población masculina de nuestro país, según las estadísticas del INEGI (2013).<sup>23</sup>



---

### 2.3.1. Fisiopatología

El CaP suele desarrollarse muy lentamente (**Figura 9**)<sup>24</sup> y a menudo no presenta síntomas tempranos. Sin embargo, la presencia de síntomas suele sugerir un CaP avanzado o metastásico<sup>16</sup>. Entre los síntomas se encuentran: tenesmo vesical, polaquiuria, nicturia, intermitencia, disuria y hematuria que también obedecen a afecciones benignas de la próstata. La metástasis ósea, en particular en la columna vertebral, las costillas y la pelvis, causan dolor y suelen presentarse como primer signo de la enfermedad.<sup>16</sup> Además, si el cáncer se desarrolla dentro de la glándula, la expectativa de vida es mayor a 5 años, pero si éste ya ha producido metástasis a hueso, la expectativa se reduce de 1 a 3 años.<sup>11,25</sup>



**Figura 9.** Representación del sistema reproductor masculino con CaP.  
(Figura tomada y modificada de Infirmus).<sup>24</sup>

La causa de desarrollo del CaP se desconoce, pero se sospecha que existen varios factores de riesgo, como la edad, la etnia, la herencia y factores ambientales que desempeñan algún papel en la aparición de la enfermedad.<sup>16,26-28</sup>

La mayoría de los hombres diagnosticados con cáncer de próstata son mayores de 65 años.<sup>20,28</sup> También se ha observado incidencia de CaP en la raza afroamericana en comparación con la caucásica o asiática que presentan tasas más bajas. De la misma manera, el factor genético ha mostrado ser importante, ya que los pacientes con familiares con CaP tienen un riesgo 8 veces mayor a padecerlo en comparación con los que no tienen ascendencia con dicha enfermedad.<sup>28</sup> Asimismo, la mayor ingesta de grasa en la dieta podría alterar la producción de hormonas sexuales y aumentar el desarrollo de CaP.<sup>27</sup>

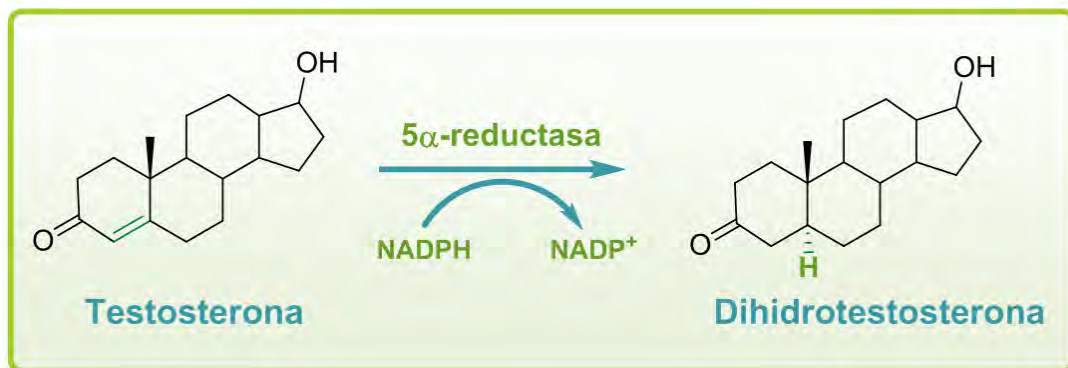
---

Desde los 40's Huggins y Hodges observaron que la privación androgénica funciona como tratamiento para el CaP, demostrando que los andrógenos tenían un papel crucial en el desarrollo de este padecimiento.<sup>29</sup>

Ahora se sabe que el incremento del nivel de andrógenos favorece el desarrollo de CaP, ya que promueven la proliferación tanto de células cancerosas como de células sanas en la próstata, al unirse al receptor de andrógenos (RA) y activarlo. Una vez que se activa, el RA estimula la expresión de genes específicos que hacen que se desarrollen las células de la próstata (**Figura 6**).<sup>20</sup>

Al principio de su formación, las células cancerosas son sensibles a concentraciones relativamente altas de andrógenos para su desarrollo, es decir, es dependiente o *sensible a andrógenos*. Incluso, se ha demostrado que los tratamientos que disminuyen las concentraciones de andrógenos o que bloquean su actividad pueden inhibir el desarrollo neoplásico.<sup>11,20</sup>

Como prueba de ello, el principal andrógeno que se ha relacionado con el desarrollo del CaP es la DHT, puesto que en la próstata se lleva a cabo la conversión de T a DHT mediante la enzima 5 $\alpha$ -reductasa y dicho metabolito es biológicamente mucho más activo que la T (**Figura 10**).<sup>17</sup>



**Figura 10.** Conversión de T a DHT en la próstata mediante la enzima 5 $\alpha$ -reductasa.

Sin embargo, las células cancerosas eventualmente se hacen *resistentes a la castración*, es decir, que pueden seguir proliferando aun cuando las concentraciones de andrógenos en el cuerpo sean extremadamente bajas o que no puedan detectarse.<sup>20</sup>

---

### 2.3.2. *Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CPRC)*

Como ya se mencionó, al inicio de su desarrollo, el CaP depende de los andrógenos para su crecimiento neoplásico. A pesar de ello, tarde o temprano, el CaP se vuelve no dependiente de andrógenos, reanudando su crecimiento en una forma más agresiva y difícil de tratar en un período de 12 a 18 meses en promedio. Así, la progresión de un CaP dependiente de andrógenos a uno no dependiente es un paso crítico en el avance de esta enfermedad.<sup>11</sup>

Actualmente, se tiene evidencia que el CPRC no es totalmente independiente de andrógenos, sino que sufre adaptaciones en las que responde a concentraciones más bajas de andrógenos. Incluso, recientes estudios sugieren que el CPRC puede sintetizar andrógenos *de novo* manteniendo la vía de señalización de andrógenos activa.<sup>30-33</sup>

Hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esta transición en el CaP. Se cree que en gran parte está implicado el RA. Así, la sobreexpresión, la hipersensibilidad a los andrógenos, las mutaciones y/o repeticiones cortas de glutamina o glicina que presenta el RA son algunos mecanismos que se proponen para explicar esta respuesta.<sup>15,34,35</sup>

### 2.3.3. *Diagnóstico*

Como el CaP es asintomático, es importante realizar pruebas de detección tempranas. Las pruebas disponibles para el diagnóstico del CaP son:

- Tacto rectal
- Ecografía transrectal
- Biopsia
- Medición de PSA (Antígeno prostático específico)

El PSA es una glucoproteína secretada en el citoplasma de las células prostáticas benignas y malignas que no aparece en otros tejidos ni tumores. Sin embargo, una prueba positiva de PSA sólo indica la posible presencia de CaP, ya que también es positiva para otros padecimientos como HPB y prostatitis.<sup>16</sup>

---

#### 2.3.4. *Tratamientos*

El CaP se trata de acuerdo al estadio tumoral, edad y el estado de salud del paciente.<sup>36,37</sup> Cuando los pacientes presentan un CaP temprano y localizado se puede tratar con una terapia local, la cual no depende de tratamientos farmacológicos. Los procedimientos que se utilizan son:<sup>38</sup>

- **Prostatectomía:** consiste en la extirpación de la próstata y las vesículas seminales.
- **Radioterapia:** se basa en la radiación con isótopos radioactivos y puede ser de forma externa o mediante un implante transperineal de radioisótopos en la zona del tumor (*braquiterapia*).
- **Crioterapia:** se utiliza cuando la radioterapia fracasa y consiste en el congelamiento de la próstata con gas argón o helio para destruir la células cancerosas.<sup>39</sup>

Sin embargo, estos tratamientos son poco eficientes para pacientes que muestran un CaP avanzado. En estos casos, se recurre a tratamientos secundarios como la privación de andrógenos con el propósito de retrasar o inhibir el crecimiento neoplásico. Entre ellos se encuentran:

- **Orquiectomía:** extirpación de los testículos.
- **Terapia hormonal:** está basada en el tratamiento farmacológico capaz de bloquear la acción de los andrógenos.

La terapia hormonal es la primera opción para los pacientes con CaP avanzado y sensible a andrógenos actuando mediante diferentes mecanismos que bloquean la acción de los andrógenos sobre sus dianas biológicas. Por ejemplo:

- **Estrógenos y progestinas:** fueron los primeros intentos para suprimir la producción de andrógenos, sin embargo fueron abandonados debido a sus efectos secundarios como la ginecomastia y los altos niveles de colesterol.<sup>10,38</sup>
- **Análogos de la LHRH (agonistas/antagonistas):** bloquean la secreción de LH provocando una castración química:<sup>16,38</sup> *Goserelina, Leuprolida y Buserelina.*

- **Antiandrógenos:** pueden actuar por diferentes mecanismos, por ejemplo los antagonistas del RA: *Ciproterona*, *Flutamida* y *Bicalutamida*.<sup>13,38</sup>
- **Inhibidores de andrógenos suprarrenales:** inhiben enzimas que participan en la síntesis de andrógenos en las glándulas suprarrenales:<sup>16</sup> *Ketoconazol*<sup>40,41</sup> y *Aminoglutetimida*.
- **Inhibidores de CYP17A1:** inhiben el CYP17A1, una enzima crítica en la esteroidogénesis de andrógenos:<sup>30</sup> *Abiraterona*.

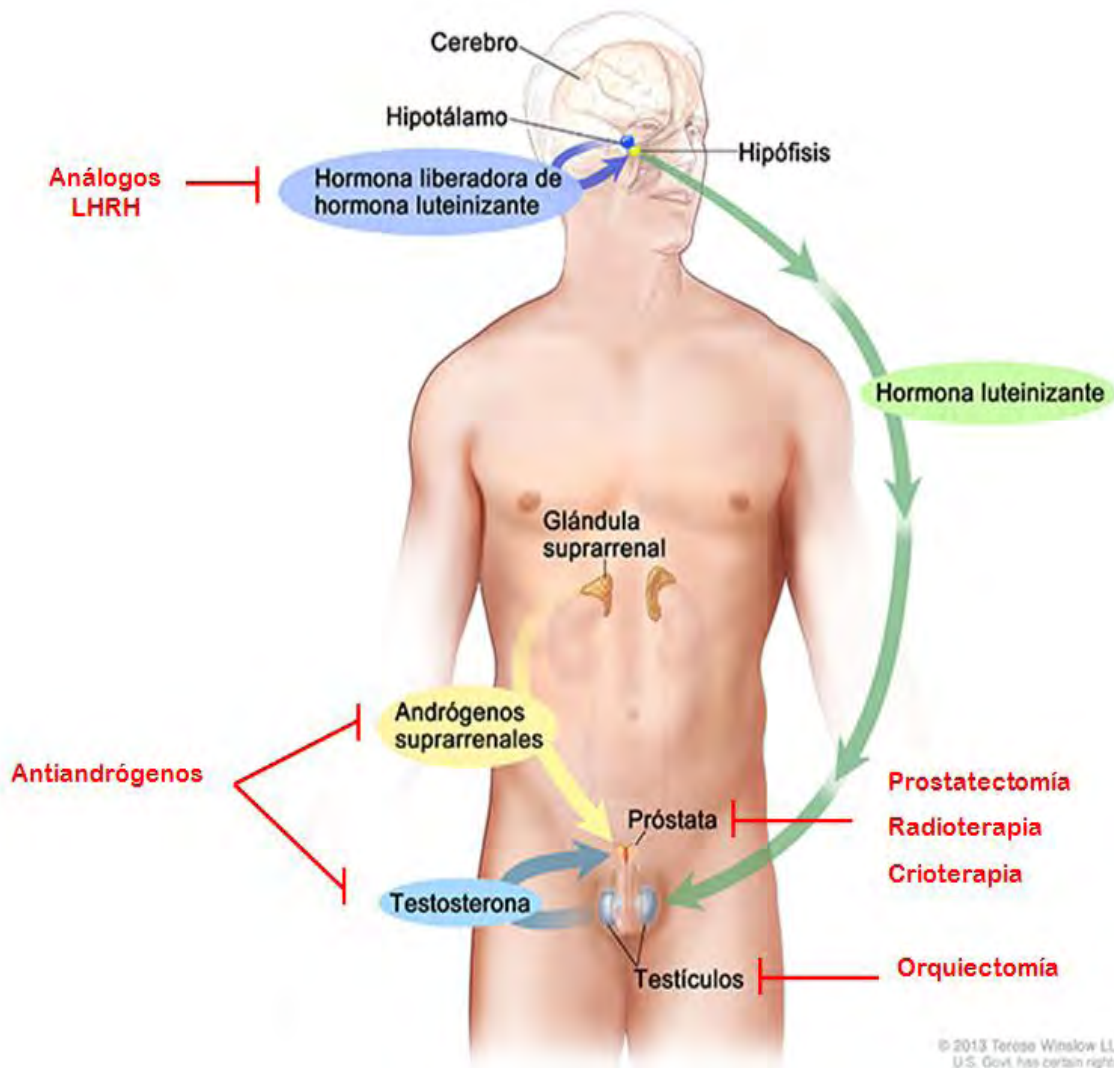


Figura 11. Tratamientos contra el CaP y sus sitios de acción (Figura tomada y modificada de NIH).<sup>19</sup>

La mayoría de los pacientes que reciben estos tratamientos presentan una mejoría después de un tiempo; sin embargo, el efecto de la terapia hormonal es temporal y los pacientes se vuelven insensibles. Inclusive, el 90% de los pacientes con CPRC llega a presentar metástasis a hueso.<sup>36</sup>

Desde 2010, seis fármacos han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de CPRC:<sup>36</sup>

- **Abiraterona** (inhibidor de CYP17A1): para pacientes con CPRC.
- **Enzalutamida** (antagonista del RA): para pacientes con CaP avanzado con metástasis.
- **Cabazitaxel** (agente citotóxico): para pacientes con CPRC.
- **Denosumab** (anticuerpos monoclonales): para pacientes que presentan metástasis en hueso.
- **Alpharadin** (radiofármaco con  $^{223}\text{RaCl}_2$ ): para pacientes con CPRC y metástasis en hueso.
- **Sipuleucel-T** (vacuna- inmunoterapia celular autóloga): para pacientes con CaP avanzado. El tratamiento oscila aproximadamente en \$100,000 USD por fase.<sup>42</sup>

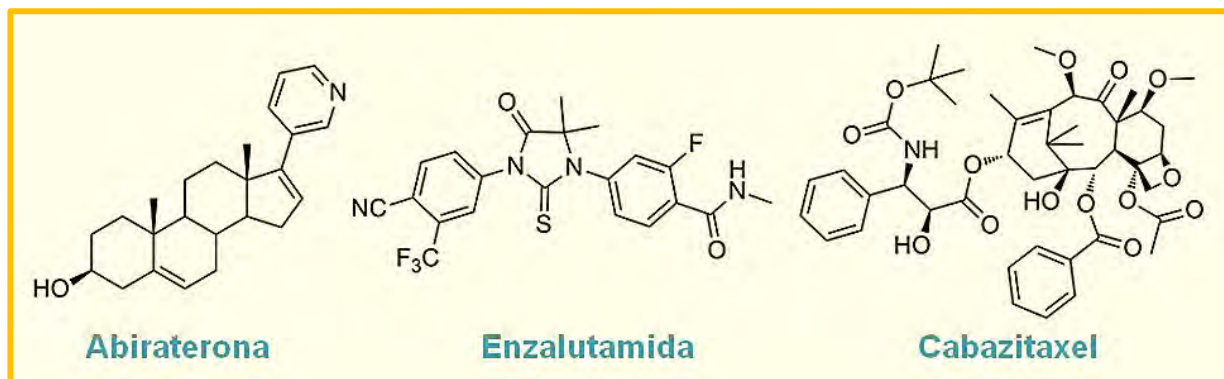


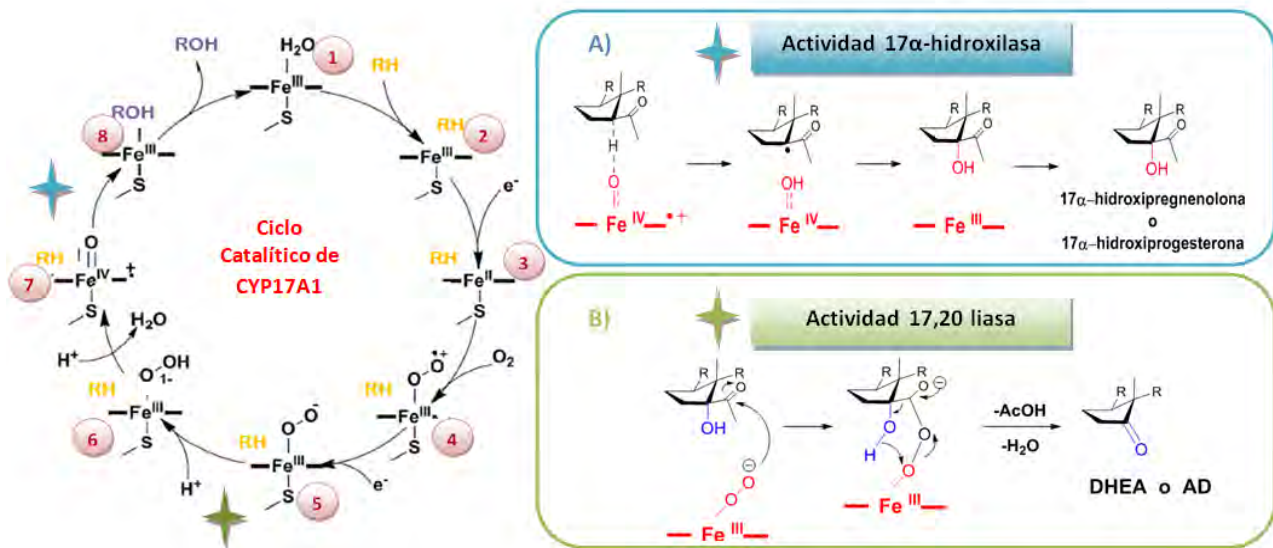
Figura 12. Fármacos empleados para el tratamiento de CPRC aprobados por la FDA.

## 2.4. CYP17A1: diana farmacológica contra CaP

El CYP17A1 es una enzima de la familia de citocromo P450 localizada en el retículo endoplasmático liso tanto en las glándulas suprarrenales, testículos, ovarios como en la placenta.<sup>30</sup> Es codificada por un único gen que se encuentra en el cromosoma 10 en los seres humanos<sup>43</sup> y cuenta con 508 aminoácidos.

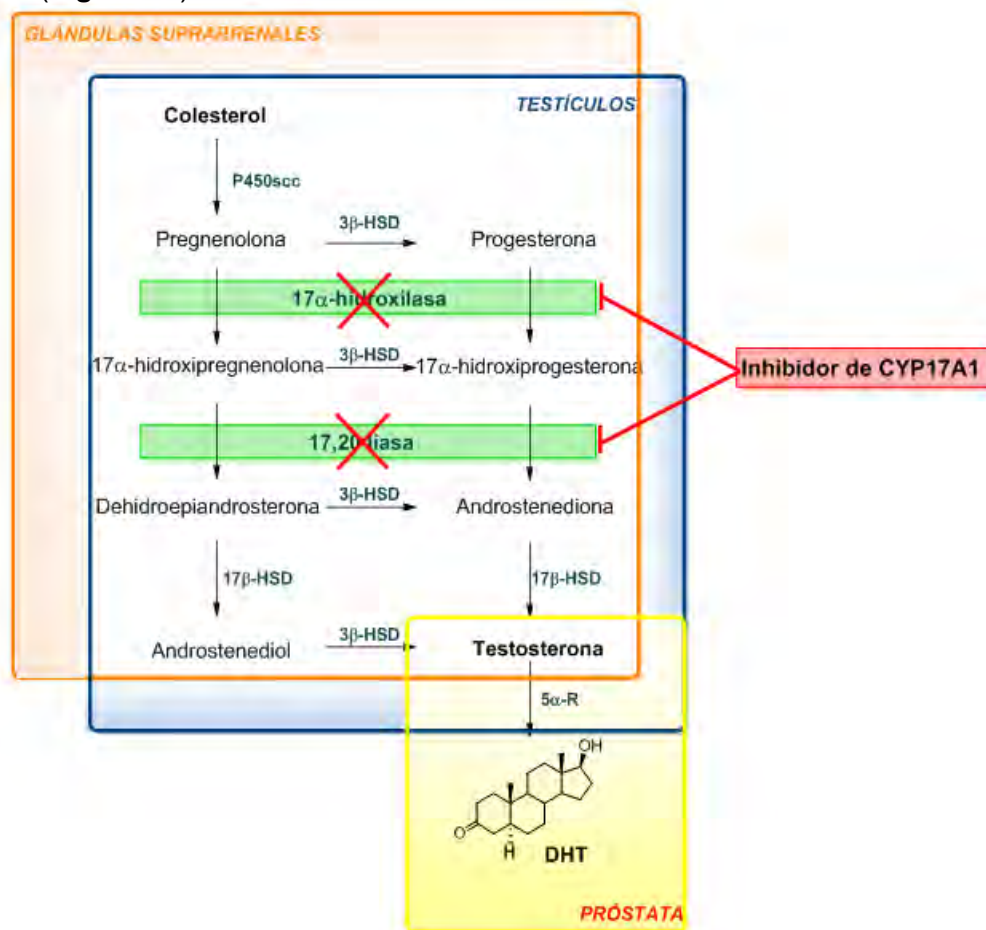
Esta enzima tiene un papel crucial en la estereoidogénesis debido a que se encuentra en el cruce de la biosíntesis de esteroides sexuales y glucocorticoides. De la misma manera, posee una actividad dual de C-17 hidroxilasa y C-17,20-liasa, y no obstante, participa en las vías  $\Delta^4$  y  $\Delta^5$  (**Figura 5, p. 8**).<sup>30</sup>

En ambas actividades catalíticas requiere una reductasa P450 para transferir electrones en presencia de NADPH, así como de un grupo prostético hemo en su sitio activo.<sup>30</sup> El grupo hemo está constituido de una protoporfirina quelatada a un átomo de Fe(III), el cual se mantiene unido covalentemente a la proteína mediante un átomo de azufre de una cisteína proximal.<sup>44</sup> Al igual que otras enzimas del citocromo P450, esta enzima funciona como una monooxigenasa mediante la activación y ruptura de  $O_2$ , de modo que uno de los oxígenos se inserta en el sustrato, mientras que el otro da lugar a una molécula de agua.<sup>38,45-47</sup> El mecanismo de la enzima se muestra en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Ciclo catalítico de CYP17A1. **Derecha:** 1) En estado basal, el agua se coordina al Fe (III). 2) El sustrato (RH) se une al sitio activo de la enzima. 3) Se desplaza la molécula de agua y el estado del hierro cambia de un bajo spin a un alto spin, lo cual facilita la transferencia de un electrón del NADPH reduciendo al hierro a Fe (II). 4) El  $O_2$  se une originando un complejo inestable oxi-P450. 5) El complejo se reduce a un intermediario peroxi-férrico. 6) Se protona la especie peroxi-férrica por moléculas de agua o residuos de aminoácidos presentes en el medio. 7) Liberación de una molécula de agua formando una oxo-especie muy reactiva con Fe(IV). 8) El sustrato es oxigenado y se libera el producto (ROH), regresando el hierro a su estado basal.<sup>38,47</sup> (En donde se muestra la cruz, es donde se lleva a cabo cada mecanismo). **Izquierda: A)** Mecanismo de  $17\alpha$ -hidroxilación (azul).<sup>46</sup> **B)** Mecanismo de 17,20 liasa (verde).<sup>46</sup> DHEA: Dehidroepiandrosterona. AD: Androstenediona.

Los ligandos naturales son pregnenolona y progesterona, las cuales se hidroxilan primero en la posición 17, y posteriormente, su cadena lateral se escinde para proporcionar los derivados dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona (AD) respectivamente (**Figura 5, p. 8**). Éstos a su vez, son precursores de T y DHT, los cuales se unen al RA y promueven la síntesis de proteínas, y por ende, la proliferación del CaP.<sup>38</sup> Por tanto, CYP17A1 se ha convertido en el blanco de interés para la inhibición sistémica de la producción de andrógenos (**Figura 14**).



**Figura 14.** Sitio de acción de un inhibidor de CYP17A1.

#### 2.4.1. Inhibidores de CYP17A1

Los primeros reportes sobre inhibidores de CYP17A1 fueron aproximadamente hace más de 40 años.<sup>48</sup> Éstos generalmente han sido estructuralmente categorizados como esteroideos o no esteroideos (**Figura 15**).

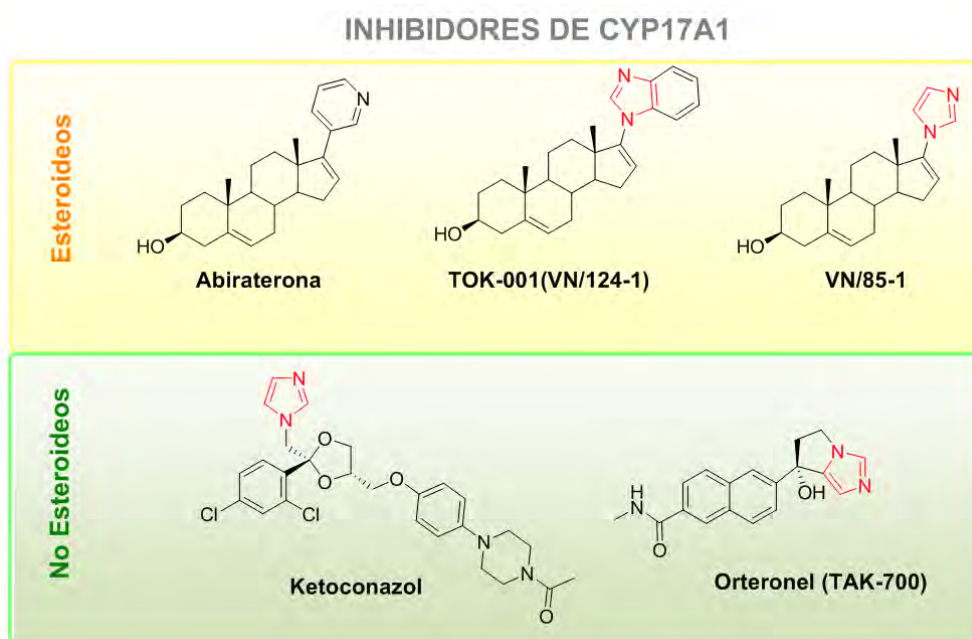


El principal inhibidor no esteroideo es el *Ketoconazol*, un antifúngico derivado de imidazol, el cual fue el primer inhibidor de CYP17A1 recetado en pacientes con CPRC.<sup>49</sup> Pero, debido a su falta de especificidad, el tratamiento con ketoconazol es limitado por su hepatotoxicidad.<sup>50</sup>

Por otra parte, los inhibidores esteroideos son similares en estructura a los sustratos naturales de CYP17A1, pregnenolona o progesterona, y con frecuencia implican la modificación del anillo D en la posición C-17 del núcleo esteroideal.<sup>33,38, 51,52</sup>

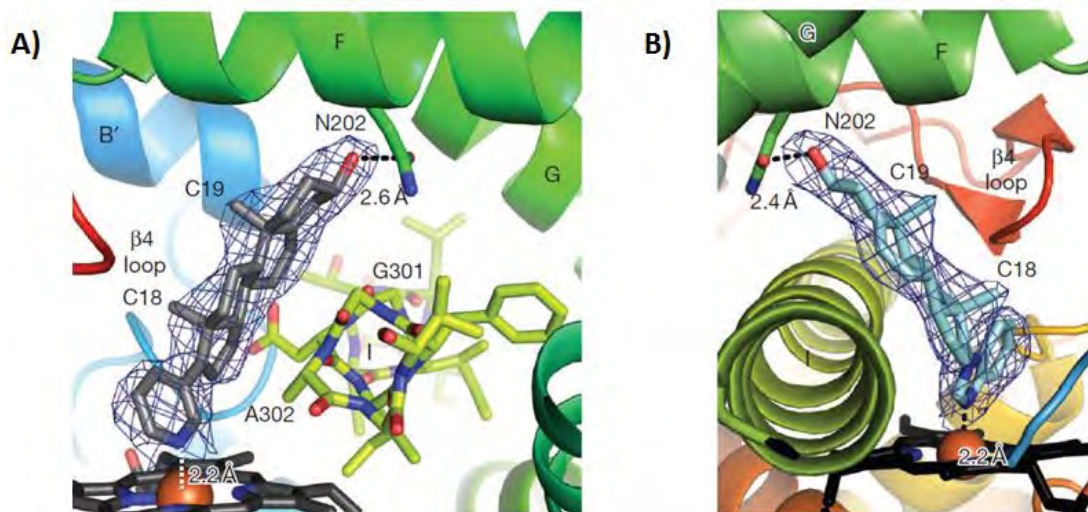
Un ejemplo de lo anterior es la *Abiraterona*, un fármaco que desde 2011 fue aprobado por la FDA para el tratamiento en pacientes con CPRC. La Abiraterona se basa en el núcleo de pregnenolona con un doble enlace  $\Delta^{16-17}$  adicional. Además, un grupo 3-piridilo sustituye el grupo acetilo de la pregnenolona en C-17. En estudios recientes, se observó que Abiraterona no es sólo un inhibidor de CYP17A1 más potente que el Ketoconazol, sino también posee una mayor especificidad frente a otras enzimas de la familia del CYP450, responsables de los efectos secundarios significativos de Ketoconazol.<sup>38,53</sup>

Otros inhibidores de CYP17A1 que han tenido resultados prometedores<sup>30</sup> son TOK-001 (VN/124-1),<sup>36,54</sup> VN/85-1 y orteronel (TAK-001).<sup>36,45,55</sup> Cabe señalar que se ha observado la incidencia del núcleo de imidazol en sus estructuras (**Figura 15**), así como en otros derivados del imidazol y piridina que han tenido actividad contra CYP17A1.<sup>38,56</sup>



**Figura 15.** Inhibidores de CYP17A1 y la incidencia del núcleo de imidazol en sus estructuras.

Asimismo, la introducción de heterociclos en moléculas es una estrategia de uso común en el descubrimiento de fármacos y el diseño de potentes inhibidores esteroideos de CYP17A1. De hecho, se ha demostrado que el nitrógeno del heterociclo forma un enlace covalente coordinado con el hierro del grupo hemo bloqueando la unión del sustrato endógeno (**Figura 16**).<sup>57</sup> Los heterociclos que contienen nitrógeno  $sp^2$  han mostrado ser los grupos de coordinación más eficaces,<sup>38,58</sup> por ejemplo el imidazol.



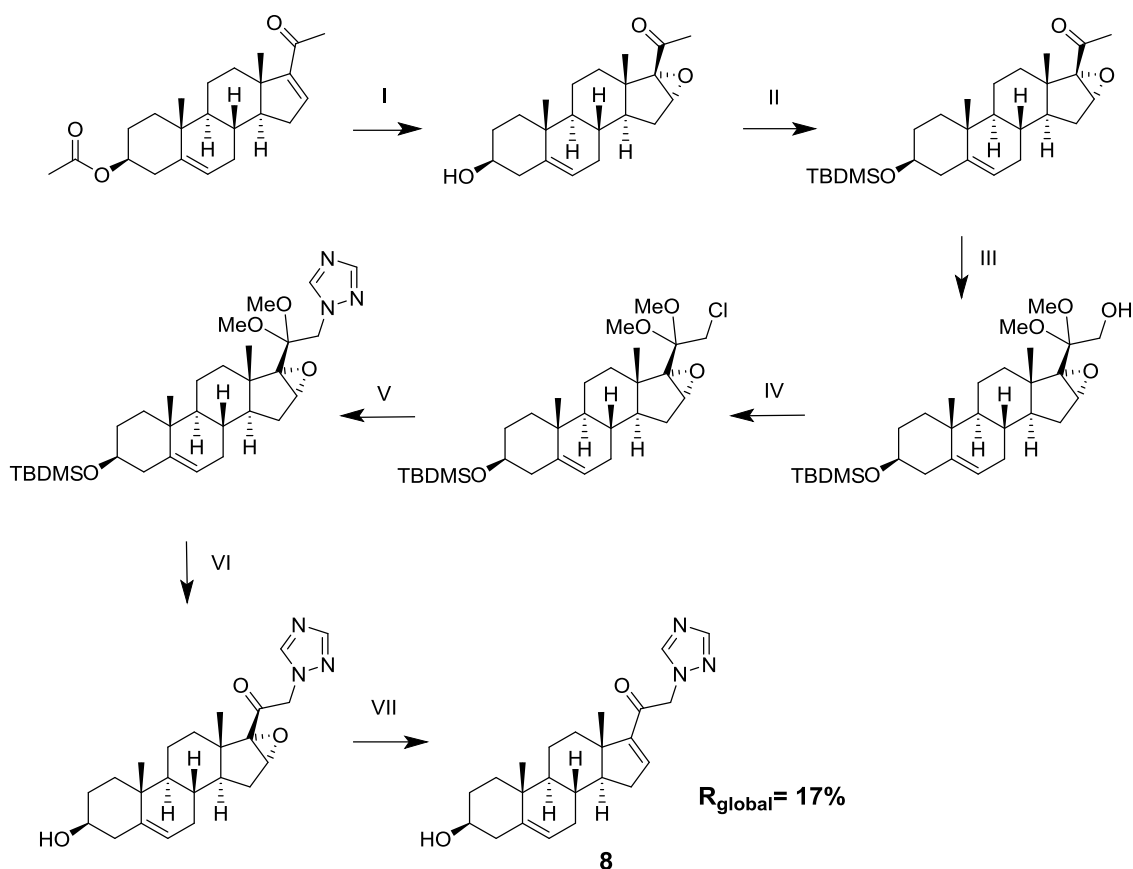
**Figura 16.** Cristalografía de rayos X de la enzima CYP17A1 co-cristalizada con **(A)** Abiraterona (gris) y **(B)** TOK-001 (azul cielo). Se observa el enlace covalente que forma el N (azul) de ambos compuestos con el hierro (naranja) del grupo hemo (negro). (Figura tomada y modificada de DeVore & Scott, 2012).<sup>47</sup>

Njar et al. fue de los primeros en sintetizar inhibidores esteroideos de CYP17A1 con un heterociclo en C-17 (e. g. Galaterona (TOK-001) y VN/85-1), así como de proponer el posible mecanismo de inhibición de la enzima.<sup>59,60</sup>

No obstante, también se ha demostrado que el doble enlace  $\Delta^{16-17}$  puede aumentar significativamente la potencia inhibidora, ya que los compuestos con el doble enlace fueron más potentes en comparación con sus análogos sin doble enlace.<sup>38,61</sup>

### 3. JUSTIFICACIÓN

Considerando los derivados esteroidales  $\Delta^{16-17}$ -azolil del grupo de trabajo de Njar et al.,<sup>59,60</sup> en el grupo de investigación del Dr. E. Bratoeff<sup>†</sup> se han sintetizado derivados del pregnano con una función triazol en C-21 siguiendo el **Esquema 1** de reacción.<sup>62,63</sup> Dichos compuestos presentaron una actividad antiproliferativa significativa en líneas celulares cancerosas PC-3, MCF-7 y SKLU,<sup>9</sup> en particular el compuesto **8**.



**Esquema 1.** Ruta sintética para derivados del pregnano con un triazol en C-21. **I)**  $H_2O_2$ , NaOH, MeOH; **II)** TBDMS-Cl, imidazol, DMF; **III)**  $PhI(AcO)_2$ , NaOH, MeOH,  $CH_2Cl_2$ ; **IV)**  $SOCl_2$ , Py,  $CH_2Cl_2$ ; **V)** 1,2,4-triazol,  $K_2CO_3$ , DMF; **VI)** HCl concentrado, acetona; **VII)**  $CrCl_2$ , AcOH.

No obstante, la inserción de grupos funcionales en C-21 ha sido poco explorada como posibles inhibidores de CYP17A1, considerando que los ligandos naturales de la enzima, pregnenolona y progesterona, están basados en el núcleo del pregnano (21 átomos de carbono).

---

Por ello, el objetivo de este proyecto fue retomar el compuesto **8** con una función imidazol en C-21 para evaluar si la sustitución de un triazol por imidazol modifica la actividad antiproliferativa.

Se optó por el imidazol basándose en la incidencia de este heterociclo en las estructuras de inhibidores de CYP17A1 (**Figura 15**), diseñándose este nuevo compuesto como un posible inhibidor de CYP17A1. Para ello, se propuso la realización de estudios de acoplamiento molecular en la enzima CYP17A1 para observar el comportamiento de este compuesto, así como sus intermediarios funcionalizados en 21, con la enzima.

De igual manera, se pretende funcionalizar la posición del carbono 3 con ésteres de benzoilo, ya que en trabajos previos se ha observado que la introducción de ésteres en C-3 incrementa la permeabilidad de estos compuestos a través de la membrana celular, lo que favorece su interacción con la diana farmacológica. Por otra parte, se observará si la inserción de sustituyentes en la posición *para* de los ésteres de benzoilo influyen en la actividad antiproliferativa.

Además, considerando que la ruta de síntesis presentada en el **Esquema 1** requiere de varios pasos de reacción, en el presente trabajo se pretende optimizarla.

---

## 4. HIPÓTESIS

Los nuevos derivados del pregnano diseñados y funcionalizados en C-3 y C-21 mostrarán en estudios de acoplamiento molecular energías de unión favorables sobre el sitio de unión en la enzima CYP17A1 y presentarán actividad antiproliferativa en la línea celular PC-3.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Diseñar, sintetizar y evaluar la actividad antiproliferativa de nuevos derivados de pregnano funcionalizados en C-3 y C-21.

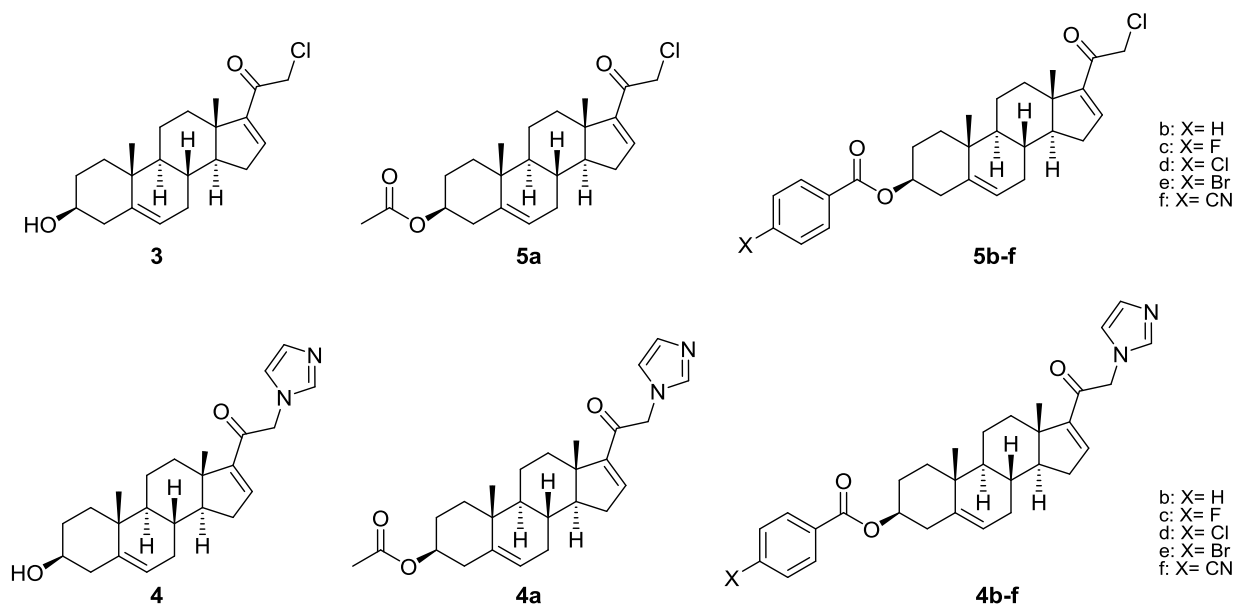
### 5.2. Objetivos particulares

- Realizar estudios de acoplamiento molecular sobre la enzima CYP17A1 para el diseño de nuevos compuestos derivados del pregnano funcionalizados en C-3 y C-21 con posible actividad biológica.
- Sintetizar y optimizar la ruta de síntesis de los nuevos derivados del pregnano funcionalizados en C-3 y C-21.
- Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de la nueva serie de compuestos en la línea celular cancerosa PC-3.
- Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de la serie de compuestos sintetizados en HGF (fibroblastos gingivales humanos).

## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 6.1. Análisis Computacional

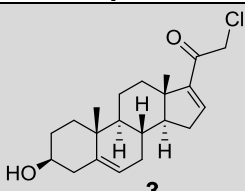
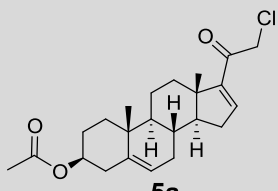
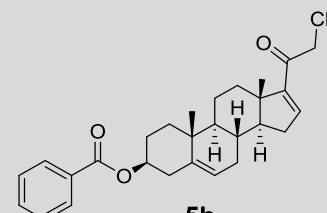
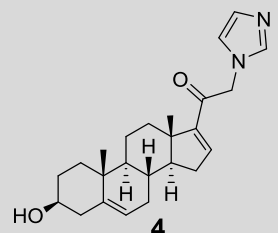
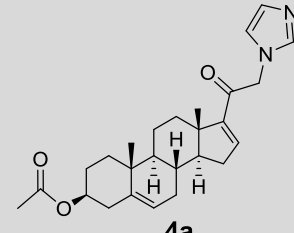
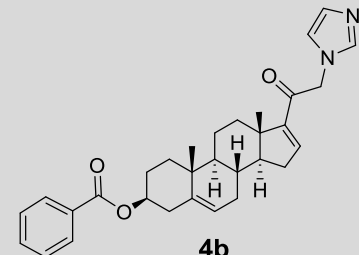
En el presente trabajo se realizó la exploración de derivados del pregnano funcionalizados en C-3 y C-21 (**Figura 17**) como inhibidores de la enzima CYP17A1. La primera parte de este trabajo se enfocó en el análisis y predicción de dicha actividad *in silico* mediante el servidor en línea Swiss Target Prediction ([www.swisstargetprediction.ch/](http://www.swisstargetprediction.ch/)), así como la búsqueda de nuevas dianas afines a la serie de compuestos sugeridos para sintetizar.



**Figura 17.** Derivados del pregnano funcionalizados en C-3 y C-21.

Según los resultados arrojados por el servidor (**Tabla 1**), las posibles dianas biológicas de la serie de compuestos con mayor incidencia fueron las enzimas CYP17A1 (17 $\alpha$ -hidroxilasa; 17,20 liasa) y CYP19 (aromatasa). Ambas enzimas participan en la estereoidogénesis y tienen en común el grupo prostético hemo para poder llevar a cabo su función. No obstante, se observa una mayor probabilidad de que los nuevos derivados presentan mejor actividad sobre CYP17A1 en comparación con CYP19, por lo que se decidió realizar el acoplamiento molecular en CYP17A1.

Tabla 1. Resultados de las posibles dianas farmacológicas de los compuestos de interés

Compuesto	Resultados Swiss Target Prediction						
 <p>3</p>	Target	Uniprot ID	Gene code	ChEMBL ID	Probability	# sim. cmpds (3D / 2D)	Target Class
	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	P05093	CYP17A1	CHEMBL3522		48 / 53	Enzyme
	Cytochrome P450 19A1	P11511	CYP19A1	CHEMBL1978		24 / 164	Enzyme
 <p>5a</p>	Target	Uniprot ID	Gene code	ChEMBL ID	Probability	# sim. cmpds (3D / 2D)	Target Class
	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	P05093	CYP17A1	CHEMBL3522		32 / 15	Enzyme
	Cytochrome P450 19A1	P11511	CYP19A1	CHEMBL1978		36 / 60	Enzyme
 <p>5b</p>	Target	Uniprot ID	Gene code	ChEMBL ID	Probability	# sim. cmpds (3D / 2D)	Target Class
	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	P05093	CYP17A1	CHEMBL3522		15 / 7	Enzyme
	Cytochrome P450 19A1	P11511	CYP19A1	CHEMBL1978		41 / 26	Enzyme
 <p>4</p>	Target	Uniprot ID	Gene code	ChEMBL ID	Probability	# sim. cmpds (3D / 2D)	Target Class
	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	P05093	CYP17A1	CHEMBL3522		62 / 23	Enzyme
	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	P28845	HSD11B1	CHEMBL4235		107 / 11	Enzyme
 <p>4a</p>	Target	Uniprot ID	Gene code	ChEMBL ID	Probability	# sim. cmpds (3D / 2D)	Target Class
	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	P05093	CYP17A1	CHEMBL3522		11 / 15	Enzyme
	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	P28845	HSD11B1	CHEMBL4235		54 / 8	Enzyme
 <p>4b</p>	Target	Uniprot ID	Gene code	ChEMBL ID	Probability	# sim. cmpds (3D / 2D)	Target Class
	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	P05093	CYP17A1	CHEMBL3522		1 / 8	Enzyme
	Cytochrome P450 19A1	P11511	CYP19A1	CHEMBL1978		4 / 5	Enzyme

*Target*: diana biológica. *Uniprot ID*: código en la base de datos de Uniprot. *Gene code*: gen de la proteína diana. *ChEMBL ID*: enlace a las entradas en ChEMBL de ligandos con similitud a la molécula de consulta. *Probability*: probabilidad de que la molécula sea activa sobre esa diana. *# sim. Cmpds*: número de ligandos hacia la diana predicha o sus análogos que muestran similitud con la molécula de consulta basada en medidas de similitud en 2D o 3D. *Target class*: tipo de diana biológica.

---

Se puede observar en los resultados de la **Tabla 1** que los compuestos con mayor probabilidad de ser activos en la enzima CYP17A1 son **5a** (85%), **3** (80%) y **4** (60%). Para los compuestos **4a** y **5b** la probabilidad es menor al 50% (45% y 40%, respectivamente). Mientras que en el caso del compuesto **4b** la probabilidad es muy baja del 17.5%.

Cabe mencionar que se hicieron los análisis de los compuestos **4c-4f** y **5c-5f** con diferentes sustituyentes en la posición *para* del éster de benzoilo, sin embargo no se observó diferencia significativa en la probabilidad de ser activos sobre alguna de las dianas antes mencionadas, esto puede deberse a la similitud de su análogo sin sustituyente (**4b**).

De manera general, con base en los resultados del servidor, los compuestos sustituidos con un átomo de cloro en C-21 su probabilidad (85-40%) es mayor para que actúen como inhibidores irreversibles de la enzima en comparación con los que tienen el imidazol en la misma posición (60-17%). Con respecto a la posición C-3, aquellos que tienen el alcohol libre o contienen el acetato (85 y 45% respectivamente) son más potentes que los ésteres de benzoilo (40-17%).

Para validar esta información, se realizó un estudio de acoplamiento molecular con la enzima CYP17A1 (PDB: 4NKV) para cada uno de los compuestos.

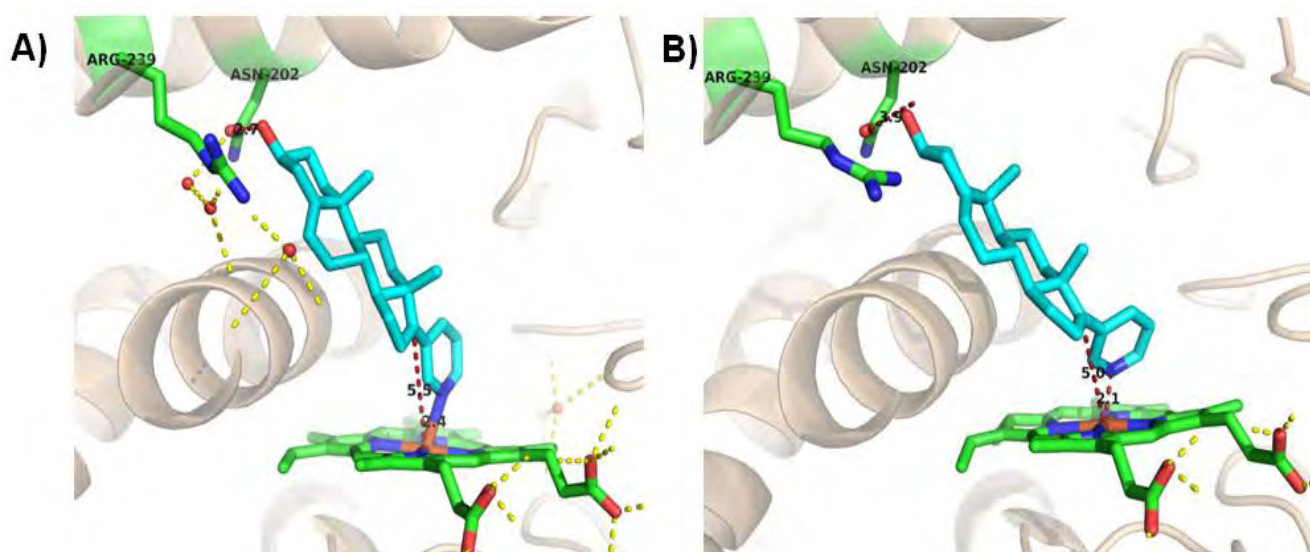
La validación del estudio de acoplamiento molecular se realizó acoplando la Abiraterona en la enzima previamente preparada en el servidor en línea YASARA ([www.yasara.org/](http://www.yasara.org/)) para la optimización de su energía, obteniendo un valor de RMSD de 0.45 Å.

Así también, se hizo la correlación de la Abiraterona co-cristalizada con la enzima CYP17A1 (cristalografía de rayos X) y la Abiraterona acoplada a la enzima con las condiciones del acoplamiento molecular; en ella se puede observar que tanto la disposición en el espacio de la Abiraterona en el sitio de unión, así como los residuos de aminoácidos con los que interactúa (Asn-202), son los mismos. Para el caso de las distancias de las interacciones de C-17 y el nitrógeno de la piridina al hierro del grupo hemo (5.5 y 5.0 Å), así como del alcohol de C-3 a la asparagina 202 (2.4 y 2.1 Å), son aproximadas entre sí (**Figura 18, Tabla 2**), tomando en cuenta que la proteína fue solvatada en el servidor YASARA.



**Tabla 2.** Comparación de distancias de las interacciones de la Abiraterona con la enzima CYP17A1 entre la cristalografía de rayos X y el acoplamiento molecular

Interacción	Interacción Abiraterona con enzima CYP17A1	
	Distancia en la cristalografía de rayos X	Distancia en el acoplamiento molecular
C-17 con Fe del grupo hemo	5.5 Å	5.0 Å
N de piridina con Fe del grupo hemo	2.4 Å	2.1 Å
OH de C-3 con Asp-202	2.7 Å	3.9 Å



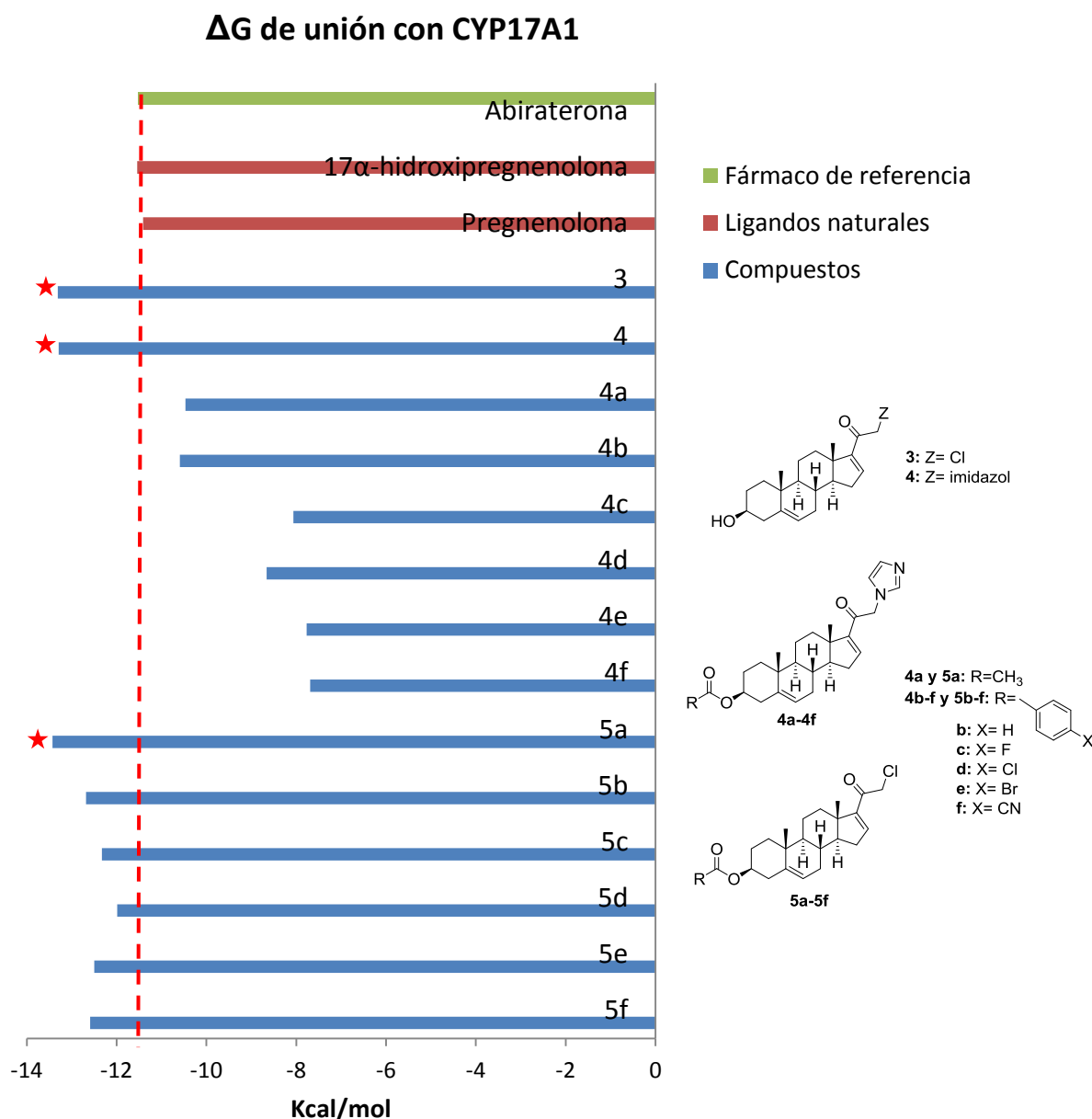
**Figura 18.** Comparación entre la Abiraterona co-cristalizada con la enzima CYP17A1 (A) y los resultados del acoplamiento molecular (B). Las líneas punteadas en rojo indican las distancias en Å y las líneas amarillas los puentes de hidrógeno.

Posteriormente, en los resultados de acoplamiento molecular (**Tabla 3, Figura 19**) de los compuestos propuestos, se observó que los derivados que contienen un átomo de cloro en C-21 (**3, 5a-5f**) mostraron una mayor energía de unión a la enzima (de -13.43 a -11.99 Kcal/mol) en comparación con la Abiraterona (-11.53 Kcal/mol) y los ligandos naturales (-11.41 y -11.54 Kcal/mol), destacando **5a** con un valor de energía de unión de -13.43 Kcal/mol.

Por su parte, el compuesto **4**, con un núcleo de imidazol en C-21 y alcohol libre en C-3, también presentó una energía de unión a la enzima (-13.29 Kcal/mol) superior a la de la Abiraterona. En contraste, los compuestos esterificados en C-3 con ésteres de benzoilo y

con imidazol en C-21 (**4a-4f**) presentaron una energía de unión menor al fármaco de referencia.

Cabe resaltar que estos datos coincidieron con las tendencias obtenidas por el servidor Swiss Target Prediction.



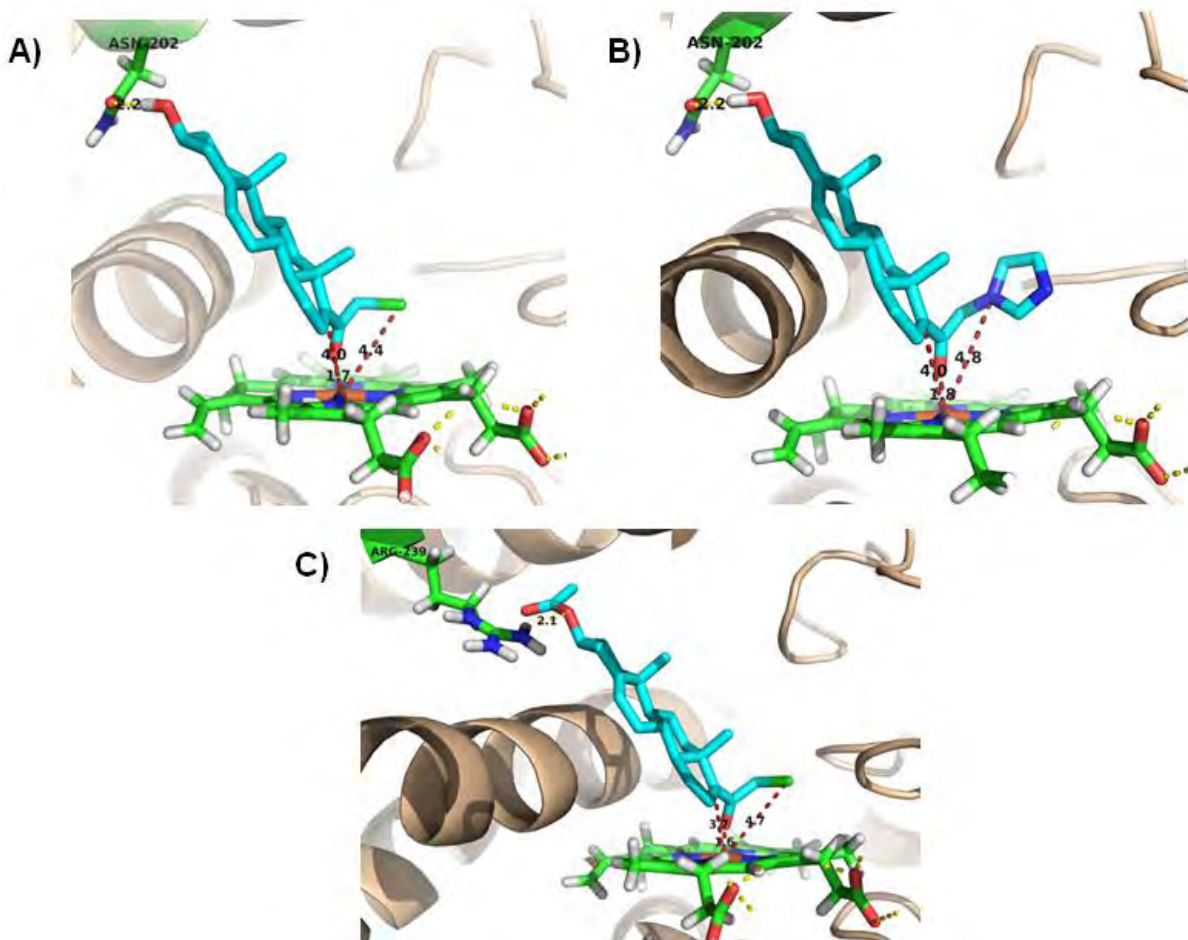
**Figura 19.** Gráfica de la energía de unión de la serie de compuestos con la enzima CYP17A1 en el acoplamiento molecular. Los compuestos marcados con una estrella fueron aquellos con mejor energía de unión a la enzima.

Tabla 3. Resultados del estudio de acoplamiento molecular de la serie de compuestos

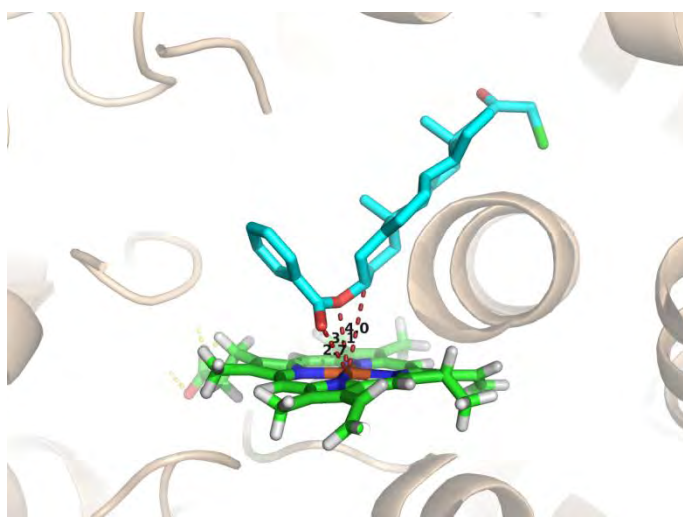
Compuesto	Energía de Unión (Kcal/mol)	Clusters	Interacciones de tipo puentes de hidrógeno
<i>Abiraterona</i>	-11.53	49/50	-----
<i>Pregnenolona</i>	-11.41	50/50	OH de C-3 con Asn-202 (2.4 Å)
<i>17α-hidroxipregnenolona</i>	-11.54	50/50	OH de C-3 con Asn-202 (2.3 Å)
<b>3*</b>	<b>-13.31</b>	50/50	OH de C-3 con Asn-202
<b>4*</b>	<b>-13.29</b>	50/50	OH de C-3 con Asn-202
<b>4a</b>	-10.47	24/50	O de C-3 con Arg-239 N-3 del imidazol con Leu-214
<b>4b</b>	-10.59	10/50	C=O de C-20 con Arg-239
<b>4c</b>	-8.06	10/50	N-3 del imidazol con Arg-125
<b>4d</b>	-8.66	11/50	N-3 del imidazol con Phe-435
<b>4e</b>	-7.77	10/50	C=O del éster con Phe-435
<b>4f</b>	-7.69	8/50	C=O del éster con Phe-435
<b>5a*</b>	<b>-13.43</b>	31/50	O de C-3 con Arg-239
<b>5b</b>	-12.68	31/50	-----
<b>5c</b>	-12.33	24/50	-----
<b>5d</b>	-11.99	14/50	C=O de C-20 con Arg-239
<b>5e</b>	-12.50	17/50	C=O de C-20 con Arg-239
<b>5f</b>	-12.59	23/50	C=O de C-20 con Arg-239 El sustituyente CN con Val-215

\* Compuestos con mayor energía de unión a la enzima.

De igual manera, en estos compuestos se observó que la parte de la molécula que interacciona con el grupo hemo de la enzima es el oxígeno del carbonilo de C-20 (~1.6-1.8 Å) como se muestra en la **Figura 20**, y no el sustituyente de C-21 (~4.4-4.8 Å). Los compuestos **3** y **4** mostraron un puente de hidrógeno con la Asn-202 a la misma distancia (~2.2 Å), que los ligandos naturales (**Tabla 3**).

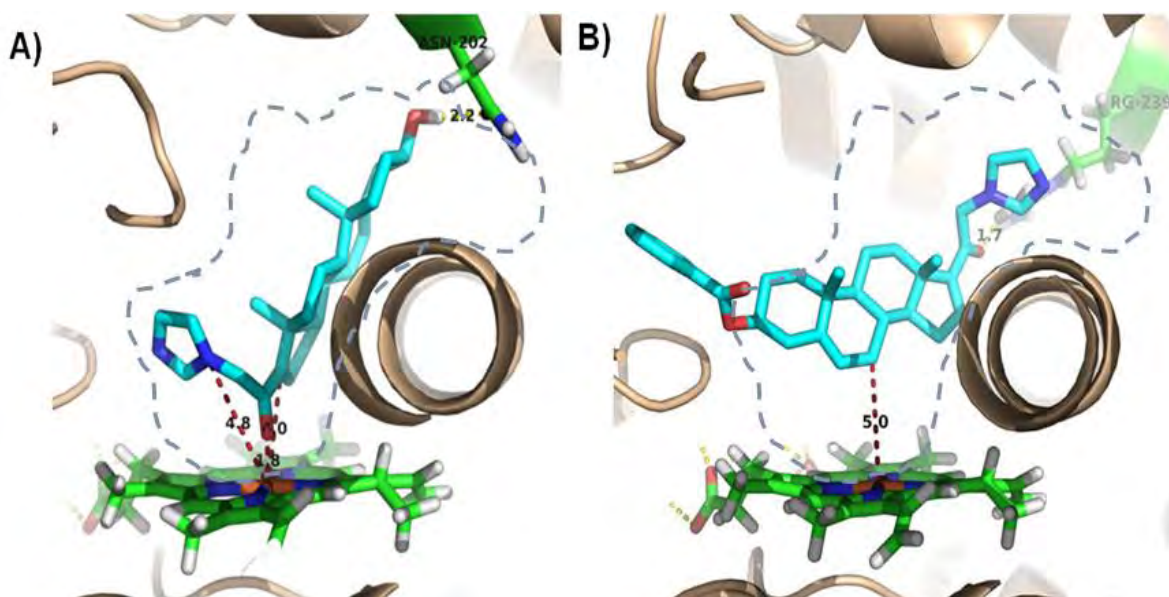


**Figura 20.** Interacción de los compuestos con mayor energía de unión con la enzima CYP17A1. **A)** Compuesto **3** (puente de hidrógeno con Asn-202, 2.2 Å). **B)** Compuesto **4** (puente de hidrógeno con Asn-202, 2.2 Å). **C)** Compuesto **5a** (puente de hidrógeno con Arg-239, 2.1 Å). Las líneas punteadas en rojo indican las distancias en Å y las líneas amarillas los puentes de hidrógeno.



**Figura 21.** Interacción del compuesto **5b** con la enzima CYP17A1. Distancia de C-3 a Fe: 4.0 Å. Distancia de O de éster a Fe: 3.1 Å. Distancia de C=O de éster a Fe: 2.7 Å.

En la **Figura 22** se puede visualizar que los derivados con ésteres de benzoilo en C-3 y una molécula de imidazol en C-21 (**4b-4f**) sufren un efecto de impedimento estérico debido a su volumen, por lo cual, no caben en el pocket de la enzima y conlleva a un decaimiento en la energía de unión (**Figura 19**) en comparación con **4**, que tiene el alcohol libre en posición C-3.



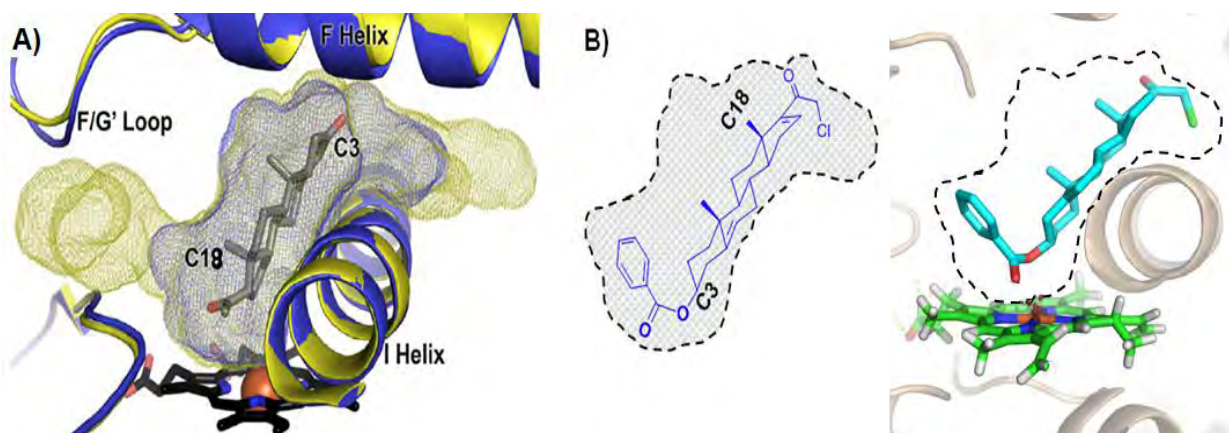
**Figura 22.** Comparación de los derivados del pregnano con un imidazol en C-21 entre el compuesto con el alcohol libre (**A**) y con un éster de benzoilo (**B**) en C-3.  
**A)** Compuesto **4** (puente de hidrógeno con Asn-202, 2.2 Å). **B)** Compuesto **4b** (puente de hidrógeno con Arg-239, 1.7 Å). Las líneas punteadas en rojo indican las distancias en Å, las líneas amarillas los puentes de hidrógeno y las líneas grises el pocket de la enzima.

Para la serie **5b-5f**, que tiene un átomo de cloro en C-21, en la **Figura 21** se puede visualizar que estos sí caben en el pocket de la enzima, e incluso, presentan una energía de unión superior a la serie **4** (**Figura 19**). Esto puede explicarse desde un punto de vista de similitud en el modo de acoplamiento entre estos derivados y los sustratos naturales, aunque se observó que la parte de la molécula que interactúa con el grupo hemo de la enzima es el éster en C-3 y no la parte de C-20 como se había observado en los sustratos naturales y en los compuestos con mayor energía de unión.

Esto puede relacionarse con la cavidad del sitio activo de la enzima (**Figura 23**). En 2014 Petrunak et al.<sup>64</sup> reportaron las cavidades del sitio activo de la enzima correspondientes a la

unión de ésta con sus ligandos naturales.<sup>64</sup> En **A** de la **Figura 23**, se observa que este espacio abarca de la región F/G' hasta el espacio entre las hélices F e I. Los autores proponen que modificaciones en C-3 o en C-18 del esqueleto del pregnano podrían ocupar mayor parte del sitio activo de la enzima; sin embargo, las modificaciones estructurales también podrían hacerse en C-21, tal como en el compuesto **4**. Eso explicaría el acomodo que presenta el imidazol (**Figura 22A**), ya que no se observó una interacción directa con el hierro del grupo hemo como se esperaba que sucediera, puesto que fue el carbonilo en C-20 el que interactuó con este átomo. Lo mismo ocurrió con la sustitución del cloro en C-21 en los compuestos **3** y **5a**.

En el caso de compuestos **5b-5f**, debido a que la conformación del éster en C-3 es más estable en posición beta, la molécula tiene una conformación de menor energía con el éster orientado a la región F/G' (**Figura 21** y **23B**), adoptando el acomodo diferente en comparación a los compuestos que no poseen ésteres de benzoilo.

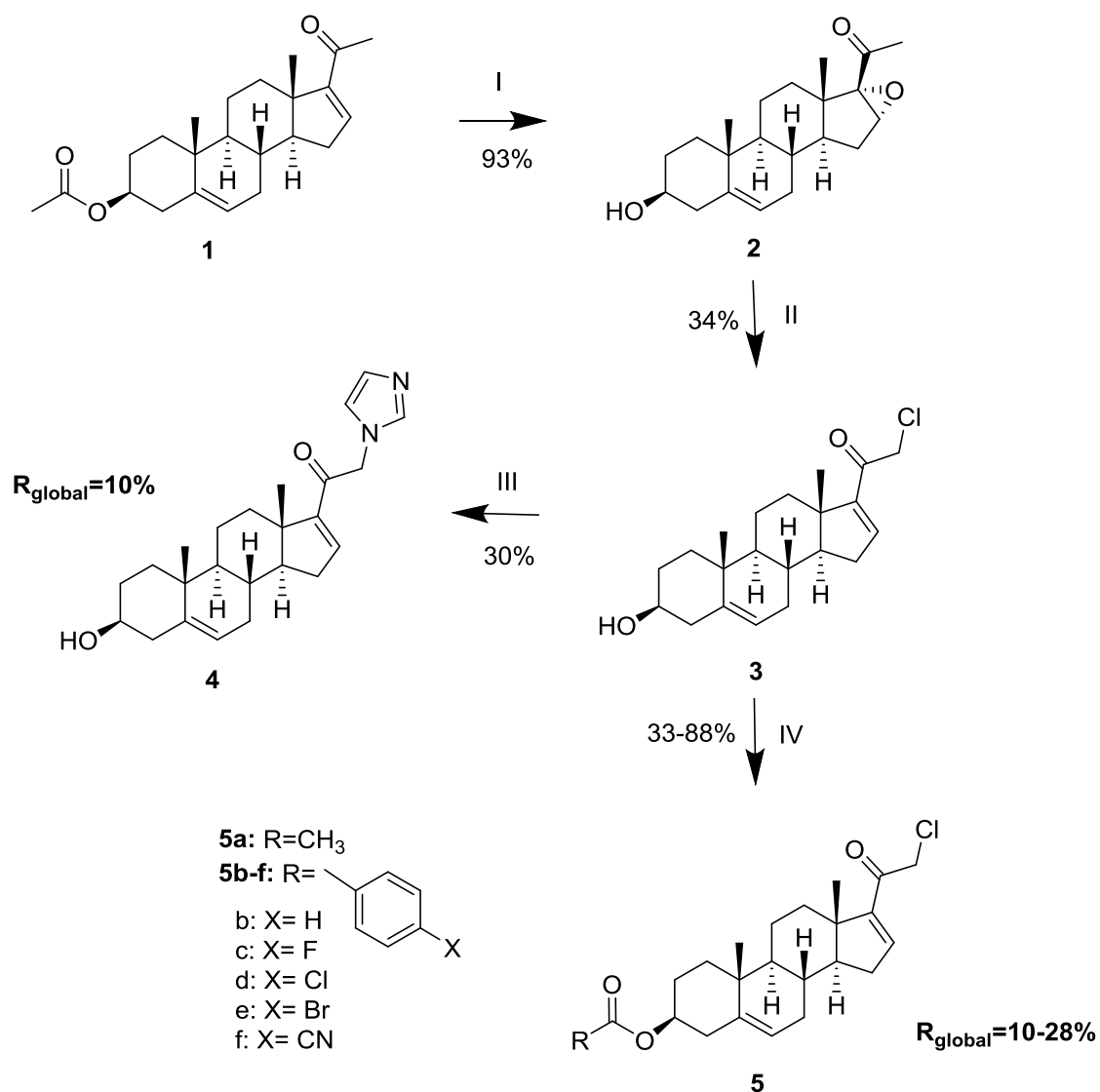


**Figura 23.** A) Cavidades de los sitios activos de la enzima CYP17A1 con respecto al volumen ocupado por sus ligandos naturales. *Malla azul*: cavidad ocupada por la progesterona. *Malla amarilla*: cavidad ocupada por la 17 $\alpha$ -hidroxiprogestero. Aunque la abiraterona ocupa una mínima parte de todo el sitio activo, el volumen es similar al de la malla azul. (Figura tomada y modificada de Petrunak, 2014).<sup>64</sup>  
B) Propuesta del acomodo del compuesto **5b** en la cavidad del sitio activo de la enzima.

Con base en los resultados anteriores, tanto del servidor Swiss Target Prediction como del estudio de acoplamiento molecular, se decidió darle prioridad a la síntesis de los compuestos **3**, **4** y la serie de compuestos **5a-f**, descartando por el momento la serie **4a-f**.

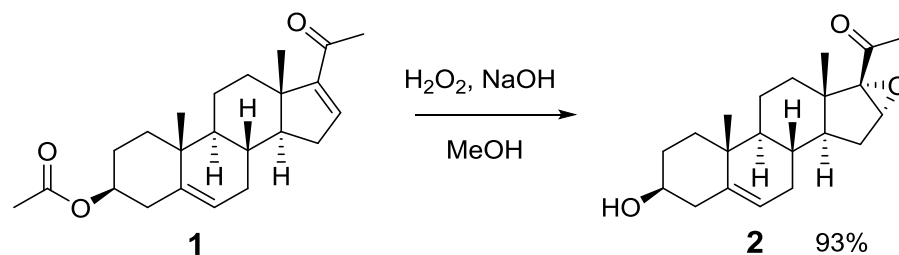
## 6.2. Análisis Químico

De todos los compuestos analizados en la parte computacional, se decidió sintetizar los compuestos **3**, **4** y la serie **5a-f**. Para ello, se siguió la ruta del **Esquema 2**, la cual disminuye el número de intermediarios, mejora la economía atómica, genera menor cantidad de residuos y es menos costosa que la ruta sintética propuesta en los antecedentes (**Esquema 1**, p 22).



**Esquema 2.** Ruta sintética para derivados del pregnano funcionalizados en C-3 y C-21. I) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaOH, MeOH; II) HCl, MeOH; III) KI, imidazol, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN; IV) a) Ac<sub>2</sub>O, Py; b) RCOOH, DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

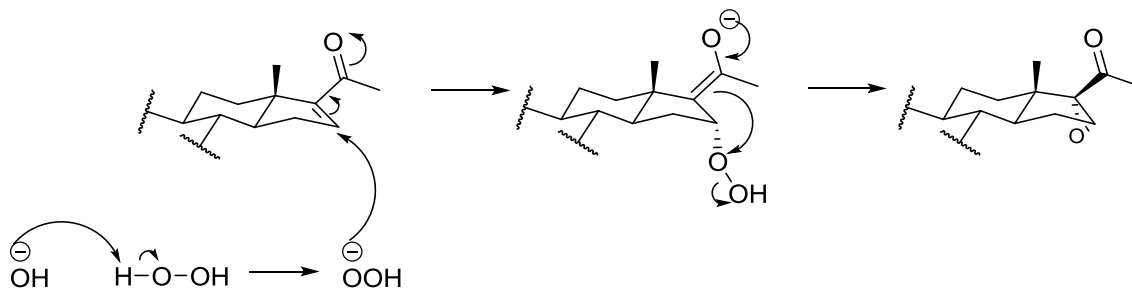
### 6.2.1. Síntesis de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxipregn-5-en-20-ona (2)



Esquema 3. Reacción de epoxidación en C-16 y C-17.

La primera reacción de la ruta sintética fue la epoxidación en la posición C16-C17. Esta reacción partió del acetato de 16-dehidropregnenolona, el cual posee dos dobles enlaces que pueden epoxidarse; sin embargo, en presencia de peróxido de hidrógeno e hidróxido de sodio, la reacción ocurre quimiosselectivamente en las posiciones C16-C17 y no en C5-C6 debido a la naturaleza de cada insaturación. El doble enlace en C5-C6 es de carácter nucleofílico, mientras que el de C16-C17 es de carácter electrofílico debido al sistema  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado del que forma parte.

De esta manera, el hidróxido abstrae un protón del peróxido formándose el anión hidroperóxido ( $\text{OOH}^-$ ), este último al ser un nucleófilo blando, hace una adición 1,4 tipo Michael sobre el carbono  $\beta$  del sistema conjugado por la cara  $\alpha$  del esteroide, puesto que el metilo angular de C-18 impide estéricamente a que la adición se dé por la cara  $\beta$ . Finalmente, el enolato formado ataca al oxígeno del hidroperóxido para formar el epóxido (Esquema 4).

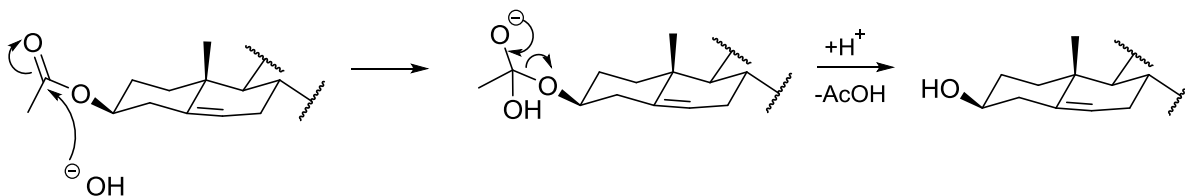


Esquema 4. Mecanismo de reacción de la epoxidación en C-16 y C-17.



---

Asimismo, la hidrólisis del acetato en medio básico también se lleva a cabo gracias a que el hidróxido es una base fuerte y nucleofílica. El mecanismo se muestra en el **Esquema 5**.

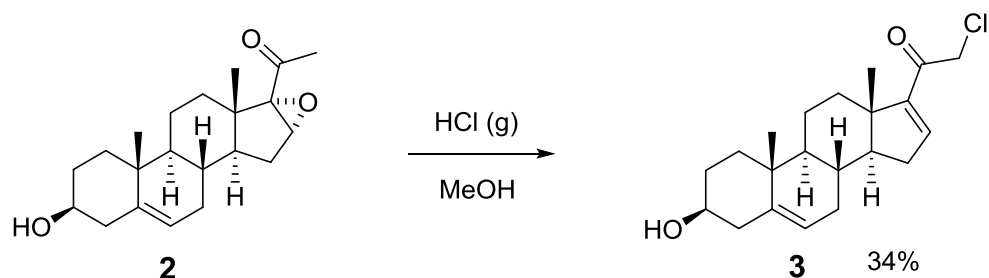


**Esquema 5.** Mecanismo de reacción de la hidrólisis del acetato en C-3 en medio básico.

La obtención del compuesto **2** se pudo corroborar por las señales en RMN de  $^1\text{H}$ -16 y  $^{13}\text{C}$ -16, las cuales se desplazaron a campo alto de 6.70 y 144.5 ppm a 3.67 y 60.5 ppm, respectivamente, indicando la presencia del epóxido. Igualmente, las señales correspondientes a H-3 y C-3 se desplazaron de 4.59 y 73.9 ppm a 3.50 y 71.6 ppm, respectivamente, mostrando la hidrólisis del acetato.

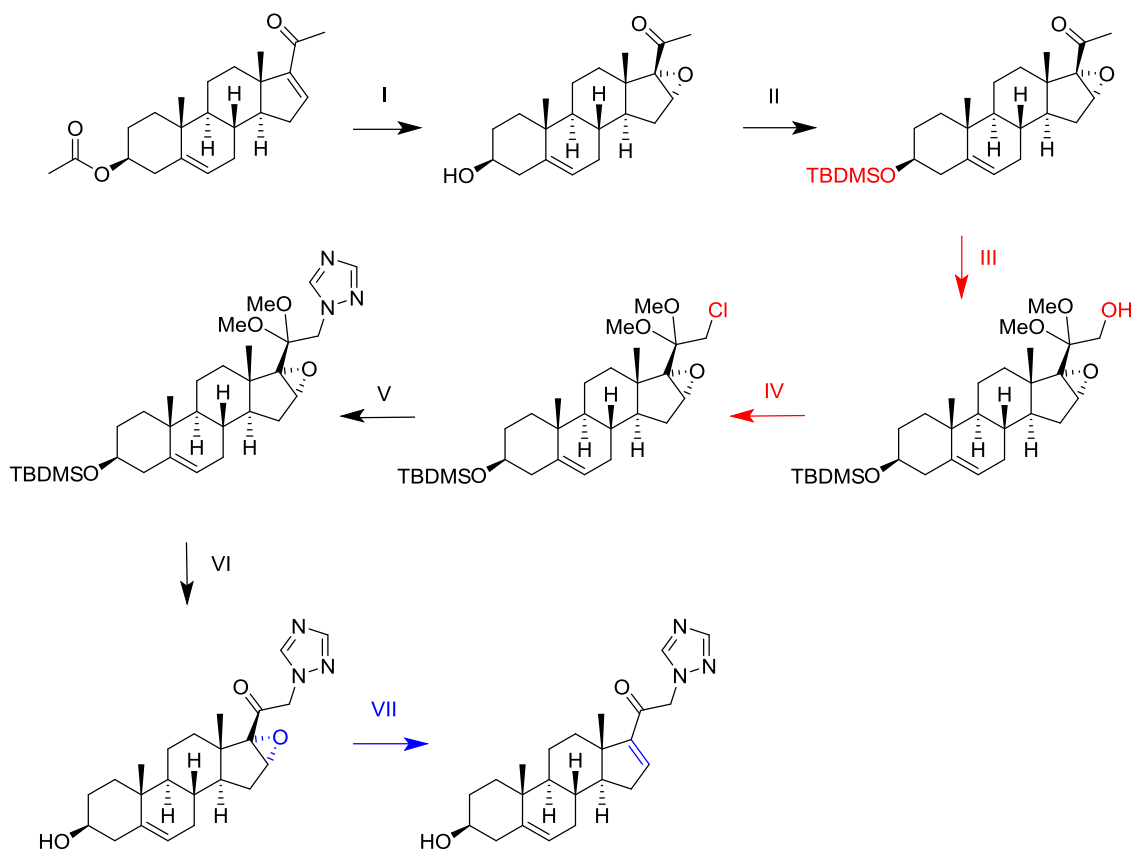
En IR se observó una banda ancha en  $3343\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al alcohol en C-3 y una banda en  $1054\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento C-O. Finalmente, en EM se confirmó el  $[\text{M} + \text{H}]^+$  en  $m/z$  331.

### 6.1.1. Síntesis de 21-cloro-3 $\beta$ -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (3)



**Esquema 6.** Reacción para la cloración en C-21 y la formación de la insaturación en C-16 y C-17 reportada por Girdhar e Ishar.<sup>64</sup>

La reacción de cloración en C-21 y formación de la insaturación en C-16 y C-17 es una reacción reportada por Girdhar e Ishar en 2002,<sup>64</sup> en la cual se clora directamente la posición C-21 sin pasar por el intermediario que contiene el alcohol en C-21 (como en el **Esquema 7**), y además, se elimina el epóxido.

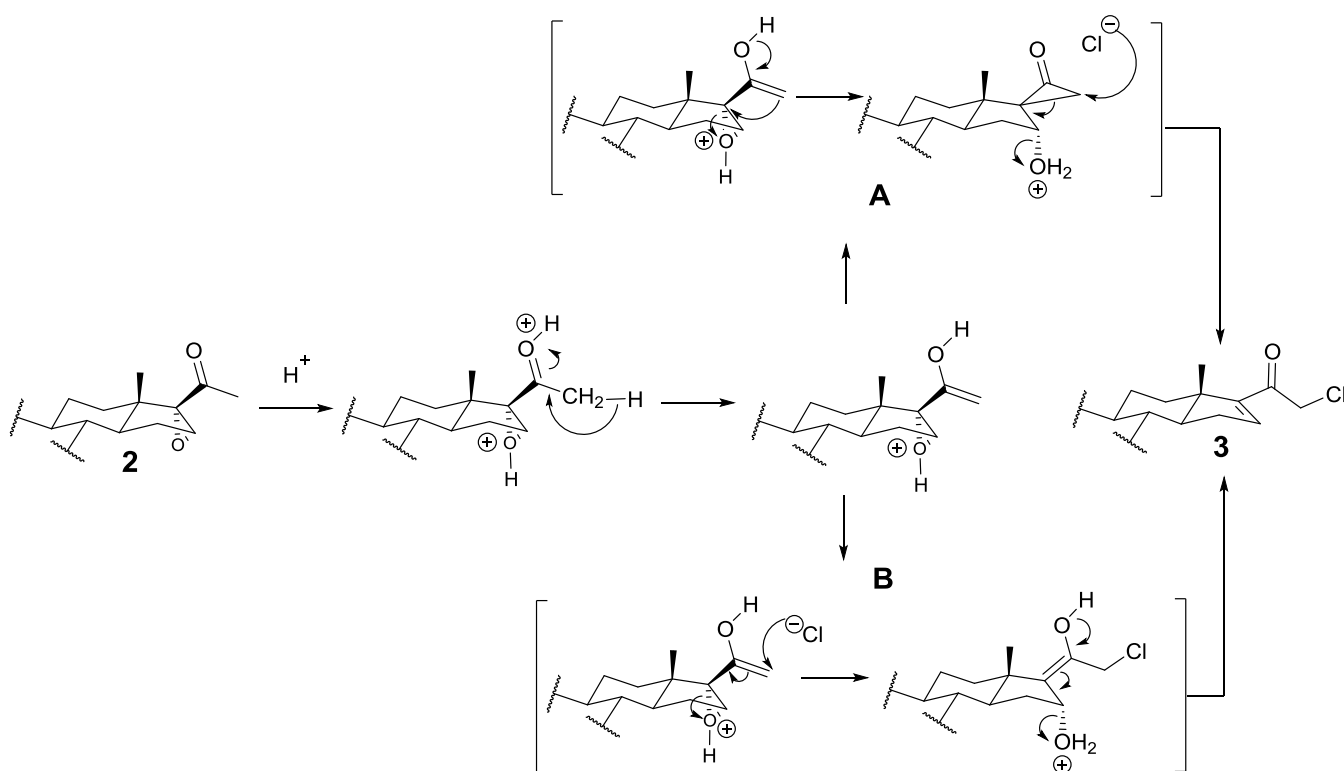


**Esquema 7.** Reacciones que se optimizan (*rojo y azul*) con la reacción de Girdhar e Ishar. **I)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaOH, MeOH; **II)** TBDMS-Cl, imidazol, DMF; **III)** PhI(AcO)<sub>2</sub>, NaOH, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; **IV)** SOCl<sub>2</sub>, Py, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; **V)** 1,2,4-triazol, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF; **VI)** HCl concentrado, acetona; **VII)** CrCl<sub>2</sub>, AcOH.

Con ello, la ruta sintética se ahorra 3 pasos, puesto que ya no es necesario pasar por el intermediario con el alcohol en C-21 ni proteger el alcohol en C-3 por la cloración con  $\text{SOCl}_2$  (**Esquema 7 en rojo**), así como eliminar el epóxido en un paso extra (**Esquema 7 en azul**).

Debido a esto, la ruta cumple algunos de los postulados de la Química Verde, además de utilizar sólo cloruro de hidrógeno y MeOH.

Para esta reacción se proponen dos mecanismos (**Esquema 8**) a partir del enolato que se forma como intermediario común entre los dos mecanismos propuestos. En el mecanismo **A** se propone la formación de una espiro-ciclopropanona que al ser muy inestable por la tensión anular, es fácilmente atacada en C-21 por el ión cloruro, dando como resultado el compuesto **3**. Se propuso este mecanismo de reacción, basado en el reportado en estudios previos para el ácido 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-16 $\beta$ -metilandrostan-17 $\beta$ -carbotioico.<sup>65</sup>



**Esquema 8.** Mecanismos de reacción propuestos para la reacción II.<sup>65</sup>

Por otra parte, el mecanismo **B** consiste en el ataque directo del ión cloruro al enolato para formar el compuesto **3** sin pasar por el intermediario con el anillo de ciclopropanona.

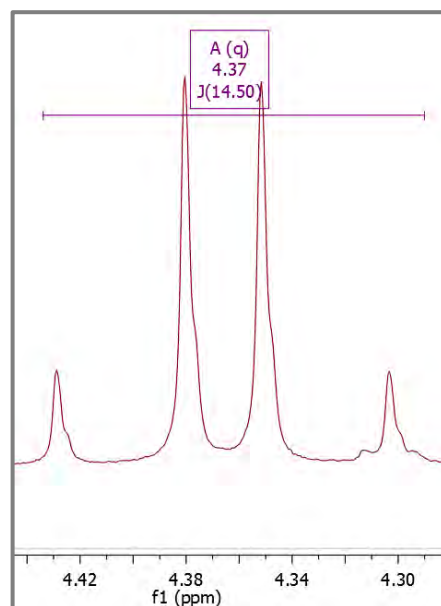
No obstante, aún no se ha elucidado a ciencia cierta cuál de los dos mecanismos es el que prosigue la reacción.

Otro aspecto que cabe señalar es que es necesario utilizar el compuesto **2** como materia prima, ya que está reportado que si se utiliza el acetato de 16-dehidropregnenolona como materia de partida, la reacción no procede de esta manera, puesto que se halogena la posición 16.<sup>64</sup>

Por otro lado, en el procedimiento experimental de la reacción se observó que es crucial que el MeOH no se encuentre húmedo, ya que de esto depende que se consuma completamente la materia prima. Experimentalmente se observó que cuando la reacción se torna de color vino intenso, la materia prima se ha consumido completamente, obteniéndose un rendimiento del 34%.

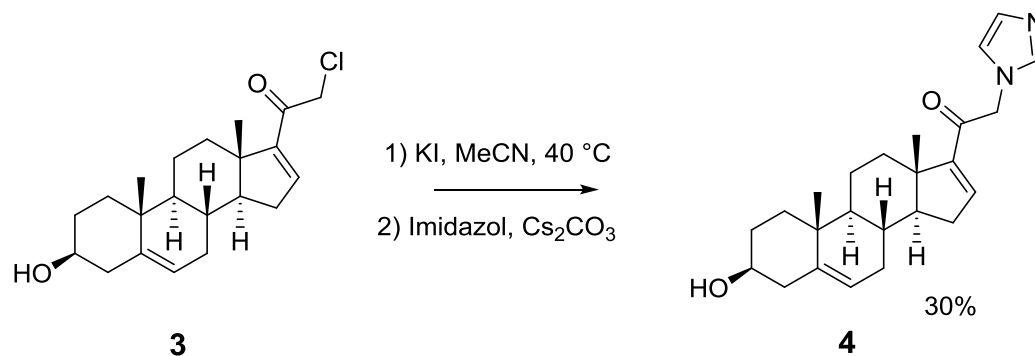
Se logró corroborar que se obtuvo el compuesto **3** por las señales en RMN de H-16 y C-16 en 6.78 (dd) y 145.5 ppm, respectivamente. De igual manera, en RMN <sup>1</sup>H se observa un sistema ABq que corresponde a los protones diasterotópicos de C-21; esta señal aparece como un dd que abarca de 4.30 a 4.43 ppm ( $J = 14.5$  Hz) (Figura 24). En RMN <sup>13</sup>C, el C-21 aparece a 56.1 ppm.

En IR aparecen las bandas de 3482 cm<sup>-1</sup> del alcohol en C-3, en 1677 cm<sup>-1</sup> el C=O de la cetona conjugada y en 787 cm<sup>-1</sup> la banda C-Cl. Así también en UV/Vis absorbe a una longitud de onda de 243.80 nm. Finalmente, en EM se observa el ion molecular a  $m/z$  348 ( $[M]^+$ , 38% AR), también por la isotopía del Cl<sup>37</sup> en  $m/z$  350 aparece el pico del  $[M + 2]^+$  (12% AR) y la deshidratación del alcohol a  $m/z$  330 ( $[M-H_2O]^+$ , 36% AR).



**Figura 24.** Sistema ABq correspondiente a los protones diasterotópicos de C-21 en el espectro del compuesto **3** en RMN <sup>1</sup>H.

### 6.1.2. Síntesis de 3 $\beta$ -hidroxi-21-(1H-imidazol-1-il)-pregna-5,16-dien-20-ona (**4**)

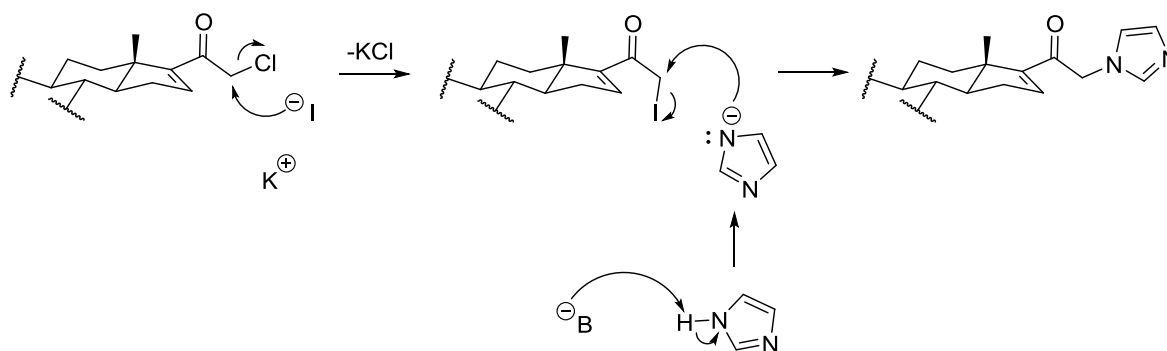


**Esquema 9.** Reacción de adición del imidazol en C-21.

La reacción de adición del imidazol en C-21 se llevó a cabo en dos pasos, ya que primeramente se sustituyó el cloro por yodo, puesto que el yodo es un mejor grupo saliente y eso facilitaría la S<sub>N</sub>2.

Cabe mencionar que se llevaron a cabo ensayos para pasar directamente del compuesto **3** al **4**, pero no reaccionó a temperatura ambiente, por lo que al volver hacer un segundo intento aplicando calentamiento (como en la ruta del **Esquema 7**), se observó que se obtienen múltiples subproductos, debido a que la materia prima al tener un sistema  $\alpha, \beta$  conjugado favorece la reactividad. Por ello, se recurrió a formar el compuesto con yodo antes de adicionar el imidazol para que las condiciones de reacción fueran más suaves.

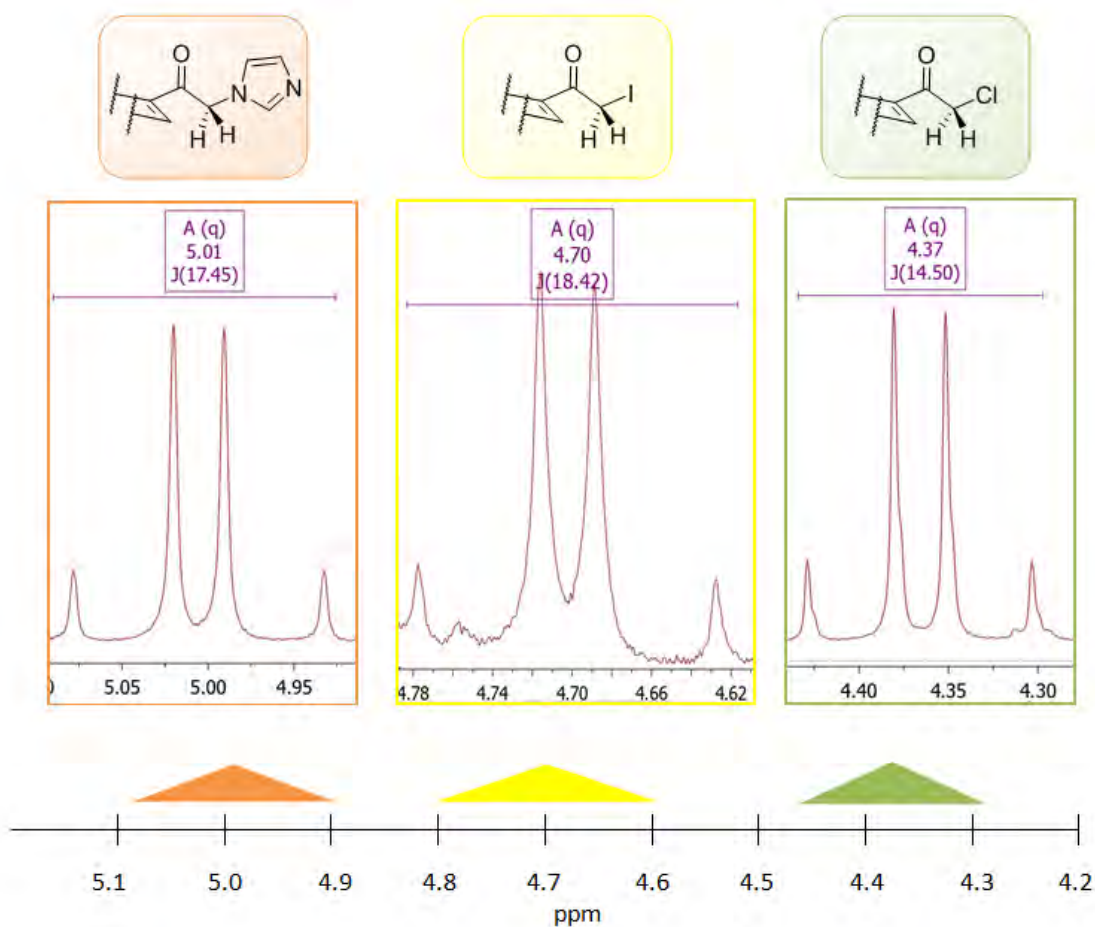
El mecanismo de la reacción involucra dos reacciones S<sub>N</sub>2. Primero, se colocó la primera reacción para formar el compuesto yodado aplicando un calentamiento ligero, y posteriormente, se llevó a cabo la reacción de adición del imidazol a temperatura ambiente.



**Esquema 10.** Mecanismo de reacción de la adición del imidazol en C-21.

En la primera reacción, el yoduro sustituye al cloro; mientras que en la segunda reacción el anión de imidazol sustituye al yodo.

Para distinguir el sustituyente que está en la posición 21 se observó que en RMN  $^1\text{H}$  las constantes de acoplamiento ( $J$ ), así como el desplazamiento del sistema AB, cambian entre sí dependiendo si la molécula tiene cloro, yodo o imidazol (**Figura 25**).



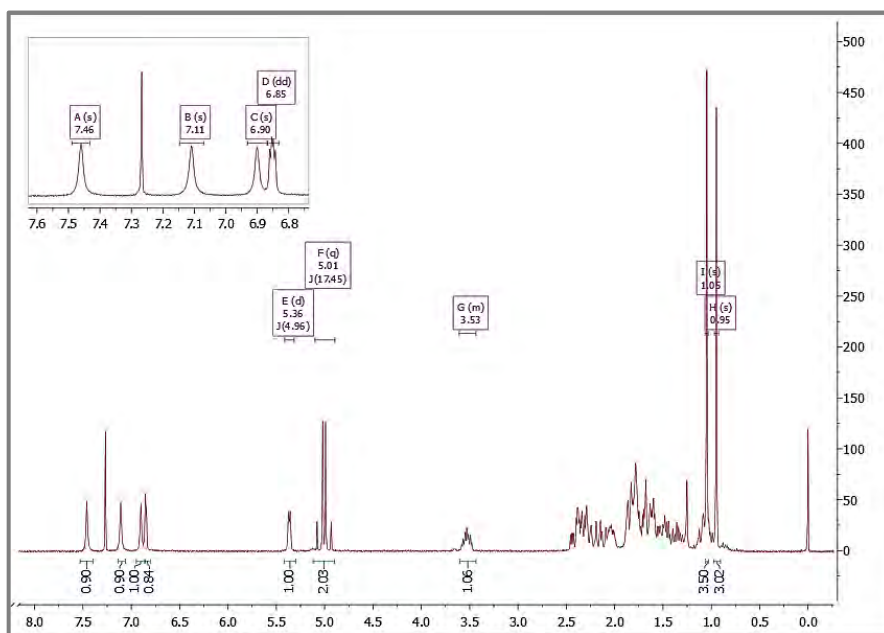
**Figura 25.** Comparación del desplazamiento de los protones diastereotópicos según el sustituyente en C-21 en RMN  $^1\text{H}$ .  $J$ : constante de acoplamiento (Hz).

Los protones diastereotópicos de C-21 se desplazan a campo bajo si la molécula tiene yodo o imidazol debido a que los protones se encuentran más desprotegidos por influencia de estos sustituyentes con respecto al compuesto clorado, es decir, los protones del compuesto clorado tienen un desplazamiento de 4.30 a 4.43 ppm, las señales del compuesto

yodado van de 4.62 a 4.78 ppm, mientras que las señales del compuesto con imidazol aparecen de 4.92 a 5.09 ppm (**Figura 25**).

Del mismo modo sucede con las constantes de acoplamiento, el sistema AB del compuesto clorado tiene una  $J = 14.50$  Hz, en el sistema del compuesto yodado la  $J = 18.42$  Hz, mientras que en el compuesto **4** (imidazol en C-21) la  $J = 17.45$  Hz

Por otra parte, para confirmar la obtención del compuesto **4** en RMN  $^1\text{H}$  se observaron tres señales simples en 6.90, 7.11 y 7.46 ppm correspondientes al imidazol, así como los protones de C-21 en 4.92-5.09 ppm (ABq,  $J = 17.5$  Hz) (**Figura 26**). En RMN  $^{13}\text{C}$  se



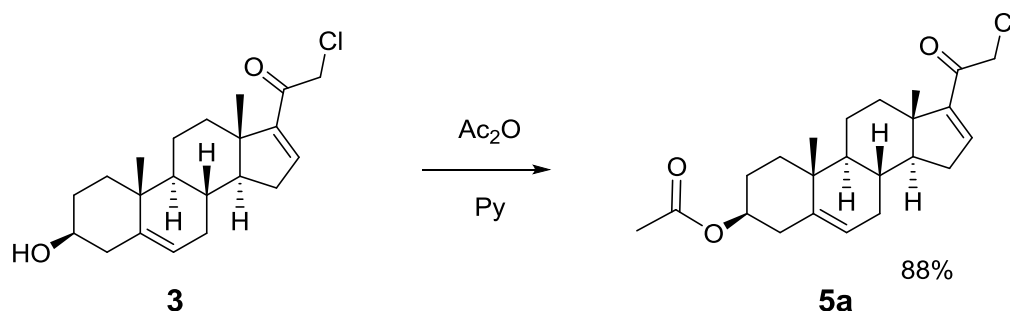
**Figura 26.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **4**.

muestran las señales en 145.3 (C-16), 129.4

(H-het), 71.7 ppm (C-3) y 56.2 (C-21). En IR se observan las bandas 3102.53 (O-H), 1675.55 (C=O cetona conjugada), 1584.34, 1462.96, 1362.05 (C-N) y 1065.68  $\text{cm}^{-1}$  (C-O). En UV/vis absorbe a una longitud de onda de 240 nm. En EM-ESI se observa el  $[\text{M} + \text{H}]^+$  a  $m/z$  381 (63% AR), y también en modo negativo se observa el  $[\text{M} - \text{H}]^+$  a  $m/z$  379 (9% AR). De igual manera aparece el pico de la pérdida del fragmento  $[\text{COCH}_2\text{N}_2\text{C}_3\text{H}_3]^+$  en  $m/z$  111 (12% AR).

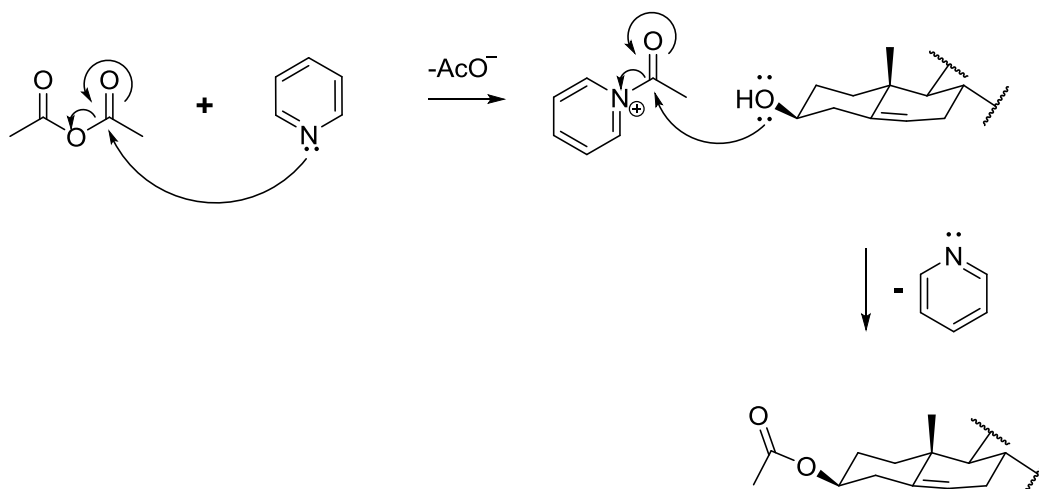
No obstante, el rendimiento global del compuesto **4** fue del 10%, mientras que, siguiendo la ruta del **Esquema 1**, el rendimiento global del análogo del compuesto **4** con un grupo triazol en C-21 fue del 17%. Aunque no existe diferencia significativa entre estos dos rendimientos, la ruta sintética propuesta en este trabajo disminuye el número de intermediarios, mejora la economía atómica, genera menor cantidad de residuos y es menos costosa que la otra ruta sintética.

### 6.1.3. Síntesis del acetato de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (**5a**)



Esquema 11. Reacción de acetilación en C-3.

La acetilación en posición C-3 se llevó a cabo en presencia de anhídrido acético y piridina. El mecanismo por el que procede esta reacción es el que se muestra en el **Esquema 12**, en el cual la piridina ataca al anhídrido acético para formar el acetato de acetilpiridinio, una especie muy reactiva a ataques nucleofílicos. Posteriormente, el alcohol del esteroide ataca al carbonilo del acetilpiridinio, liberando una molécula de piridina que es un buen grupo saliente, obteniendo de esta manera el esteroide acetilado.



Esquema 12. Mecanismo de reacción de la acetilación en C-3.



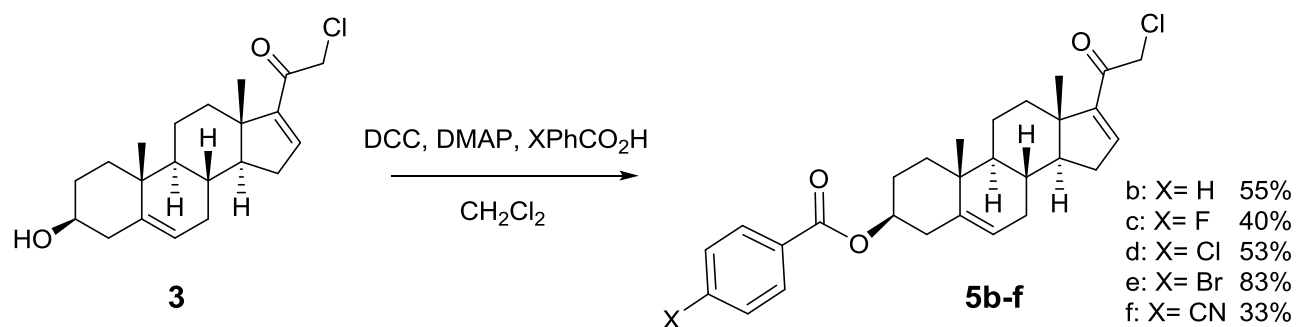
---

Se corroboró la obtención del compuesto **5a** mediante la pérdida de las señales del alcohol y la presencia de las señales del éster. En RMN  $^1\text{H}$  se observa el metilo del acetato en 2.02 ppm, así como una señal múltiple en 4.58 ppm correspondiente al protón de C-3. En RMN  $^{13}\text{C}$  los carbonos del acetato aparecen en 170.5 y 21.4 ppm, mientras que en 73.8 ppm se encuentra la señal de C-3.

En IR se presentan las bandas del éster en 1723 y 1246  $\text{cm}^{-1}$ , así como en 1656  $\text{cm}^{-1}$  la cetona conjugada y en 776  $\text{cm}^{-1}$  el estiramiento de C-Cl. En UV/vis absorbe a una longitud de onda de 246 nm. Y en EM-ESI se observa el  $[\text{M} + \text{H}]^+$  en  $m/z$  391 (28% AR), el  $[\text{M} + 2]^+$  en  $m/z$  393 (10% AR) y en  $m/z$  331 la pérdida del acetato ( $[\text{M} - \text{AcOH}]^+$ , 67% AR).

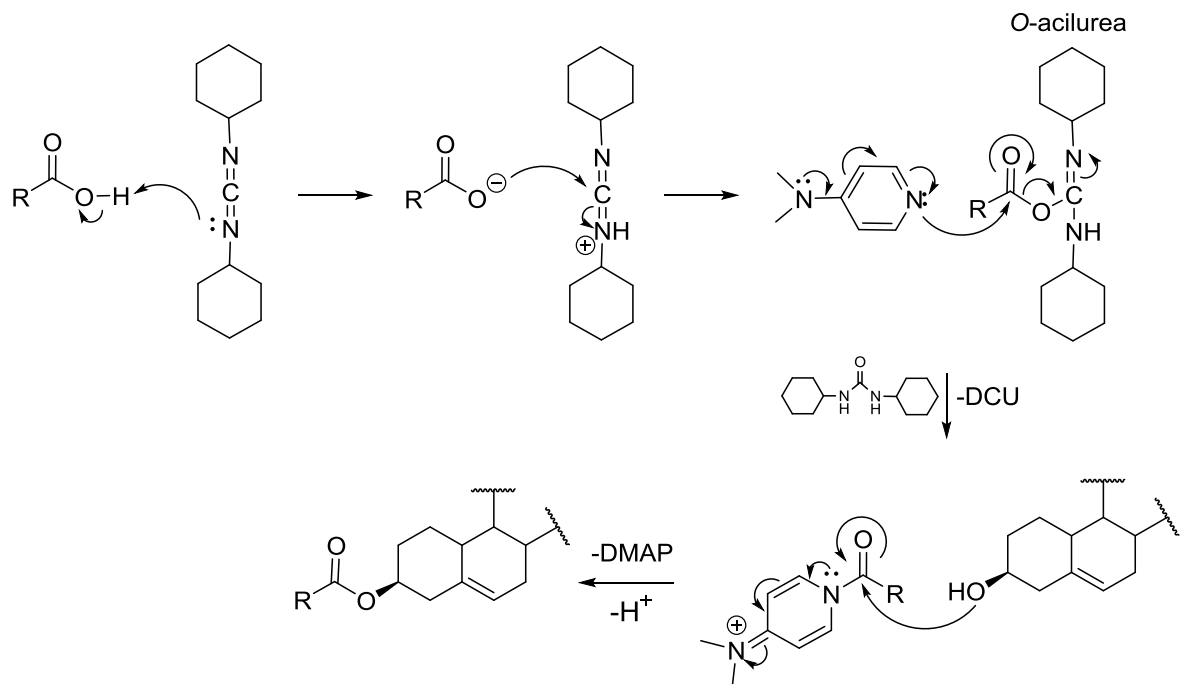
El rendimiento global del compuesto **5a** fue del 28%.

#### 6.1.4. Síntesis de benzoatos de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (**5b-f**)



**Esquema 13.** Esterificación de Steglich en C-3.

Para la síntesis de los ésteres de benzoilo se utilizó la esterificación de Steglich,<sup>66</sup> la cual se realiza en condiciones suaves. Esta reacción utiliza DCC para activar el ácido carboxílico y DMAP como catalizador. El mecanismo de reacción se muestra en el **Esquema 14**, donde se muestra que el primer paso de la reacción es la activación del ácido por parte de la DCC formando una O-acilurea. El carboxilato se adiciona al carbono fuertemente electrofílico de la diimida, dando lugar a un derivado de acilo activado.

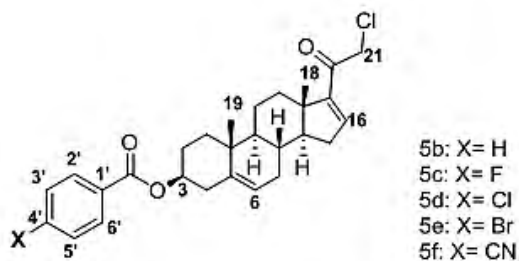


**Esquema 14.** Mecanismo de reacción de la esterificación de Steglich.

Enseguida, debido a que la nucleofilia de la DMAP es mayor a la del alcohol, ésta reacciona rápidamente con la *O*-acilurea mediante una sustitución nucleofílica en el grupo acilo para dar lugar a una amida reactiva y liberar DCU que funciona como buen grupo saliente. Finalmente, el alcohol realiza una sustitución nucleofílica sobre a la amida reactiva para formar el éster y regenerar la DMAP.<sup>67, 68</sup>

Se confirmó la presencia del éster en IR por las bandas ~1700 y 1200 cm<sup>-1</sup>. En RMN <sup>1</sup>H se identificó por la señal múltiple en 4.8 ppm del protón en C-3 y de los protones del anillo aromático en la región de 7.5-8 ppm, mientras que en RMN <sup>13</sup>C se observó la señal del carbonilo del éster en 165 ppm, del C-3 en 74 ppm y las señales de los carbonos del anillo aromático en la región de 115 a 131 ppm. Los rendimientos globales de esta serie de compuestos van del 10% al 26%.

**Tabla 4.** Caracterización de la serie de compuestos **5b-5f** en RMN



	5b		5c		5d		5e		5f	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
19	0.96 s	15.7	0.95 s	15.7	0.96 s	15.8	0.97 s	15.8	0.96 s	15.8
18	1.11 s	19.3	1.10 s	19.2	1.11 s	19.3	1.12 s	19.3	1.11 s	19.3
21	4.31-4.44*	56.0	4.30-4.43*	56.0	4.31-4.44*	56.0	4.31-4.45*	56.0	4.32-4.45*	56.0
3	4.87m	74.4	4.83m	74.6	4.85m	74.8	4.84m	74.8	4.88m	75.5
6	5.43 d	122.0	5.42 d	122.0	5.43 d	122.2	5.44 d	122.2	5.44 d	122.4
3' y 5'	7.44m	128.2	7.10m	115.5, 115.2	7.41m	128.6	7.59m	131.1	7.74m	130.1
1'	–	130.8	–	127.0	–	129.2	–	129.7	–	118.1
2' y 6'	8.05m	129.5	8.05m	132.1, 132.0	7.98m	131.0	7.91m	131.6	8.14m	132.2
4'	7.55m	132.7	–	165.0	–	139.2	–	127.9	–	134.6
5	–	140.3	–	140.2	–	140.2	–	140.1	–	139.9
16	6.79dd	145.3	6.78dd	145.3	6.79dd	145.5	6.80dd	145.4	6.80dd	145.5
17	–	152.4	–	152.4	–	152.4	–	152.4	–	152.4
R'CO <sub>2</sub> R	–	166.0	–	166.9	–	165.2	–	165.3	–	164.3
20	–	189.1	–	189.1	–	189.1	–	189.1	–	189.1

\*ABq J=14.5 Hz

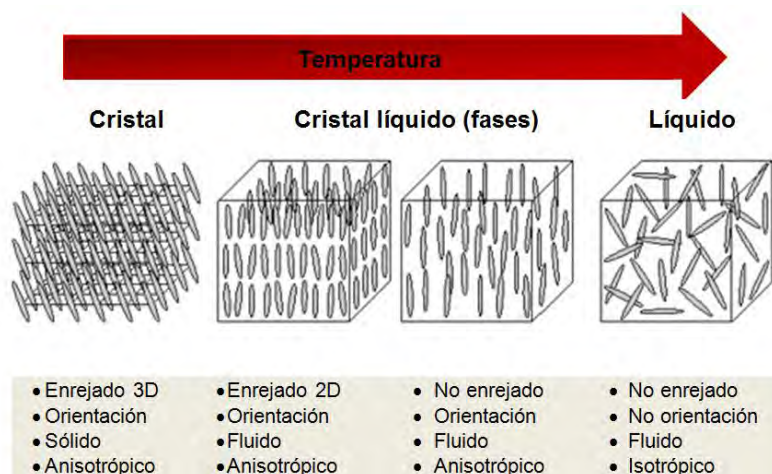
Compuesto	Pf (°C)	%R	%R <sub>global</sub>	UV (nm)	IR (cm <sup>-1</sup> )	[M-H] <sup>+</sup> m/z
<b>5b</b>	220-223	55	17	242	1711, 1683, 1254, 1274, 785	451
<b>5c</b>	210-212	40	13	243	1718, 1657, 1277, 1258, 762	469
<b>5d</b>	202-204	53	17	244	1721, 1658, 1273, 1232, 754	485
<b>5e</b>	218-219	83	26	246	1710, 1658, 1282, 1204, 757	529
<b>5f</b>	236-238	33	10	244	1721, 1660, 1274, 763	478*

\*Es el [M+H]<sup>+</sup>

De la misma manera, los ésteres de benzoilo se caracterizaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos, así como sus propiedades físicas (**Tablas 4 y 5**).

Cabe mencionar que los compuestos **5e** y **5f** tienen la propiedad de ser cristales líquidos al fundirse. El término de cristal líquido se refiere al estado de la materia entre un líquido isotrópico y un sólido cristalino.<sup>69</sup> Las sustancias que son isotrópicas presentan siempre el mismo comportamiento independientemente de la dirección de sus moléculas, mientras que en las anisotrópicas, las propiedades varían conforme cambia la dirección de sus moléculas.

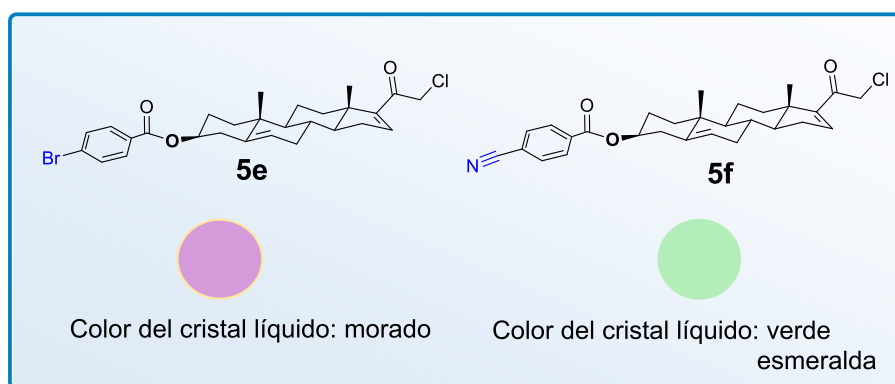
Una característica de los cristales líquidos es que presentan un alto grado de anisotropía.<sup>69</sup> En el caso de la luz, los cristales anisótropos presentan distintos valores de sus índices de refracción en función de la dirección en que vibre la luz al atravesar el cristal. Por ello, se observan tornasol al fundirse, debido a la reorientación que sufren las moléculas por el cambio de temperatura al pasar de fase sólida (altamente ordenada) a fase líquida (desordenada), pero siempre con la tendencia a apuntar en la misma dirección (**Figura 27**).<sup>70</sup>



**Figura 27.** Cambio de fase de sólido a líquido pasando por cristal líquido al incrementar la temperatura. (Figura tomada y modificada de CMMPE).<sup>71</sup>

Para que un compuesto sea cristal líquido requiere de una serie de características como una estructura molecular alargada y rígida a lo largo del eje, así como la presencia de dipolos fuertes o sustituyentes fácilmente polarizables.<sup>71</sup> En el caso de los esteroides, cumplen con la forma alargada y rígida de su esqueleto, de hecho, los primeros cristales líquidos que se reportaron fueron benzoatos del colesterol en 1888 por Reinitzen y Lehmann.<sup>72</sup>

De igual manera que los ésteres de Reinitzen, los compuesto **5e** y **5f** (**Figura 28**) son derivados esteroidales con un benzoato en C-3 y la diferencia entre el compuesto **5e** y **5f** es el sustituyente en posición *para* del benzoato. En el caso del compuesto **5e**, el sustituyente es un átomo de bromo, el cual es fácilmente polarizable; mientras que el compuesto **5f** tiene un nitrilo que puede formar un dipolo, provocando que la molécula sea más larga de lo que ya es.



**Figura 28.** Compuestos **5e** y **5f** que presentaron el fenómeno de cristal líquido.

No obstante, estos compuestos se pueden clasificar como cristales líquidos termotrópicos, debido a que su fase de cristal líquido es dependiente de la temperatura.<sup>69</sup> Esto es importante, ya que de ello dependen sus posibles aplicaciones.<sup>73,69</sup>

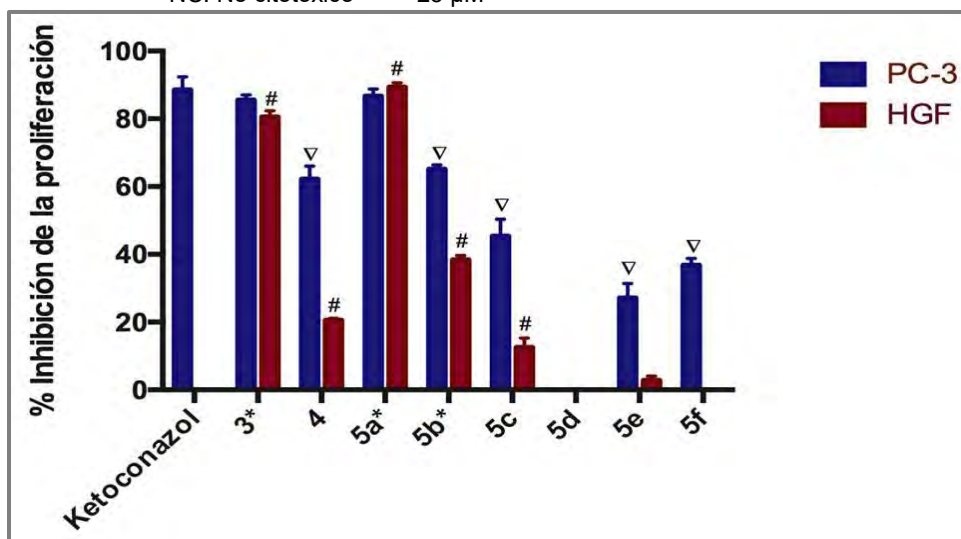
## 6.2. Análisis Biológico

Se evaluó la actividad antiproliferativa de los compuestos **3**, **4** y **5a-5f** sobre la línea celular PC-3 (línea celular de CaP no dependiente de andrógenos) mediante el método de sulforrodamina B. Adicionalmente, se evaluó la actividad antiproliferativa de los compuestos sobre cultivo primario de HGF (fibroblastos gingivales de humano) como un modelo de células sanas mediante el mismo método. Los resultados se muestran en la **Tabla 6** y **Figura 29**.

**Tabla 6.** Porcentaje de inhibición de proliferación de PC-3 y HGF de los compuestos sintetizados

Compuesto	% de inhibición de proliferación	
	PC-3	HGF
<i>Ketoconazol</i>	88.5 ± 3.9	----
<b>3*</b>	85.5 ± 1.5	80.5 ± 1.9
<b>4</b>	62.2 ± 3.8	20.5 ± 0.6
<b>5a*</b>	86.7 ± 2.1	89.4 ± 1.2
<b>5b*</b>	65.1 ± 1.3	38.3 ± 4.7
<b>5c</b>	45.4 ± 5.0	12.5 ± 2.8
<b>5d</b>	NC	NC
<b>5e</b>	27.1 ± 4.3	2.8 ± 1.2
<b>5f</b>	36.8 ± 2.0	NC

Los ensayos se realizaron a una concentración de 50 µM.  
 NC: No citotóxico \* 25 µM



**Figura 29.** Actividad antiproliferativa de los compuestos sintetizados sobre la línea celular PC-3 y toxicidad sobre HGF. \*: a 25 µM. n=3 los resultados son la media ± desv. est. Se realizó el análisis estadístico mediante una ANOVA de 1 vía y un análisis de Dunnett como prueba post-hoc. ∇: dif. significativa PC-3 p< 0.05 vs ketoconazol; #: dif. significativa HGF p<0.05 vs blanco.

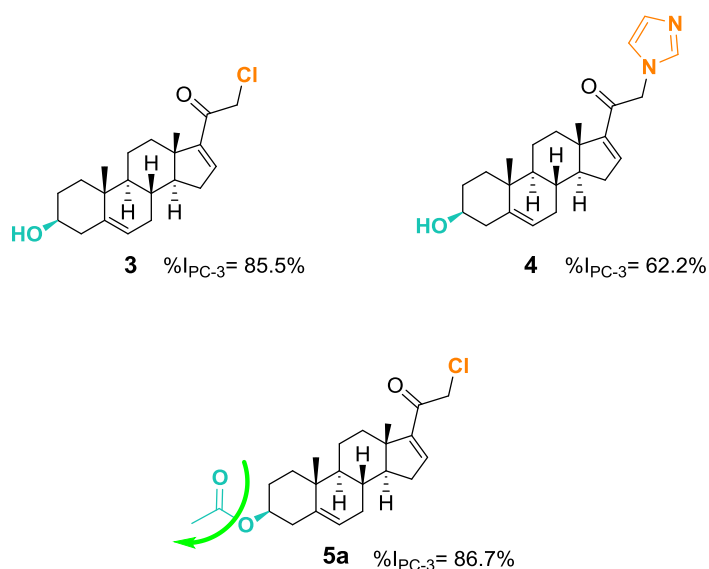
Adicionalmente, se determinó el cLog P mediante el método Ghose-Crippen para la serie de compuestos sintetizados, los cuales se muestran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** cLog P para los compuestos sintetizados

Compuesto	2	3	4	5a	5b	5c	5d	5e	5f
cLog P	2.90	4.27	3.49	4.50	6.40	6.56	6.96	7.23	6.43

Se puede observar que los compuestos con mayor actividad antiproliferativa fueron **3** y **5a**, los cuales fueron evaluados a una concentración de 25  $\mu$ M. Estos compuestos también inhibieron la proliferación de células sanas, por lo que no son selectivos para la línea celular PC-3. La diferencia entre el compuesto **3** y **5a** radica en la posición C-3, puesto que el compuesto **3** tiene el alcohol libre y el compuesto **5a** está acetilado. Al mostrar un porcentaje de actividad antiproliferativa similar, se puede hipotetizar que el compuesto activo es el compuesto **3** y el compuesto **5a** se hidroliza fácilmente para formar el compuesto **3**, por ello muestran la misma actividad (**Figura 30**); e incluso, en ensayos *in vivo* se pueda comportar como un profármaco.

Asimismo, se observa que las partes reactivas de la molécula son el cloruro de alquilo y el OH en C-3, ya que al comparar el compuesto **3** con **4** donde la diferencia radica en el sustituyente de C-21, puesto que ambos tienen el alcohol libre en C-3, la actividad inhibitoria decae del 85% al 62% (**Figura 30**).

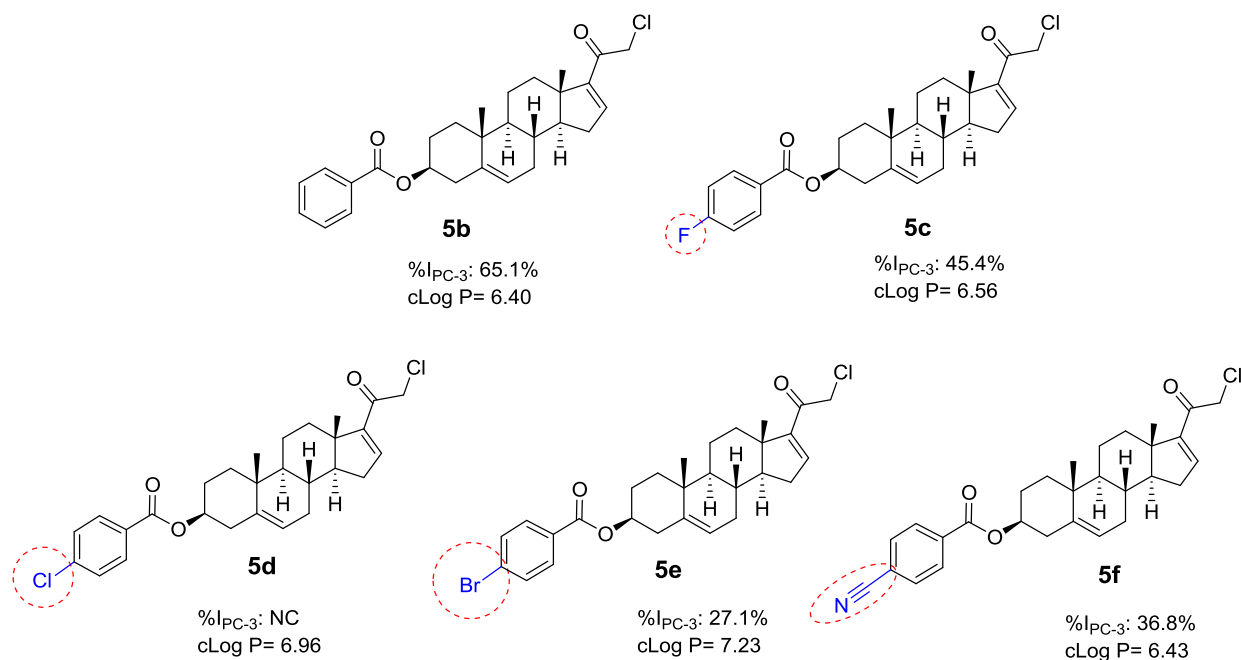


**Figura 30.** Comparación estructural de los compuestos con mayor actividad antiproliferativa. %I: porcentaje de inhibición de proliferación en PC-3.

La reactividad del alcohol libre o un grupo poco voluminoso en C-3 se confirma al observarse que la introducción de ésteres de benzoilo en la misma posición, les confiere selectividad a los compuestos **5b-5f** hacia la línea celular PC-3. La actividad inhibitoria en PC-3 para esta serie de compuestos fue menor del 50% con excepción del compuesto **5b** que tuvo un 65% de inhibición. La diferencia entre estos compuestos radica en el sustituyente que tienen en la posición *para* del benzoilo, siendo más activo el análogo sin sustituyente, por lo que la sustitución con halógenos en esta posición no favorece la actividad antiproliferativa.

De manera general se puede concluir que en la serie **5**, la introducción de ésteres voluminosos en C-3 confiere selectividad a los compuestos hacia la línea celular PC-3 y los ésteres de benzoilo *para*-sustituidos no favorecen la actividad antiproliferativa.

La actividad antiproliferativa de la serie de compuestos con el cloruro de alquilo en C-21 puede deberse a la alta reactividad del sistema  $\alpha$ - $\beta$  conjugado, así como el cloro alfa al carbonilo, lo que hacen que sean moléculas muy electrofílicas y susceptibles a ataques nucleofílicos por parte de cualquier residuo de aminoácidos u enzimas presentes en el espacio biológico, provocando la inhibición de proliferación celular.



**Figura 31.** Comparación estructura-actividad de los compuestos con ésteres de benzoilo.  
%I: porcentaje de inhibición de proliferación en PC-3.



---

Con respecto a la lipofilicidad de estos compuestos, el cLog P de los compuestos **5b-5f** oscila entre 6.4 y 7.2, los cuales son valores que indican que son moléculas muy lipofílicas, quizá lo suficiente para quedarse embebidas en la membrana plasmática y no llegar a su diana. Quizá esto explica por qué los compuestos mostraron bajo efecto inhibitorio, aunque también podría deberse a factores estéricos.

No obstante, el compuesto **4** y **5b** tuvieron una inhibición mayor del 60% en PC-3 con una toxicidad en HGF tolerable inferior del 40%. Estos compuestos pueden ser buenos candidatos contra CPRC, ya que además de mostrar actividad antiproliferativa en PC-3, fueron de los que tuvieron mejor energía de unión (-13.29 y -12.58 Kcal/mol) en el acoplamiento molecular para la enzima CYP17A1.

A pesar de que la línea celular PC-3 es independiente de andrógenos y no expresa la enzima CYP17A1, se ha reportado una relación entre inhibidores de la enzima CYP17A1 que inhiben la proliferación de esta línea celular,<sup>74</sup> por ejemplo, el Ketoconazol (CI<sub>50</sub> 22.4 μM)<sup>75</sup> y la Abiraterona (CI<sub>50</sub> 9.3 μM).<sup>76</sup> Esto sugiere que su actividad antiproliferativa puede estar actuando a través de otros mecanismos de acción que no están relacionados con la estereoidogénesis ni con el receptor de andrógenos.

Se encuentra reportado que inhibidores de CYP17A1 con un imidazol en su estructura como Econazol<sup>77,89</sup> y VN/124-1<sup>76</sup> inducen la rápida liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplasmático (RE), provocando un aumento sostenido en la concentración de calcio intracelular. Esta alteración en la homeostasis de calcio induce una respuesta a estrés en el RE (ERSR).

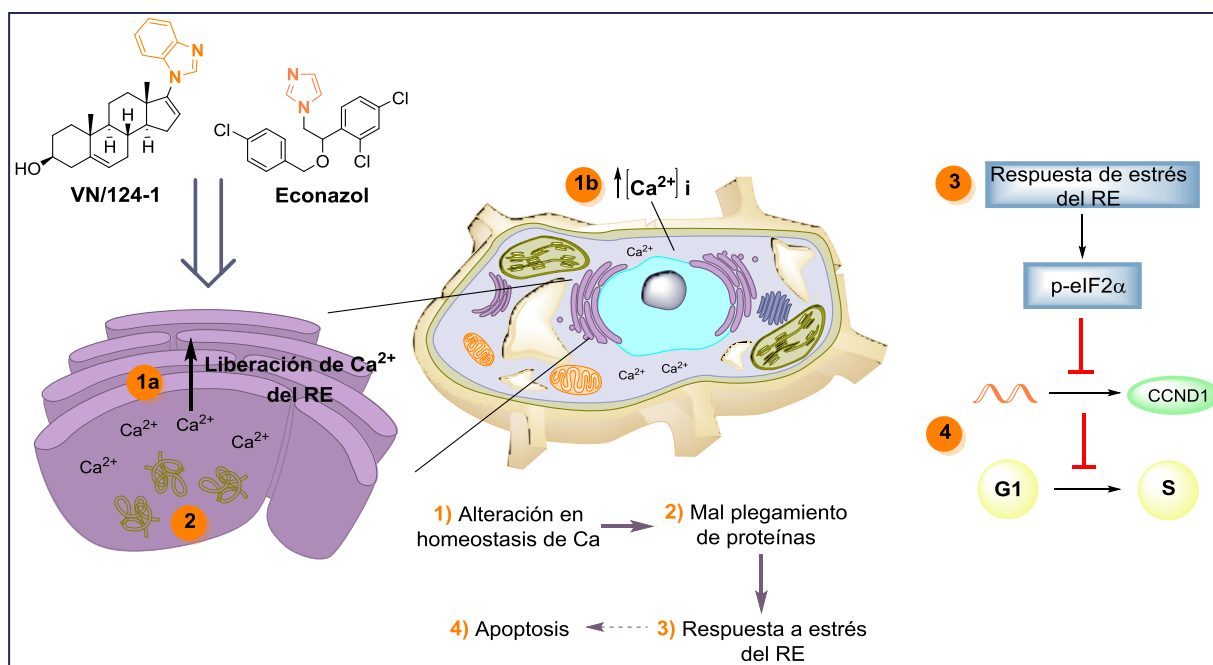
La ERSR activa distintas vías para reparar el daño, entre ellas la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). La UPR se activa en respuesta a una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE. En este contexto, la UPR tiene dos objetivos principales: en un principio, recuperar el funcionamiento normal de la célula deteniendo la traducción de proteínas y activando las vías de señalización que permitan incrementar la producción de chaperonas moleculares involucradas en el plegamiento de las proteínas. Si la célula no consigue este primer objetivo en un cierto lapso o si la anomalía persiste, la UPR se dirige hacia la apoptosis.<sup>78</sup>

Los compuestos Econazol y VN/124-1 incrementan la sobreexpresión de genes relacionados al ERSR y la fosforilación del factor eucariótico de iniciación 2 $\alpha$  (e-IF2 $\alpha$ ). La fosforilación de e-IF2 $\alpha$  impide la traducción de genes que favorecen la proliferación, incluyendo la ciclina D1. La pérdida de la ciclina D1 evita la culminación de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, inhibiendo así la proliferación celular (**Figura 32**).<sup>76</sup>

No está elucidado cómo estos compuestos inducen la liberación de Ca<sup>2+</sup> del ER, pero se sugiere que está relacionado con el imidazol que tienen en común estos compuestos. Incluso se propone que puede ser debido a un mecanismo directo o indirecto, tal como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como se ha demostrado con el imidazol que contiene Econazol.<sup>77</sup>

Por otra parte, es probable que la inducción de ERSR no sea selectiva para las células cancerosas *in vitro*. Sin embargo, se están realizando estudios al respecto para investigar si pueden exhibir cierta especificidad en tumores *in vivo*.<sup>76</sup>

De la misma manera que el Econazol y VN/124-1, el compuesto **4** al tener un imidazol en su estructura puede estar actuando de una manera similar en la línea celular PC-3.



**Figura 32.** Mecanismo de acción independiente de andrógenos de VN/124-1 y Econazol en PC-3. RE: Reticulo endoplasmático. p-eIF2 $\alpha$ : Factor eucariótico de iniciación 2 $\alpha$  fosforilado. CCND1: ciclina D1. G<sub>1</sub>: Fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. S: Fase S del ciclo celular.

---

## 7. CONCLUSIONES

Los estudios de acoplamiento molecular con compuestos derivados del pregnano funcionalizados en C-3 y C-21 indican que los derivados **3**, **4** y **5a-5f** fueron los que mostraron una mejor energía de unión con la enzima CYP17A1, en comparación a la Abiraterona y a los sustratos naturales de la enzima.

Se llevó a cabo la síntesis de los compuestos novedosos **4**, **5a-5f**. Adicionalmente, se optimizó la ruta sintética del compuesto **4** de 7 a 3 pasos que, aunque los rendimientos globales de las dos rutas son muy similares (10% y 17%), se disminuyeron el número de intermediarios y la cantidad de residuos, se mejoró la economía atómica y es menos costosa. Para la serie **5**, los rendimientos globales van de 16-28%.

En las pruebas *in vitro*, los compuestos con mayor actividad antiproliferativa en la línea celular PC-3 fueron **3** y **5a**; sin embargo, no fueron selectivos a la línea celular PC-3. Los mejores candidatos para estudios posteriores fueron los derivados **4** y **5b**, los cuales tuvieron un porcentaje de inhibición de proliferación superior del 60% en PC-3 y una toxicidad inferior al 40% en células sanas a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  (para el compuesto **4**) y 25  $\mu\text{M}$  (para el compuesto **5b**).

La introducción de ésteres voluminosos confiere selectividad a los compuestos **5b-5f** hacia la línea celular PC-3 y los ésteres de benzoilo *para*-sustituidos no favorecen la actividad antiproliferativa.

Se propone que la actividad antiproliferativa del compuesto **4** en PC-3 se debe a un mecanismo de acción no relacionado con la estereidogénesis ni al receptor de andrógenos.

---

## 8. PERSPECTIVAS

- Evaluar los compuestos sintetizados sobre la enzima CYP17A1 microsomal de testículos de humano.
- Realizar la evaluación *in vitro* de los compuestos sintetizados sobre la línea celular LnCaP dependiente de andrógenos.
- Realizar la evaluación *in vivo* de los compuestos sintetizados en roedores.

---

## 9. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 9.1. Desarrollo Computacional

#### 9.1.1. Estudios de Acoplamiento molecular

##### 9.1.1.1. Selección de diana biológica

Se sometieron las estructuras de los ligandos a un análisis empleando el servidor en línea Swiss Target Prediction,<sup>79</sup> el cual permite predecir las posibles dianas biológicas de moléculas orgánicas pequeñas usando una combinación de medidas de similitud en 2D y 3D, en las que se compara la molécula de consulta con una biblioteca de 280'000 compuestos activos en más de 2000 dianas biológicas de 5 organismos diferentes.<sup>80,81</sup>

La **Tabla 1** (p. 26) muestra los resultados arrojados por Swiss Target Prediction y las posibles dianas biológicas para la mayoría de los compuestos de interés.

Las dos dianas biológicas que presentan mayor incidencia fueron:

- 1) CYP17A1 (17 $\alpha$ -hidroxilasa; 17,20 liasa)
- 2) CYP19A1 (Aromatasa)

Finalmente, se optó por realizar los estudios de acoplamiento molecular sobre la enzima CYP17A1, ya que fue donde los compuestos de interés obtuvieron una mayor probabilidad de tener actividad.

---

### 9.1.1.2. Preparación de la proteína

La enzima CYP17A1 fue descargada directamente de la base de datos Protein Data Bank (PDB),<sup>82</sup> la cual contiene co-cristalizado el ligando Abiraterona. En la base de datos se identifica como:

- Q5TZV7: Esteroide 17-alfa-monooxigenasa de *Homo sapiens* (CYP17A1).  
ID PDB: 4NKV

Posteriormente, con el programa *Pymol Molecular Graphics System 1.3*<sup>83</sup> se removieron las moléculas de agua, así como la Abiraterona, utilizando el módulo de preparación de proteínas presente en el programa. Se eliminaron las subunidades de la proteína a manera de conservar únicamente una de ellas (la subunidad A).

Finalmente, se realizó una minimización de la energía de la proteína previamente preparada empleando el programa en línea YASARA.<sup>84</sup> Posteriormente, se removieron los iones y las moléculas de agua que el programa añade para minimizar la energía. La información proporcionada por el programa durante la minimización de la energía de la proteína se muestra en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Minimización de la energía de la proteína CYP17A1 empleando el programa YASARA

<b>Inicio</b>	Energía (KJ/mol)	-123 187.4
	Score	-1.36
<b>Término</b>	Energía (KJ/mol)	-278 359.5
	Score	0.31

Los valores de energía obtenidos muestran en el *inicio* la energía de la macromolécula cristalizada, y en el *término*, la energía cuando la macromolécula está solvatada. A menor energía, la macromolécula representa un modelo más cercano a sus condiciones reales. Por otro lado, el Score es un valor asignado por YASARA e indica qué tan estable es la conformación indicada. Entre mayor sea el valor, la macromolécula es más estable.<sup>85</sup>

La macromolécula optimizada se guardó en formato *pdb* para su empleo en el estudio de acoplamiento molecular.

---

### 9.1.1.3. Preparación de los ligandos

Los compuestos se construyeron en el programa *Spartan '02*<sup>86</sup> y mediante un análisis de distribución de conformeros con mecánica molecular se buscó la conformación más estable de cada uno. Posteriormente, se optimizó su geometría con el método Semi-Empírico AM1.

Usando el programa *Autodock 4.2*<sup>87</sup> y su interfaz gráfica *AutoDock Tools 1.5.4 (ADT)*, los átomos de hidrógeno no polares se fusionaron al carbono al que estaban unidos y se detectaron automáticamente los centros de torsión, así como los enlaces rotables.

### 9.1.1.4. Acoplamiento molecular

Con ADT, usando el programa auxiliar *Autogrid 4.0*, se generaron las mallas de búsqueda (grid), las cuales se posicionaron en el centro de la interfaz de la enzima abarcando el grupo hemo. La región de búsqueda de cada malla fue de 70x70x70 Å en las siguientes coordenadas: X= -29.628, Y= -9.982, Z= -39.759.

La búsqueda de las conformaciones accesibles por los ligandos se realizó usando *Autodock 4.2*. Para ello, se empleó un algoritmo genético del tipo Lamarckiano con un tamaño de población de 150,  $2.5 \times 10^6$  evaluaciones y 50 corridas. El número máximo de generaciones fue de 27 000. Se seleccionaron las conformaciones energéticamente más favorables del conjunto de conformaciones más abundante (mayor número de clústers).<sup>85,88</sup>

La validación del método se llevó a cabo dockeando la Abiraterona en la enzima preparada dando un valor de RMSD de 0.45 Å (un RMSD aceptable debe ser menor a 2 Å).

### 9.1.2. Determinación de *cLog P*

Los compuestos se construyeron en el programa *Spartan '02*<sup>86</sup> y mediante un análisis de distribución de conformeros con mecánica molecular se buscó la conformación más estable de cada uno. Posteriormente, se optimizó su geometría con el método Semi-Empírico AM1. Con la minimización de energía de las moléculas, se determinó el *cLog P (Ghose-Crippen)*, el cual es el logaritmo calculado del coeficiente de partición entre el n-octanol y agua de cada compuesto. Este parámetro indica el grado de lipofilia de un compuesto y no debe ser superior a 5.0.

---

## 9.2. Desarrollo Químico

### 9.2.1. Materiales y Métodos

El avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando cromatoplasmas de vidrio recubiertas de gel de sílice (Sil G-25 UV<sub>254</sub>) y los siguientes medios de elución, según sea el caso (**Tabla 9**). Posteriormente, se visualizaron las cromatoplasmas con una lámpara de luz UV ( $\lambda = 254$  nm) y se revelaron con una solución de CoCl<sub>2</sub> al 2% (m/v) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

**Tabla 9.** Sistemas de elución para CCF

Sistema	Disolventes	Proporción
I	Hexano-AcOEt	8:2
II	Hexano-AcOEt	6:4
II	CHCl <sub>3</sub> -MeOH	9:1

Para las cromatografías en columna (CC) llevadas a cabo para la purificación de productos, se utilizó gel de sílice Kiesegel 60 de 0.063-0.2 mm o Florisil de malla 60-100 de Aldrich.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y fueron reportados sin corregir.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer modelo Spectrum 400 utilizando la técnica de reflectancia por ATR. Las unidades se reportan cm<sup>-1</sup>.

Los espectros de absorción de luz UV se realizaron en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer modelo Lambda 2. Las unidades se expresan como nm.

Para la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C) se utilizaron los siguientes equipos: Inova Varian de 400 MHz, Bruker Avance de 400 MHz, Varian Oxford de 300 MHz y VRX-300s. Se empleó como disolvente CDCl<sub>3</sub>. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se encuentran en ppm referidos al TMS en RMN <sup>1</sup>H y al CDCl<sub>3</sub> para RMN <sup>13</sup>C. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en Hz.

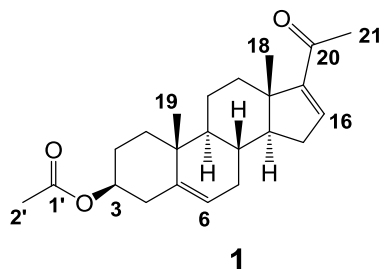
Los espectros de masas de los compuestos **4** y **5a-f** se llevaron a cabo por la técnica de electro spray (ESI) por introducción directa (ID) en modo positivo y negativo, reportándose el



---

[M+H]<sup>+</sup> y [M-H]<sup>+</sup>, respectivamente según fue el caso. Por otro lado, para el compuesto **2** se realizó mediante la técnica FAB con bombardeo de iones de cesio a una temperatura de cámara menor a 50 °C mediante la detección de iones positivos. Se reporta el [M+H]<sup>+</sup>. Y por último, el compuesto **3** se realizó por impacto electrónico (IE) por introducción directa (ID), reportándose el [M]<sup>+</sup>. En todas las técnicas las unidades son *m/z*.

### 9.2.2. Materia prima (acetato de 16-dehidropregnenolona)



Como materia prima se utilizó el acetato de 16-dehidropregnenolona (Aldrich), la cual se recristalizó en MeOH.

$C_{23}H_{32}O_3$       **PM:** 356.51 g/mol      **Pf:** 170-172 °C

**UV (nm):** 237.96

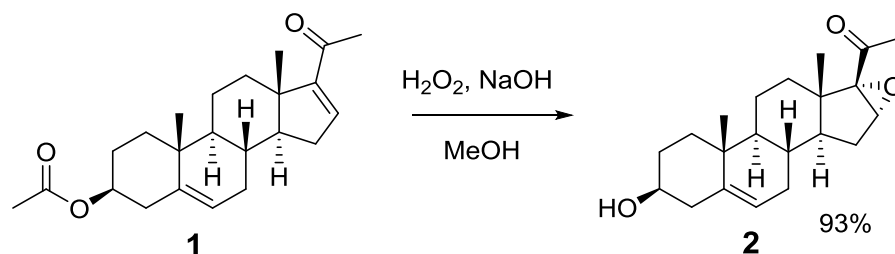
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3042.08, 3059.14 (C=CH); 2943.71, 2965.16, 2865.45, 2838.49, (C-H alifático); 1728.14 (C=O éster); 1660.07 (C=O cetona conjugada); 1583.94 (C=C); 1372.62, 1365.20 (–CH<sub>3</sub>); 1245.22, 1232.50 (C-O acetato); 1035.92 (C-O).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 6.70 (dd, *J* = 3.3, 1.9 Hz, 1H, H-16), 5.37 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-6), 4.59 (m, 1H, H-3), 2.25 (s, 3H, H-21), 2.03 (s, 3H, H-2'), 1.05 (s, 3H, H-18), 0.91 (s, 3H, H-19).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 196.9 (C-20), 170.6 (C-1'), 155.3 (C-17), 144.5 (C-16), 140.3 (C-5), 122.0 (C-6), 73.9 (C-3), 56.4 (C-14), 50.4 (C-9), 46.1 (C-13), 38.2 (C-4), 36.9 (C-10), 36.8 (C-1), 34.6 (C-12), 32.3 (C-15), 31.6 (C-7), 30.2 (C-8), 27.7 (C-2), 27.2 (C-21), 21.5 (C-2'), 20.6 (C-11), 19.3 (C-18), 15.7 (C-19).

**EM-ESI *m/z*:** 357 ([M + H]<sup>+</sup>, 100% AR), 297 ([M – C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 22% AR).

### 9.2.3. Síntesis de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxipregn-5-en-20-ona (2)



En un matraz de fondo redondo de 250 mL se pesó 1.0 g (2.8 mmol) de **1** y se disolvió en 50 mL de MeOH. Posteriormente, en un vaso de precipitados con 20 mL de MeOH se adicionaron 2 mL (8 mmol) de una solución de NaOH (4N) y 4 mL (0.135 mol) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (v/v). Esta solución se vertió al matraz con la materia prima disuelta. La reacción se dejó en agitación magnética por 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción se concentró a presión reducida y se le agregaron 20 mL de agua fría. Se filtró al vacío y se lavó con agua.

C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>      **PM:** 330.47 g/mol

**Rendimiento:** 93%      **pf:** 180-182 °C      **R<sub>f</sub>:** 0.4 (sistema II)

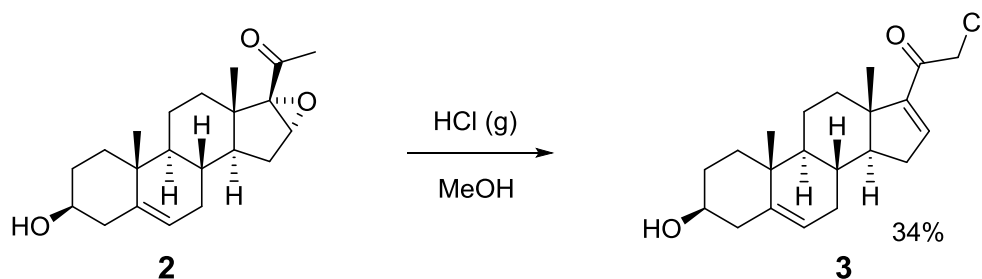
**IR (cm<sup>-1</sup>)** 3343.44 (O-H); 2969.77, 2936.86, 2915.79, 2863.94 (C-H alifático); 1690.94 (C=O); 1634.14 (C=C); 1368.40 (-CH<sub>3</sub>); 1054.70 (C-O).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 5.33 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H-6), 3.68 (s, 1H, H-16), 3.52 (m, 1H, H-3), 2.03 (s, 3H, H-21), 1.05 (s, 3H, H-18), 1.02 (s, 3H, H-19).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 204.9 (C-20), 141.1 (C-5), 120.9 (C-6), 71.6 (C-3), 71.0 (C-17), 60.5 (C-16), 27.5 (C-21), 19.3 (C-18), 15.2 (C-19).

**EM-FAB *m/z*:** 331 ([M + H]<sup>+</sup>, 5% AR).

#### 9.2.4. Síntesis de 21-cloro-3 $\beta$ -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (**3**)



Siguiendo el método descrito por Girdhar e Ishar,<sup>64</sup> se adaptó y se estandarizó para obtener el compuesto **3**. Primero, en un matraz de fondo redondo de 500 mL se pesó 1.0 g (3 mmol) de **2** y se disolvió en 100 mL de MeOH anhidro. En seguida, se colocó la reacción en agitación y se burbujeó el cloruro de hidrógeno, el avance de reacción se monitoreó por un lapso de tres horas hasta que la mezcla de reacción se tornó de color vino intenso. Posteriormente, la mezcla de reacción se neutralizó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se dejó reposar en un baño de hielo por una hora. El precipitado formado se filtró al vacío, y finalmente, se recrystalizó en metanol obteniéndose un sólido blanco.

C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>ClO<sub>2</sub>    **PM:** 348.91 g/mol

**Rendimiento:** 34%    **Pf:** 198-200 °C    **R<sub>f</sub>:** 0.4 (sistema II)

**UV (nm):** 243.80

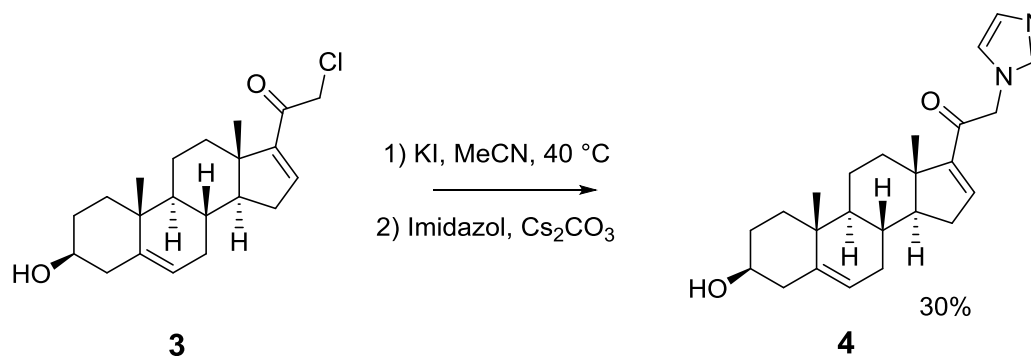
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3482.20 (O-H); 2967.87, 2934.80, 2898.39, 2859.11 (C-H alifático); 1677.79 (C=O cetona conjugada); 1583.38 (C=C); 1060.99 (C-O), 787.37 (C-Cl).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 6.78 (dd, *J* = 3.3, 1.9 Hz, 1H, H-16), 5.36 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-6), 4.30-4.43 (ABq, *J* = 14.5 Hz, 2H, H-21), 3.54 (m, 1H, H-3), 1.05 (s, 3H, H-18), 0.95 (s, 3H, H-19).

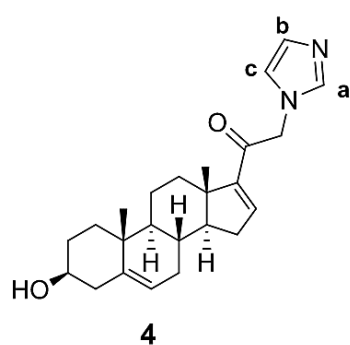
**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 189.1 (C-20), 152.4 (C-17), 145.5 (C-16), 141.4 (C-5), 121.0 (C-6), 71.7 (C-3), 56.1 (C-21), 19.3 (C-18), 15.8 (C-19).

**EM-IE *m/z*:** 348 ([M]<sup>+</sup>, 38% AR), 350 ([M + 2]<sup>+</sup>, 12% AR), 330 ([M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 36% AR).

### 9.2.5. Síntesis de 3β-hidroxi-21-(1H-imidazol-1-il)-pregna-5,16-dien-20-ona (4)



En un matraz de fondo redondo de 50 mL se pesaron 400 mg (1.2 mmol) del compuesto **3**. Después se le adicionó 600 mg (3.6 mmol) de KI y 10 mL de CH<sub>3</sub>CN anhidro. Se colocó con agitación a 40 °C por 2 horas, en las cuales se formó una solución amarilla y un precipitado blanco (identificado como cloruro de potasio). Posteriormente, se filtró el KCl formado como producto secundario de la reacción y se guardó la fase orgánica. En otro matraz de 50 mL, se colocó en agitación a temperatura ambiente 10 mL de CH<sub>3</sub>CN anhidro con 708 mg (2.2 mmol) de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 150 mg (2.2 mmol) de imidazol por un lapso de 15 min. En seguida, se le agregó la fase orgánica mencionada anteriormente y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 12 h. Concluida la reacción, se concentró el disolvente al vacío y se purificó mediante CC con florisil y hexano-acetona como medio de elución.



$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2$  **PM:** 380.53 g/mol **Rendimiento:** 30%

**Pf:** 258-260 °C **R<sub>f</sub>:** 0.5 (sistema III)

**UV (nm):** 240.47

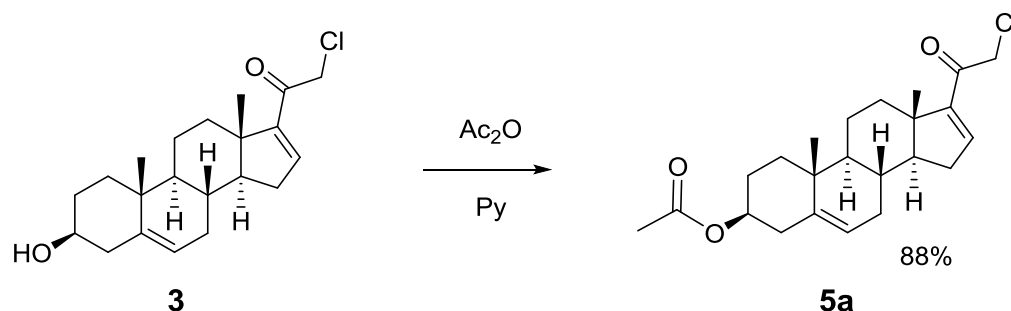
**IR (cm<sup>-1</sup>)** 3102.53 (O-H); 2972.44, 2937.50, 2937.50, 2848.12 (C-H alifático); 1675.55 (C=O cetona conjugada); 1584.34 (C=C); 1584.34, 1462.96, 1362.05 (C-N); 1065.68 (C-O).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 7.46 (s, 1H, Ha-Het), 7.11 (s, 1H, Hc-Het), 6.90 (s, 1H, Hb-Het), 6.85 (dd, *J* = 3.3, 1.9 Hz, 1H, H-16), 5.36 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-6), 4.92-5.09 (ABq, *J* = 17.5 Hz, 2H, H-21), 3.53 (m, 1H, H-3), 1.05 (s, 3H, H-18), 0.95 (s, 3H, H-19).

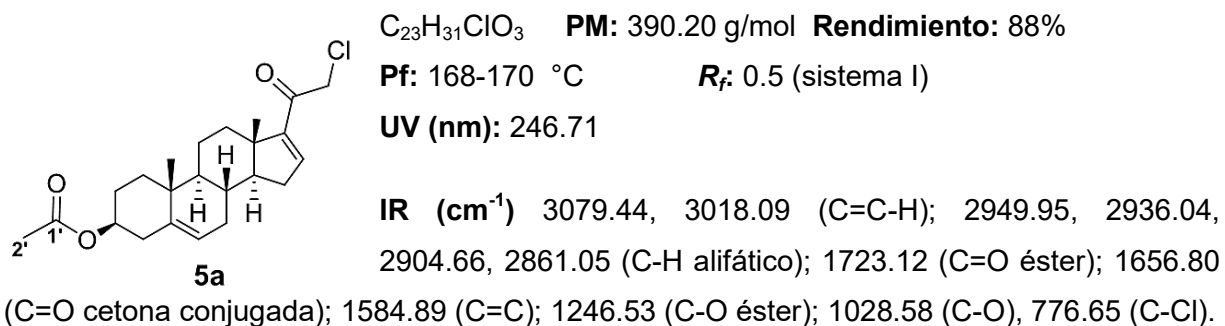
**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 189.7 (C-20), 152.8 (C-17), 145.3 (C-16), 141.5 (C-5), 129.4 (Cb), 120.8 (C-6), 71.7 (C-3), 56.2 (C-21), 19.3 (C-18), 15.8 (C-19).

**EM-ESI *m/z*:** 381 ([M + H]<sup>+</sup>, 63% AR), 363 ([M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 3% AR), 111 ([COCH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 12% AR); 379 ([M - H]<sup>+</sup>, 9% AR).

### 9.2.6. Síntesis del acetato de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (**5a**)



En un matraz de fondo redondo de 50 mL se pesaron 500 mg (1.4 mmol) del compuesto **3** y se le adicionaron 4.5 mL (0.014 mol) de anhídrido acético y 1 mL (0.012 mol) de piridina. La mezcla de reacción se dejó en agitación magnética a temperatura ambiente por 3 h. Posteriormente, se vertió en un vaso de precipitados de 50 mL con una mezcla de agua-hielo (20 mL) formándose un precipitado blanco, el cual se filtró al vacío y se lavó con 10 mL de una solución de HCl al 10%.

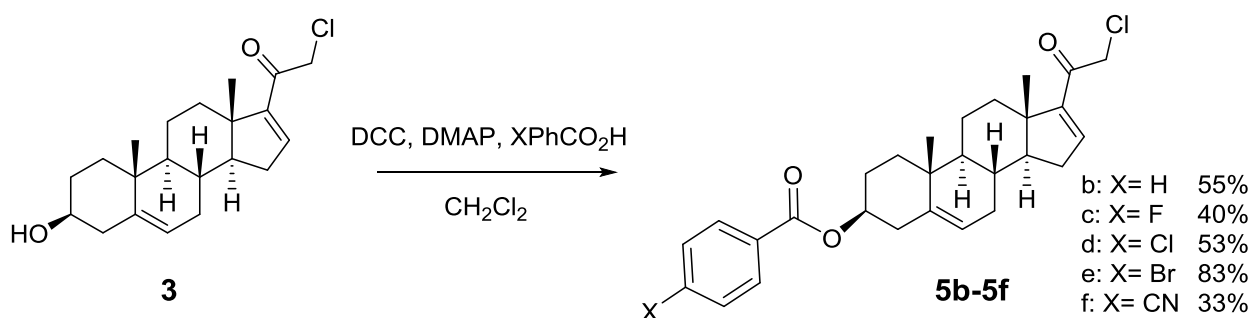


**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 6.77 (dd,  $J = 3.3, 1.9$  Hz, 1H, H-16), 5.37 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H-6), 4.58 (m, 1H, H-3), 4.29-4.43 (ABq,  $J = 14.5$  Hz, 2H, H-21), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-éster), 1.04 (s, 3H, H-18), 0.93 (s, 3H, H-19).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 189.1 (C-20), 170.5 (C-1'), 152.4 (C-17), 145.3 (C-16), 140.3 (C-5), 121.8 (C-6), 73.8 (C-3), 25.9 (C-21), 21.4 (C-2'), 19.2 (C-18), 15.7 (C-19).

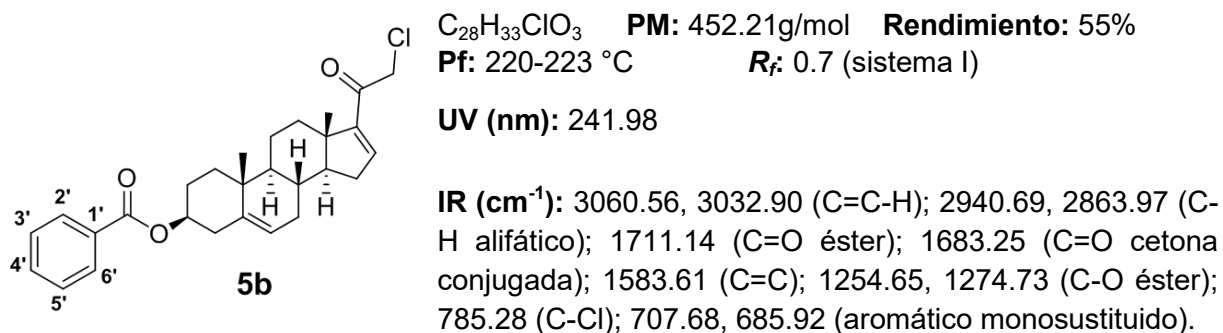
**EM-ESI  $m/z$ :** 391 ([M + H]<sup>+</sup>, 28% AR), 393 ([M + 2]<sup>+</sup>, 10% AR), 331 ([M - AcOH]<sup>+</sup>, 67% AR).

### 9.2.7. Síntesis de los benzoatos de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (**5b-5f**)



En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se pesaron 4.6 mmol del ácido benzoico apropiado y se adicionaron 944 mg (4.6 mmol) de DCC en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dejándose en agitación por 10 min. Posteriormente, se agregaron a la reacción 560 mg (4.6 mmol) de DMAP y se dejó agitación por otros 10 min. Finalmente, se incorporaron 400 mg (1.2 mmol) del compuesto **3** y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 1 h. Concluida la reacción, se concentró el disolvente y se purificó el producto mediante CC en gel de sílice utilizando hexano-acetato de etilo (95:5) como medio de elución.

#### Benzoato de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3 $\beta$ -ilo (**5b**)

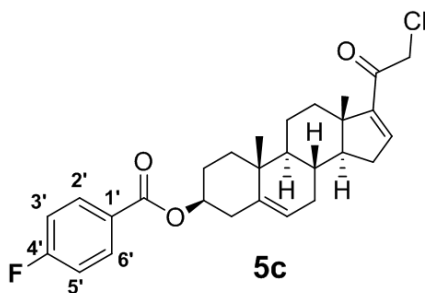


**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.05 (m, 2H, H-2' y H-6'), 7.55 (m, 1H, H-4'), 7.44 (m, 2H, H-3' y H-5'), 6.79 (dd, *J* = 3.4, 1.9 Hz, 1H, H-16), 5.43 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-6), 4.87 (m, 1H, H-3), 4.31-4.44 (ABq, *J* = 14.5 Hz, 2H, H-21), 1.11 (s, 3H, H-18), 0.96 (s, 3H, H-19).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 189.1 (C-20), 166.0 (C=O éster), 152.4 (C-17), 145.3 (C-16), 140.3 (C-5), 132.7 (C-4'), 130.8 (C-1'), 129.5 (C-2' y C-6'), 128.2 (C-3' y C-5'), 122.0 (C-6), 74.4 (C-3), 56.0 (C-21), 19.3 (C-18), 15.7 (C-19).

**EM-ESI *m/z*:** 451 ([M-H]<sup>+</sup>, 10% AR), 453 ([M + 2]<sup>+</sup>, 3% AR).

**p-flourobenzoato de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (5c)**



$C_{28}H_{32}ClFO_3$  **PM:** 470.20 g/mol **Rendimiento:** 40%

**Pf:** 210-212 °C **R<sub>f</sub>:** 0.7 (sistema I)

**UV (nm):** 242.74

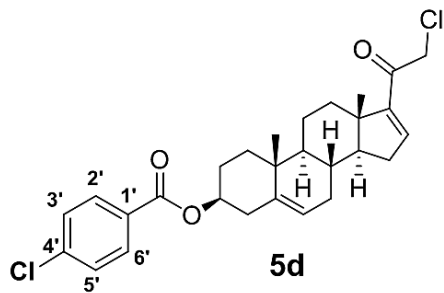
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3036.88 (C=C-H); 2968.77, 2932.12, 2864.16 (C-H alifático); 1718.24 (C=O éster); 1657.62 (C=O cetona conjugada); 1578.33 (C=C); 1277.35, 1258.28 (C-O éster); 846.28 (sustitución *para*); 762.12 (C-Cl).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.05 (m, 2H, H-2' y H-6'), 7.10 (m, 2H, H-3' y H-5'), 6.78 (dd, *J* = 3.3, 1.9 Hz, 1H, H-16), 5.42 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H-6), 4.83 (m, 1H, H-3), 4.30-4.43 (ABq, *J* = 14.5 Hz, 2H, H-21), 1.10 (s, 3H, H-18), 0.95 (s, 3H, H-19).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 189.1 (C-20), 166.9 (C=O éster), 165.0 (C-4'), 152.4 (C-17), 145.3 (C-16), 140.2 (C-5), 132.1 y 132.0 (C-2' y C-6'), 127.0 (C-1'), 122.0 (C-6), 115.5 y 115.2 (C-3' y C-5'), 74.6 (C-3), 56.0 (C-21), 19.2 (C-18), 15.7 (C-19).

**EM-ESI *m/z*:** 469 ([M-H]<sup>+</sup>, 16% AR), 471 ([M + 2]<sup>+</sup>, 5% AR).

**p-clorobenzoato de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (5d)**



$C_{28}H_{32}Cl_2O_3$  **PM:** 486.17 g/mol **Rendimiento:** 53%

**Pf:** 202-204 °C **R<sub>f</sub>:** 0.7 (sistema I)

**UV (nm):** 244.52

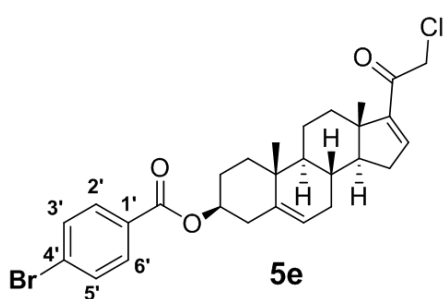
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3036.85 (C=C-H); 2968.22, 2931.50, 2865.63 (C-H alifático); 1721.22 (C=O éster); 1658.87 (C=O cetona conjugada); 1577.95 (C=C); 1273.72, 1232.10 (C-O éster); 840.23 (sustitución *para*); 754.07 (C-Cl).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 7.98 (m, 2H, H-2' y H-6'), 7.41 (m, 2H, H-3' y H-5'), 6.79 (dd, *J* = 3.3, 1.9 Hz, 1H, H-16), 5.43 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, H-6), 4.85 (m, 1H, H-3), 4.31-4.44 (ABq, *J* = 14.5 Hz, 2H, H-21), 1.11 (s, 3H, H-18), 0.96 (s, 3H, H-19).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 189.1 (C-20), 165.2 (C=O éster), 152.4 (C-17), 145.5 (C-16), 140.2 (C-5), 139.2 (C-4'), 131.0 (C-2' y C-6'), 129.2 (C-1'), 128.6 (C-3' y C-5'), 122.2 (C-6), 74.8 (C-3), 56.0 (C-21), 19.3 (C-18), 15.8 (C-19).

**EM-ESI *m/z*:** 485 ([M-H]<sup>+</sup>, 10% AR), 487 ([M + 2]<sup>+</sup>, 3% AR).

**p-bromobenzoato de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (5e):**



$C_{28}H_{32}BrClO_3$  **PM:** 530.12 g/mol **Rendimiento:** 83%  
**Pf:** 218-219 °C (cristal líquido) **R<sub>f</sub>:** 0.7 (sistema I)

**UV (nm):** 246.42

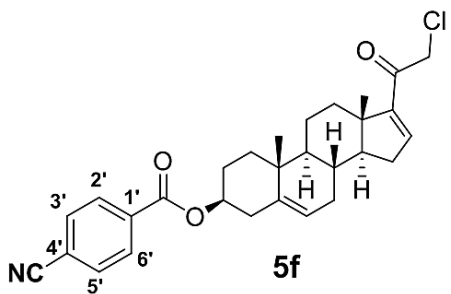
**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3033.13 (C=C-H); 2960.80, 2939.74, 2867.17 (C-H alifático); 1710.56 (C=O éster); 1658.23 (C=O cetona conjugada); 1587.63 (C=C); 1282.69, 1204.13 (C-O éster); 847.29 (sustitución *para*); 757.13 (C-Cl).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 7.91 (m, 2H, H-2' y H-6'), 7.59 (m, 2H, H-3' y H-5'), 6.80 (dd, *J* = 3.1, 1.8 Hz, 1H, H-16), 5.44 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-6), 4.84 (m, 1H, H-3), 4.31-4.45 (ABq, *J* = 14.5 Hz, 2H, H-21), 1.12 (s, 3H, H-18), 0.97 (s, 3H, H-19).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 189.1 (C-20), 165.3 (C=O éster), 152.4 (C-17), 145.4 (C-16), 140.1 (C-5), 131.6 (C-2' y C-6'), 131.1 (C-3' y C-5'), 129.7 (C-1'), 127.9 (C'4), 122.2 (C-6), 74.8 (C-3), 56.0 (C-21), 19.3 (C-18), 15.8 (C-19).

**EM-ESI *m/z*:** 529 ([M-H]<sup>+</sup>, 7% AR).

**p-cianobenzoato de 21-cloro-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (5f)**



$C_{29}H_{32}ClNO_3$  **PM:** 477.21 g/mol **Rendimiento:** 33%  
**Pf:** 236-238 °C (cristal líquido) **R<sub>f</sub>:** 0.7 (sistema I)

**UV (nm):** 243.91

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3034.57, 3051-81 (C=C-H); 2967.21, 2931.33, 2866.10 (C-H alifático); 2233.98 (C≡N); 1721.10 (C=O éster); 1660.19 (C=O cetona conjugada); 1577.04 (C=C); 1274.51 (C-O éster); 845.49 (sustitución *para*); 763.48 (C-Cl).

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.14 (m, 2H, H-2' y H-6'), 7.74 (m, 2H, H-3' y H-5'), 6.80 (dd, *J* = 3.0, 1.7 Hz, 1H, H-16), 5.44 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-6), 4.88 (m, 1H, H-3), 4.32-4.45 (ABq, *J* = 14.5 Hz, 2H, H-21), 1.11 (s, 3H, H-18), 0.96 (s, 3H, H-19).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 189.1 (C-20), 164.3 (C=O éster), 152.4 (C-17), 145.5 (C-16), 139.9 (C-5), 134.6 (C'4), 132.2 (C-2' y C-6'), 130.1 (C-3' y C-5'), 122.4 (C-1'), 118.1 (C-6), 116.2 (CN), 75.5 (C-3), 56.0 (C-21), 19.3 (C-18), 15.8 (C-19).

**EM-ESI *m/z*:** 478 ([M+H]<sup>+</sup>, 13% AR), 480 ([M + 2]<sup>+</sup>, 4% AR), 442 ([M-HCl], 12% AR), 400 ([M-COCH<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup>, 11% AR).



---

### 9.3. Desarrollo biológico

#### 9.3.1. *Ensayo in vitro: inhibición de proliferación de la línea celular cancerosa PC-3*

El ensayo *in vitro* se llevó a cabo en la unidad de pruebas biológicas del Instituto de Química de la UNAM por la M. en C. Teresa Apan Ramírez.

Se determinó el porcentaje de inhibición de proliferación de la línea celular PC-3 (carcinoma de próstata) por el método de Sulforrodamina B para los compuestos **3, 4, 5a-f**.

Las células se cultivaron en un medio RPMI-1640 enriquecido con un 10% de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 100 UI/mL de Penicilina G, 100 µg/mL de anfotericina B y 1% de aminoácidos no esenciales. Se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Posteriormente, se tomó 100 µL de la línea celular (el contenido de células por pozo varía entre 5 000- 10 000) y se incubó por 24 h. Después, se preparó una solución stock en DMSO de cada compuesto a evaluar y se adicionó a cada pozo de la línea celular en 100 µL de medio de cultivo, siendo la concentración final de cada compuesto de 50 µM. Se incubaron por 48 h. Adicionalmente, se preparó un blanco, el cual consiste en un pozo sólo con medio de cultivo; éste se cultivó únicamente por una hora. Ambas incubaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 37 °C con una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa.

Finalizado el tiempo de incubación, se procedió a la fijación de los cultivos celulares *in situ* por la adición de 50 µL de ácido tricloroacético al 50% frío. Se incubaron por 60 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante, se hicieron cinco lavados con agua ionizada y se dejó secar por 24 h.

Seguidamente, se realizó el tñido adicionando 100 µL de sulforrodamina B (0.4% m/v en AcOH) a cada pozo y se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se hicieron lavados con AcOH al 1% y se dejó secar por 24 h. Después, las células fijadas se resuspendieron con 10 mM de buffer Tris (pH=10) y se colocaron en agitación por 5 minutos. Finalmente, se determinó la densidad óptica (DO) a 515 nm utilizando un lector de ELISA. Los experimentos se realizaron por triplicado.

---

La DO es directamente proporcional al crecimiento celular e inversamente proporcional al grado de inhibición de proliferación celular, por lo que el porcentaje de inhibición se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición de proliferación} = 100 - \left[ \frac{DO \text{ muestra}}{DO \text{ vehículo}} * 100 \right]$$

Los resultados fueron expresados mediante estadística descriptiva con promedios y desviación estándar.

### 9.3.2. *Ensayo de toxicidad in vitro: inhibición de proliferación de HGF*

Los fibroblastos gingivales humanos primarios (HGF) fueron extraídos del paladar duro de pacientes sanos y el cultivo primario fue donado por el Dr. Carlos Hernández y la Dra. Eileen Uribe-Querol de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Los HGF se cultivaron en un medio Dulbecco's Modified Eagle con un 10% de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 100 UI/mL de Penicilina G, 100 µg/mL de anfotericina B y 1% de aminoácidos no esenciales. Se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Se utilizó el ensayo de Sulforrodamina B después de la exposición de los HGF con los compuestos de prueba a las concentraciones 25 y 50 µM, por 48 horas.

La metodología que se llevó a cabo fue la misma que la reportada para la evaluación en la línea celular PC-3 en el apartado anterior.

---

## 10. REFERENCIAS

1. IUPAC, The nomenclature of steroids. *Eur. J. Biochem.* **1989**, 186 (3), 429-458.
2. Lednicer, D., *Steroid Chemistry at a glance*. Wiley: Sussex, 2011.
3. Norman, A. W.; Henry, H. L., Chapter 2 - Steroid Hormones: Chemistry, Biosynthesis and Metabolism. En *Hormones* 3° ed.; Academic Press: San Diego, 2015; pp 27-53.
4. Moss, G., Basic terminology of stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry* **2009**, 68 (12), 2193-2222.
5. Henry, H. L., Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, 25 (4), 531-41.
6. Miller, W. L.; Auchus, R. J., The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocr. Rev.* **2011**, 32 (1), 81-151.
7. Bremer, A. A.; Miller, W. L., Chapter 13 - Regulation of Steroidogenesis. En *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, Academic Press: San Diego, 2014; pp 207-227.
8. Rang, H. P., *Rang y Dale. Farmacología*. 6° ed.; Elsevier: Barcelona, 2008.
9. The PEP project. [http://www.thepepproject.net/Load/student/PEP\\_M6.pdf](http://www.thepepproject.net/Load/student/PEP_M6.pdf) (accesado Marzo 5, 2016).
10. Velasco, M., *Farmacología fundamental*. McGrawHill Iberoamericana: Madrid, 2004.
11. Rojas-Durán F. , M.-D. J., Soto A. , Aranda-Abreu G., Juárez E., El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática. *eNeurobiología* **2011**, 2 (4), 230511
12. Norman, A. W.; Henry, H. L., Chapter 12 - Androgens. En *Hormones* 3° ed.; Academic Press: San Diego, 2015; pp 255-273.
13. Brown, T. R., Androgen Action. En *Androgens en Health and Disease*, Bagatell, C. J.; Bremner, W. J., Eds. Humana Press: New Jersey, 2003; pp 23-44.
14. So, A. I.; Hurtado-Coll, A.; Gleave, M. E., Androgens and prostate cancer. *World J. Urol.* **2003**, 21 (5), 325-337.

- 
15. Stocco, D. M.; McPhaul, M. J., Chapter 20 - Physiology of Testicular Steroidogenesis En *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3° ed.; Academic Press: St. Louis, 2006; pp 977-1016.
  16. Porth, C. M., *Fisiopatología. Salud-Enfermedad: un enfoque conceptual*. 7° ed.; Panamericana: México, 2009.
  17. Isaacs, J. T., Role of Androgens in Prostatic Cancer. En *Vitamins & Hormones*, Gerald, L., Ed. Academic Press:Londres, 1994; Vol. 49, pp 433-502.
  18. Chatterjee, B., The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, 253 (1-2), 89-101.
  19. OMS Cáncer. [www.who.int/topics/cancer/es/](http://www.who.int/topics/cancer/es/) (accesado Marzo 7, 2016).
  20. NIH, Prostate Cancer. [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov) (accesado Marzo 7, 2016).
  21. Center, M. M.; Jemal, A.; Lortet-Tieulent, J.; Ward, E.; Ferlay, J.; Brawley, O.; Bray, F., International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur. Urol.* **2012**, 61 (6), 1079-92.
  22. GLOBOCAN 2012. [globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr) (accesado Marzo 7, 2016).
  23. INEGI. Estadísticas a propósito del Día de muertos. [www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/muertos0.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/muertos0.pdf) (accesado Marzo 7, 2016).
  24. Infirmitas. Cáncer de Próstata. [www.infirmitas.es/prostata-cancer-de/](http://www.infirmitas.es/prostata-cancer-de/) (accesado Marzo 9, 2016).
  25. Hara, T.; Miyazaki, H.; Lee, A.; Tran, C. P.; Reiter, R. E., Androgen Receptor and Invasion in Prostate Cancer. *Cancer Res.* **2008**, 68 (4), 1128-1135.
  26. Scardino, P. T., The prevention of prostate cancer. The dilemma continues. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 349 (3), 297-9.
  27. Nelson, W. G.; De Marzo, A. M.; Isaacs, W. B., Prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 349 (4), 366-81.
  28. Gronberg, H., Prostate cancer epidemiology. *Lancet.* **2003**, 361 (9360), 859-64.

- 
29. Huggins, C.; Hodges, C. V., Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res.* **1941**, *1* (4), 293-297.
30. Vasaitis, T. S.; Bruno, R. D.; Njar, V. C., CYP17A1 inhibitors for prostate cancer therapy. *J. Steroid Biochem.* **2011**, *125* (1-2), 23-31.
31. Marks, L. S.; Mostaghel, E. A.; Nelson, P. S., Prostate tissue androgens: history and current clinical relevance. *Urology* **2008**, *72* (2), 247-254.
32. Holzbeierlein, J.; Lal, P.; LaTulippe, E.; Smith, A.; Satagopan, J.; Zhang, L.; Ryan, C.; Smith, S.; Scher, H.; Scardino, P.; Reuter, V.; Gerald, W. L., Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164* (1), 217-27.
33. Attard, G.; Reid, A. H.; Yap, T. A.; Raynaud, F.; Dowsett, M., Phase I clinical trial of a selective inhibitor of CYP17A1, abiraterone acetate, confirms that castration-resistant prostate cancer commonly remains hormone driven. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26* (28), 4563-71.
34. Chen, M.; Penning, T. M., 5beta-Reduced steroids and human Delta(4)-3-ketosteroid 5beta-reductase (AKR1D1). *Steroids* **2014**, *83*, 17-26.
35. Debes, J. D.; Tindall, D. J., Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351* (15), 1488-90.
36. Yin, L.; Hu, Q.; Hartmann, R. W., Recent Progress in Pharmaceutical Therapies for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (7), 13958-13978.
37. Meng, M., Prostate cancer. En *Current medical diagnosis & treatment 2011*, 50° ed.; McPhee, S., Ed. McGraw-Hill: San Francisco, 2011.
38. Hu, Q.; Hartmann, R. W., Chapter 11 - The Renaissance of CYP17A1 Inhibitors for the Treatment of Prostate Cancer. En *Cancer Drug Design and Discovery*, 2° ed.; Academic Press: San Diego, 2014; pp 319-356.
39. Instituto de Cirugía Urológica Avanzada. [www.icua.es/urologia-avanzada/crioterapia-del-cancer-de-prostata/](http://www.icua.es/urologia-avanzada/crioterapia-del-cancer-de-prostata/) (accesado Marzo 9, 2016).

- 
40. Pont, A.; Williams, P. L.; Loose, D. S.; Feldman, D.; Reitz, R. E.; Bochra, C.; Stevens, D. A., Ketoconazole Blocks Adrenal Steroid Synthesis. *Ann. Intern. Med.* **1982**, *97* (3), 370-372.
41. Pont, A.; Williams, P. L.; Azhar, S.; et al., Ketoconazole blocks testosterone synthesis. *Arch. Intern. Med.* **1982**, *142* (12), 2137-2140.
42. Pollack, A., New drugs fight prostate cancer, but at high cost. *The New York Times*, *Junio 27*, 2011.
43. Chung, B. C.; Picado-Leonard, J.; Haniu, M.; Bienkowski, M.; Hall, P. F.; Shively, J. E.; Miller, W. L., Cytochrome P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84* (2), 407-11.
44. Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S., Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (9), 3947-3980.
45. Salvador, J.; Moreira, V.; Silvestre, S., Chapter 12-Steroidal CYP17A1 Inhibitors for Prostate Cancer Treatment: From Concept to Clinic. En *Advances in Prostate Cancer*, Hamilton, G., Ed. InTech: 2013; pp 275-304.
46. Yoshimoto, F. K.; Auchus, R. J., The diverse chemistry of cytochrome P450 17A1 (P450c17, CYP17A1). *J. Steroid Biochem.* **2015**, *151*, 52-65.
47. Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I., Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (6), 2253-2278.
48. Arth, G. E.; Patchett, A. A.; Jefopoulos, T.; Bugianesi, R. L.; Peterson, L. H.; Ham, E. A.; Kuehl, F. A.; Brink, N. G., Steroidal androgen biosynthesis inhibitors. *J. Med. Chem.* **1971**, *14* (8), 675-679.
49. Trachtenberg, J., Ketoconazole therapy in advanced prostatic cancer. *J. Urol.* **1984**, *132* (1), 61-63.
50. Bruno, R. D.; Njar, V. C., Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (15), 5047-60.
51. Jarman, M.; John Smith, H.; J. Nicholls, P.; Simons, C., Inhibitors of enzymes of androgen biosynthesis: cytochrome P45017 and 5 $\alpha$ -steroid reductase. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15* (5), 495-512.

- 
52. Moreira, V. M.; Vasaitis, T. S.; Njar, V. C.; Salvador, J. A., Synthesis and evaluation of novel 17-indazole androstene derivatives designed as CYP17A1 inhibitors. *Steroids* **2007**, 72 (14), 939-48.
53. Ryan, C. J.; Smith, M. R.; Fong, L.; Rosenberg, J. E.; Kantoff, P.; Raynaud, F.; Martins, V.; Lee, G.; Kheoh, T.; Kim, J.; Molina, A.; Small, E. J., Phase I clinical trial of the CYP17A1 inhibitor abiraterone acetate demonstrating clinical activity in patients with castration-resistant prostate cancer who received prior ketoconazole therapy. *J. Clin. Oncol.* **2010**, 28 (9), 1481-8.
54. Purushottamachar, P.; Godbole, A. M.; Gediya, L. K.; Martin, M. S.; Vasaitis, T. S.; Kwegyir-Afful, A. K.; Ramalingam, S.; Ates-Alagoz, Z.; Njar, V. C., Systematic structure modifications of multitarget prostate cancer drug candidate galeterone to produce novel androgen receptor down-regulating agents as an approach to treatment of advanced prostate cancer. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (12), 4880-98.
55. Hara, T.; Kouno, J.; Kaku, T.; Takeuchi, T.; Kusaka, M.; Tasaka, A.; Yamaoka, M., Effect of a novel 17,20-lyase inhibitor, orteronel (TAK-700), on androgen synthesis in male rats. *J. Steroid Biochem.* **2013**, 134, 80-91.
56. Baston, E.; Leroux, F. R., Inhibitors of steroidal cytochrome p450 enzymes as targets for drug development. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2007**, 2 (1), 31-58.
57. DeVore, N. M.; Scott, E. E., Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001. *Nature* **2012**, 482 (7383), 116-119.
58. Salvador, J. A.; Pinto, R. M.; Silvestre, S. M., Steroidal 5 $\alpha$ -reductase and 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17A1) inhibitors useful in the treatment of prostatic diseases. *J. Steroid Biochem.* **2013**, 137, 199-222.
59. Njar, V. C. O.; Klus, G. T.; Brodie, A. M. H., Nucleophilic vinylic "addition-elimination" substitution reaction of 3 $\beta$ -acetoxy-17-chloro-16-formylandrosta-5,16-diene: A novel and general route to 17-substituted steroids. Part 1 - synthesis of novel 17-azolyl- $\Delta$ 16 steroids; inhibitors of 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase (17 $\alpha$ -lyase). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6 (22), 2777-2782.
60. Njar, V. C.; Kato, K.; Nnane, I. P.; Grigoryev, D. N.; Long, B. J.; Brodie, A. M., Novel 17-azolyl steroids, potent inhibitors of human cytochrome 17  $\alpha$ -hydroxylase-C17,20-lyase (P450(17)  $\alpha$ ): potential agents for the treatment of prostate cancer. *J. Med. Chem.* **1998**, 41 (6), 902-12.

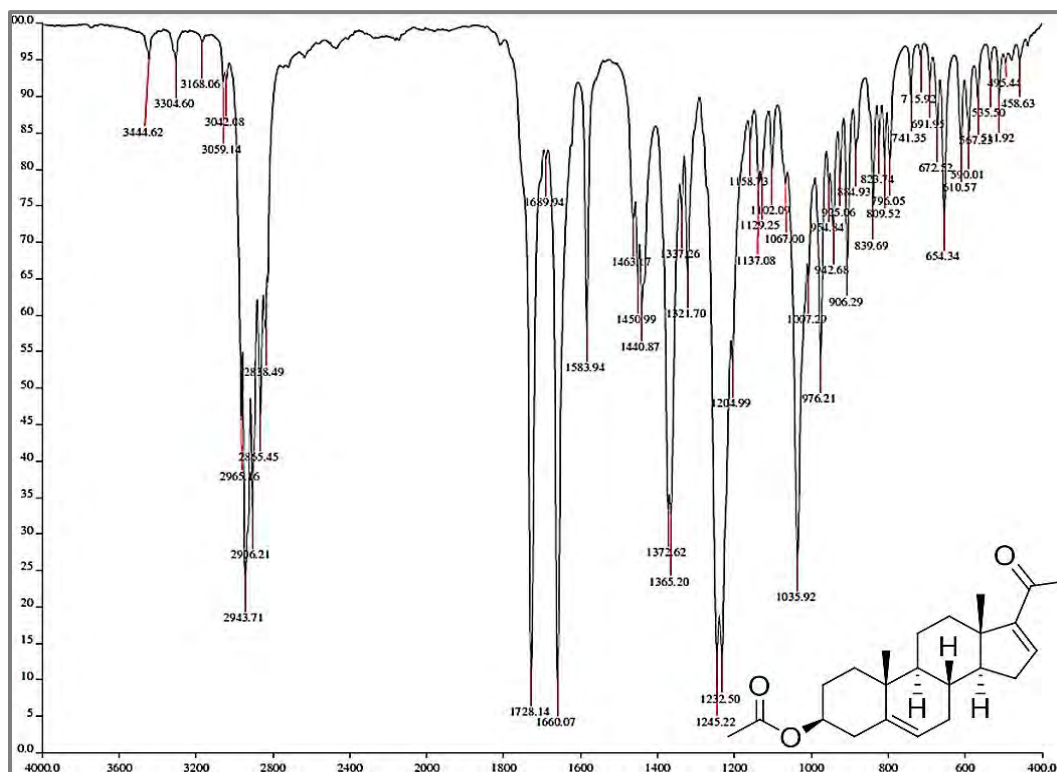
- 
61. Jarman, M.; Barrie, S. E.; Llera, J. M., The 16,17-Double Bond Is Needed for Irreversible Inhibition of Human Cytochrome P45017 $\alpha$  by Abiraterone (17-(3-Pyridyl)androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ol) and Related Steroidal Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (27), 5375-5381.
62. Silva-Ortiz, A. V.; Bratoeff, E.; Ramírez-Apan, T.; Heuze, Y.; Sánchez, A.; Soriano, J.; Cabeza, M., Synthesis and activity of novel 16-dehydropregnenolone acetate derivatives as inhibitors of type 1 5 $\alpha$ -reductase and on cancer cell line SK-LU-1. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (24), 7535-7542.
63. A. Chavez-Riveros, E. B., Y. Heuze, J. Soriano, I. Moreno, A. Sánchez-Márquez, M. Cabeza, Synthesis and identification of pregnenolone derivatives as inhibitors of isozymes of 5 $\alpha$ -reductase. *Arch. Pharm.* **2015**, *348*, 1-9.
64. Girdhar, N. K.; Ishar, M. P. S., Facile C21 functionalization through a novel functional group transfer reaction in 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxy-3 $\beta$ -hydroxypregn-5-en-20-one and its applications. *Chem. Comm.* **2002**, (18), 2102-2103.
65. Bain, B. M.; Phillipps, G. H.; Procopiou, P. A.; Steeples, I. P.; Upton, R. J., Rearrangement of a 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxy-16 $\beta$ -methylandrosta-17 $\beta$ -carbothioic Acid to a 17 $\beta$ -Mercapto-16 $\beta$ -methylandrosta-17 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -carbolactone. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (21), 7421-7424.
66. Neises, B.; Steglich, W., Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17* (7), 522-524.
67. Organic Chemistry Portal. Steglich esterification. [www.organic-chemistry.org/namedreactions/steglich-esterification.shtm](http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/steglich-esterification.shtm) (accesado Marzo 20, 2016).
68. Wade, L. G., *Química Orgánica*. 5 $^{\circ}$  ed.; Pearson: Madrid, 2004; p 1148.
69. Crawford, G. P.; Woltman, S. J.; Jay, G. D.; Scientific, W., *Liquid Crystals: Frontiers en Biomedical Applications*. World Scientific: New Jersey, 2007.
70. Center Molecular Materials for Photonics and Electronics. Universidad de Cambridge. [www-eng.cam.ac.uk/CMMPE/lcintro1.html](http://www-eng.cam.ac.uk/CMMPE/lcintro1.html) (accesado Marzo 25, 2016).
71. Introduction to Liquid Crystals. [plc.cwru.edu/tutorial/enhanced/files/lc/intro.htm](http://plc.cwru.edu/tutorial/enhanced/files/lc/intro.htm) (accesado Marzo 25, 2016).



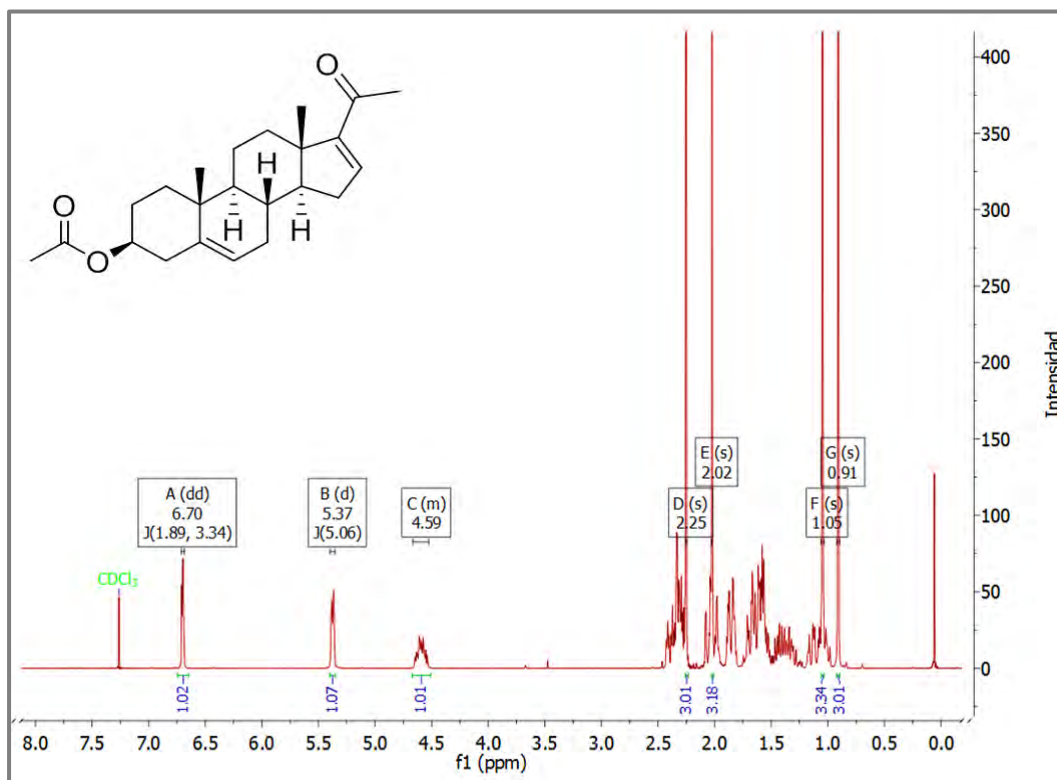
- 
72. Sluckin T., D. D., Stegemeyer H., The early period: liquid crystals or anisotropic liquids. En *Crystals that Flow: Classic papers from the history of liquid crystals*, Taylor & Francis: Londres, 2004; pp 3-24.
73. Lin, I. H.; Miller, D. S.; Bertics, P. J.; Murphy, C. J.; de Pablo, J. J.; Abbott, N. L., Endotoxin-induced structural transformations in liquid crystalline droplets. *Science (New York, N.Y.)* **2011**, 332 (6035), 1297-300.
74. Ajduković, J. J.; Djurendić, E. A.; Petri, E. T.; Klisurić, O. R.; Ćelić, A. S.; Sakač, M. N.; Jakimov, D. S.; Gaši, K. M. P., 17(E)-Picolinylidene androstane derivatives as potential inhibitors of prostate cancer cell growth: Antiproliferative activity and molecular docking studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21 (23), 7257-7266.
75. Blagosklonny, M. V.; Dixon, S. C.; Figg, W. D., Efficacy of microtubule-active drugs followed by ketoconazole in human metastatic prostate cancer cell lines. *J. Urol.* **2000**, 163 (3), 1022-1026.
76. Bruno, R. D.; Gover, T. D.; Burger, A. M.; Brodie, A. M.; Njar, V. C. O., 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20 lyase inhibitor VN/124-1 inhibits growth of androgen-independent prostate cancer cells via induction of the endoplasmic reticulum stress response. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, 7 (9), 2828-2836.
77. Zhang, Y.; Soboloff, J.; Zhu, Z.; Berger, S. A., Inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx is required for mitochondrial reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> depletion and cell death in leukemia cells. *Mol. Pharmacol.* **2006**, 70 (4), 1424-34.
78. Wang, W.-A.; Groenendyk, J.; Michalak, M., Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. *BBA - Mol. Cell Res.* **2014**, 1843 (10), 2143-2149.
79. Swiss Institute of Bioinformatics. Swiss Target Prediction. [www.swisstargetprediction.ch/](http://www.swisstargetprediction.ch/) (accesado Diciembre 22, 2015).
80. Gfeller, D.; Grosdidier, A.; Wirth, M.; Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V., SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res.* **2014**.
81. Gfeller, D.; Michielin, O.; Zoete, V., Shaping the interaction landscape of bioactive molecules. *Bioinformatics* **2013**, 29 (23), 3073-3079.
82. Protein Data Bank. [www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do) (accesado Diciembre 26, 2015).
83. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC*

- 
84. YASARA. [www.yasara.org/](http://www.yasara.org/) (accesado Diciembre 28, 2015).
85. Díaz-Ortiz, M. Síntesis y evaluación biológica de androst-4-en-3-onas con diferentes amidas N-disustituidas en el carbono C-17. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, 2015.
86. *Spartan'02, Wavefunction, Inc. Irvine, CA.* .
87. *AutoDock 4.2*. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *16*, 2785-91.
88. Trejo-Soto, P. Estudio de modelado por homología para determinar la estructura de la enzima arginina deiminasa de *Giardia intestinalis* y diseño de inhibidores. Tesis de Maestría, UNAM, México, 2013.
89. Ayub, M.; Levell, M., Structure-activity relationships of the inhibition of human placental aromatase by imidazole drugs including ketoconazole. *J. Steroid Biochem.* **1988**, *31* (1), 65-72.
90. Boron, W.; Boulpaep, E., *Medicinal Physiology: A Cellular and Molecular Approach*. Elsevier: Filadelfia, 2003; p 1300.

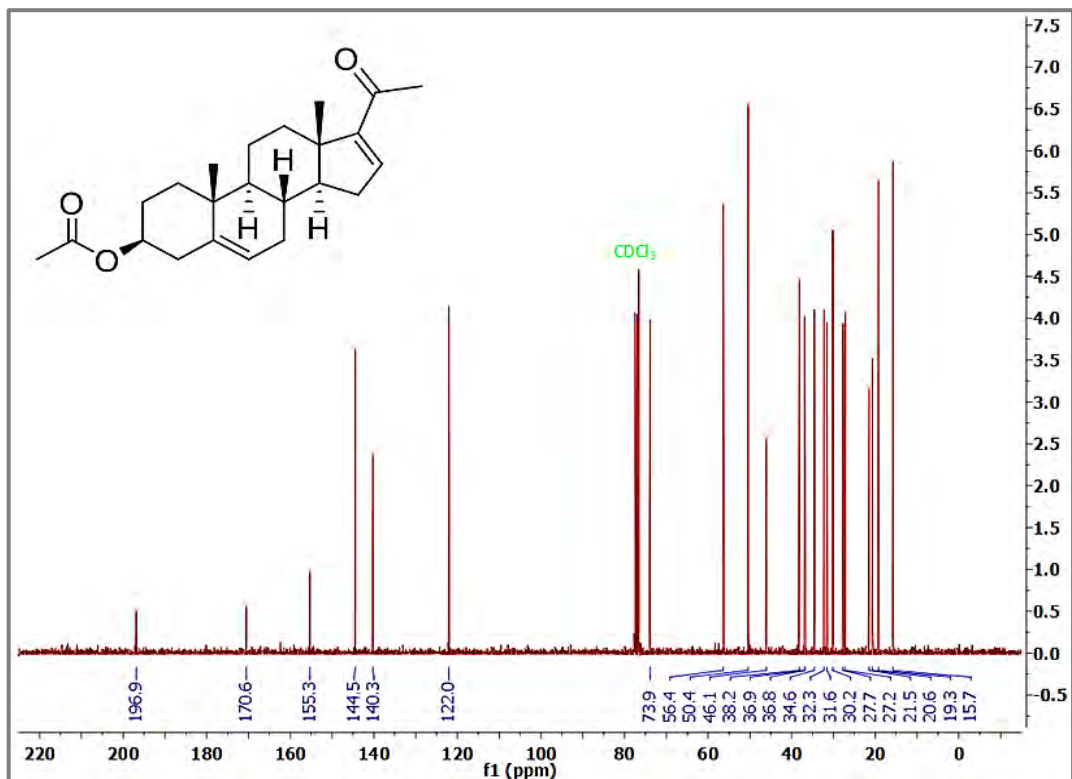
## 10. ANEXOS



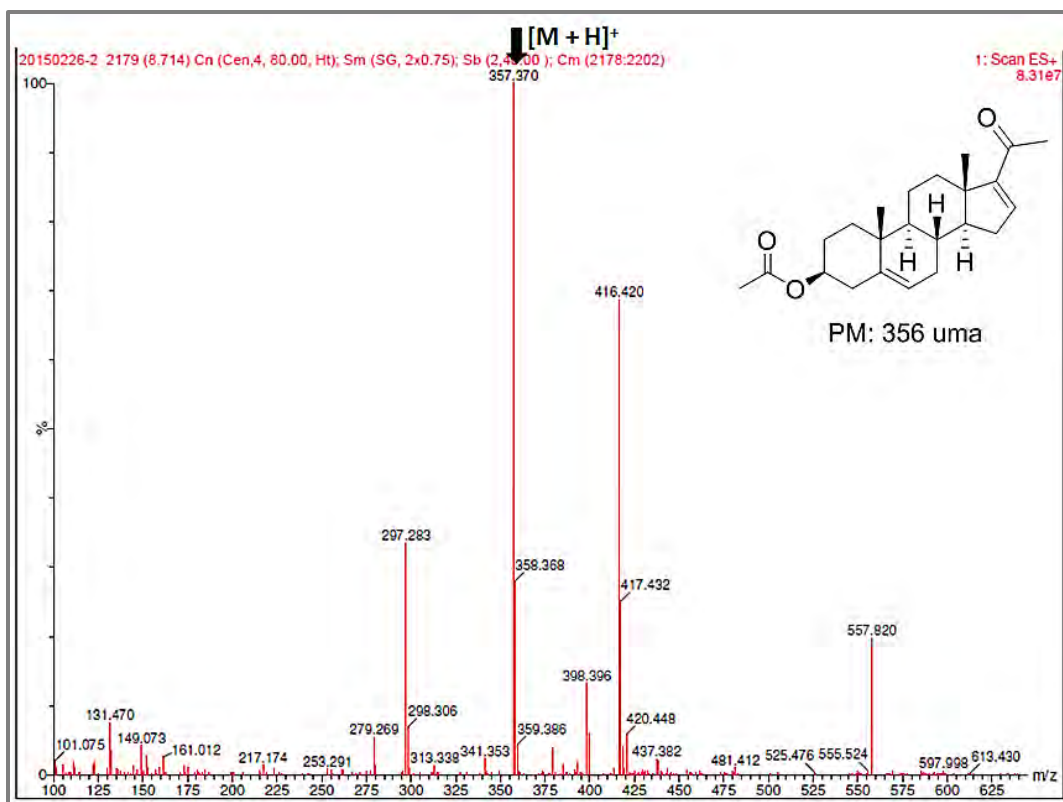
A1. Espectro de IR del compuesto 1.



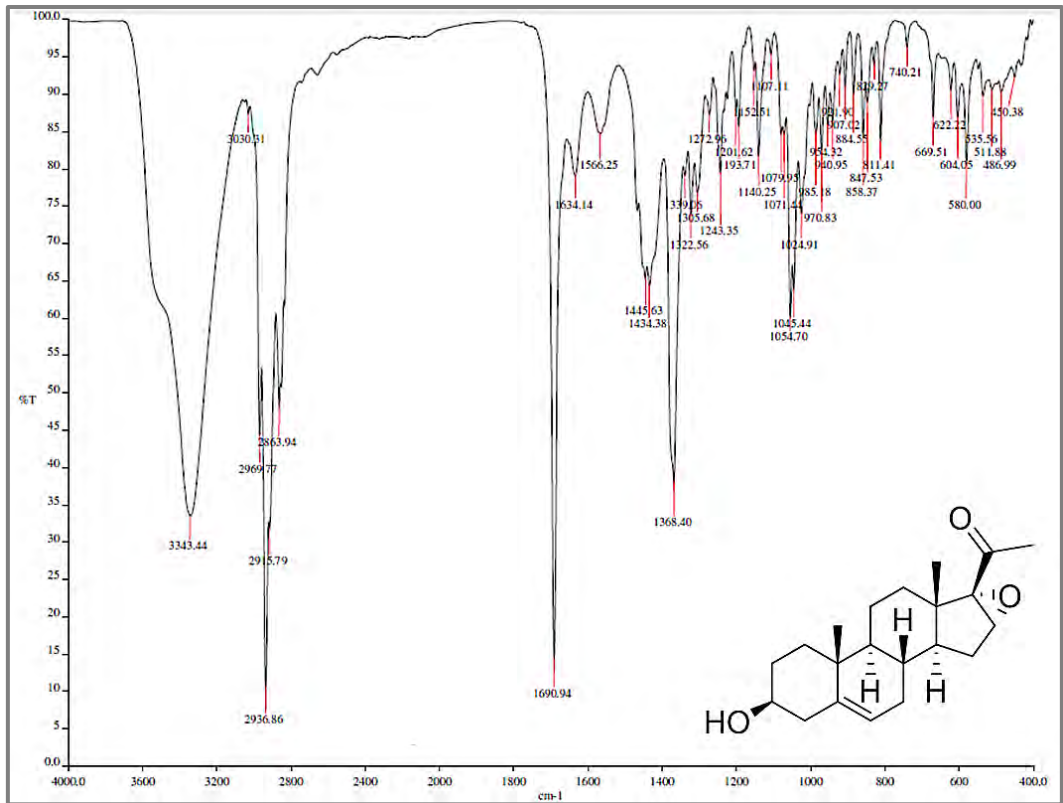
A2. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto 1.



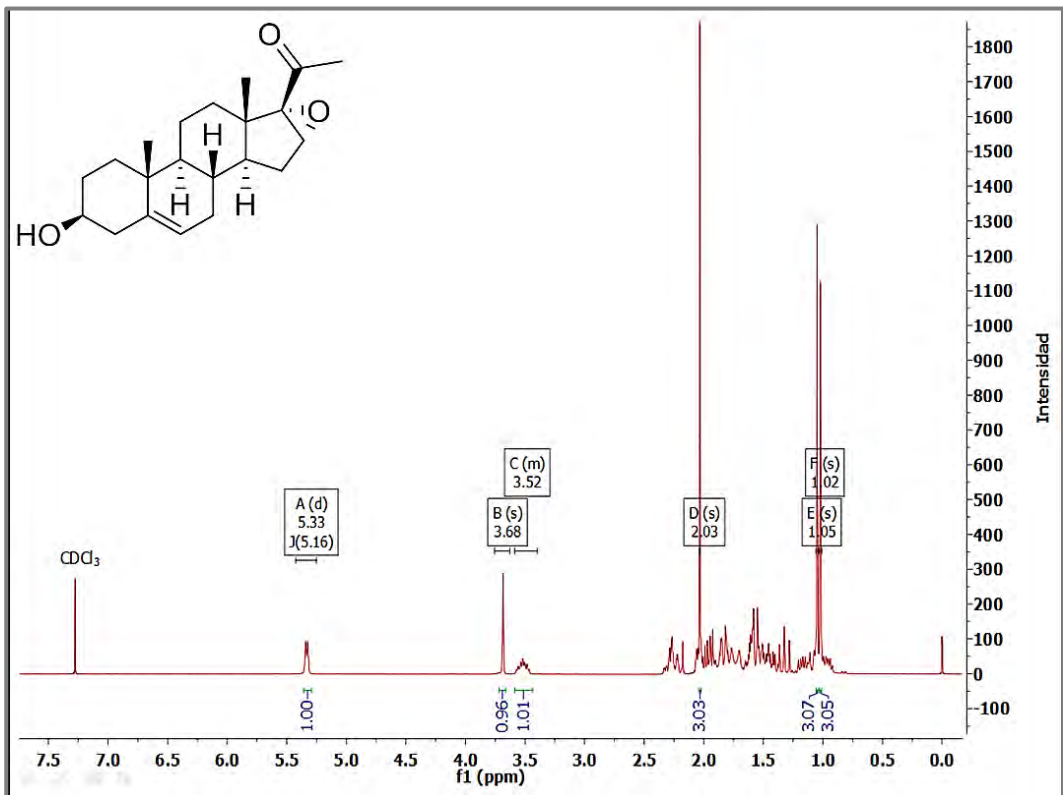
A3. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 1.



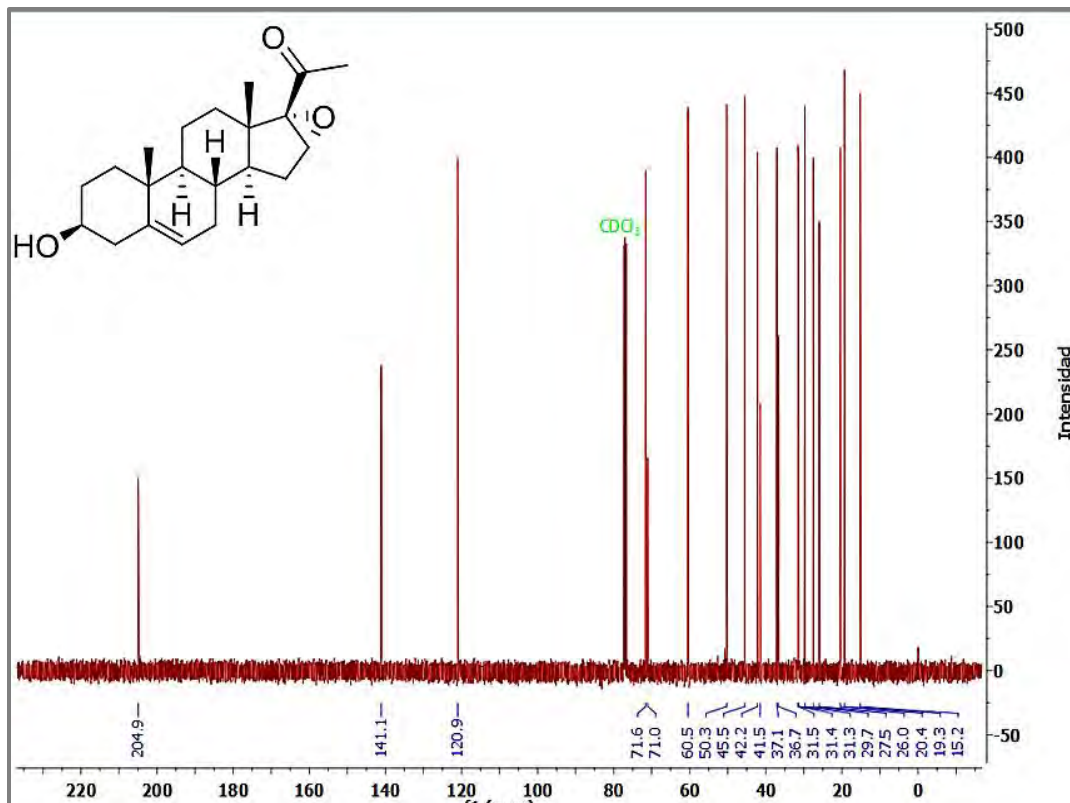
A4. Espectro de masas del compuesto 1. [Técnica: EM-ESI (+)].



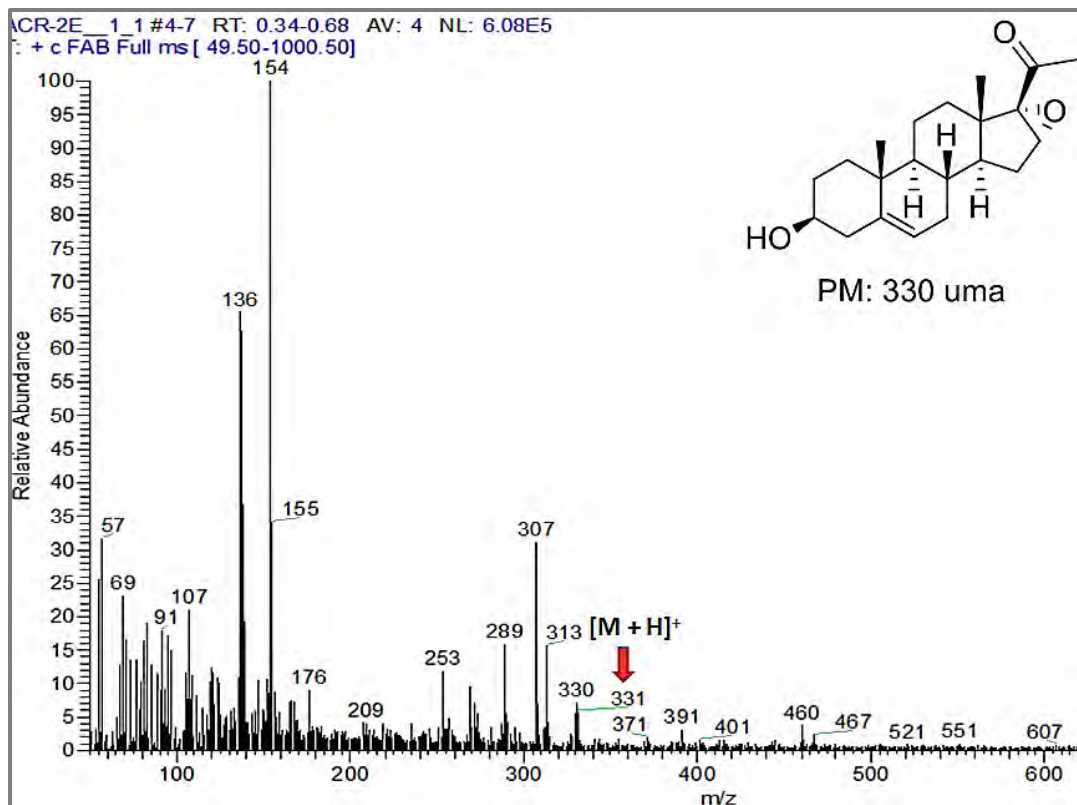
A5. Espectro de IR del compuesto 2.



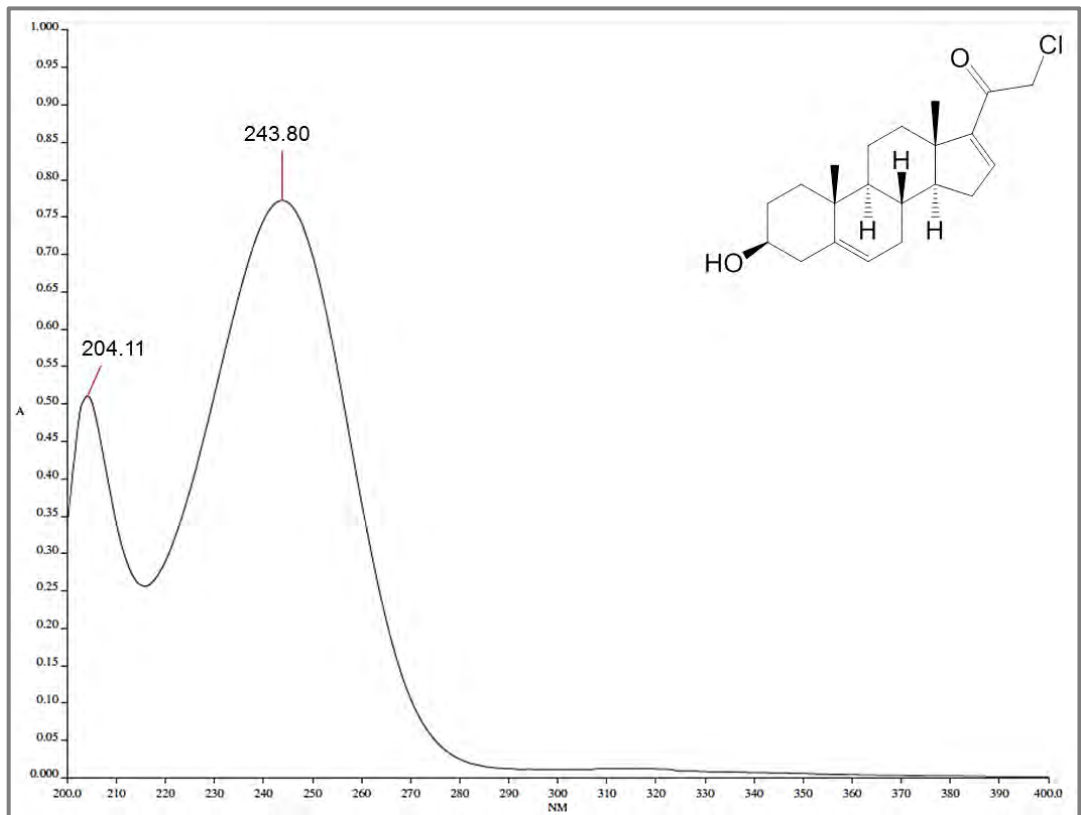
A6. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 2.



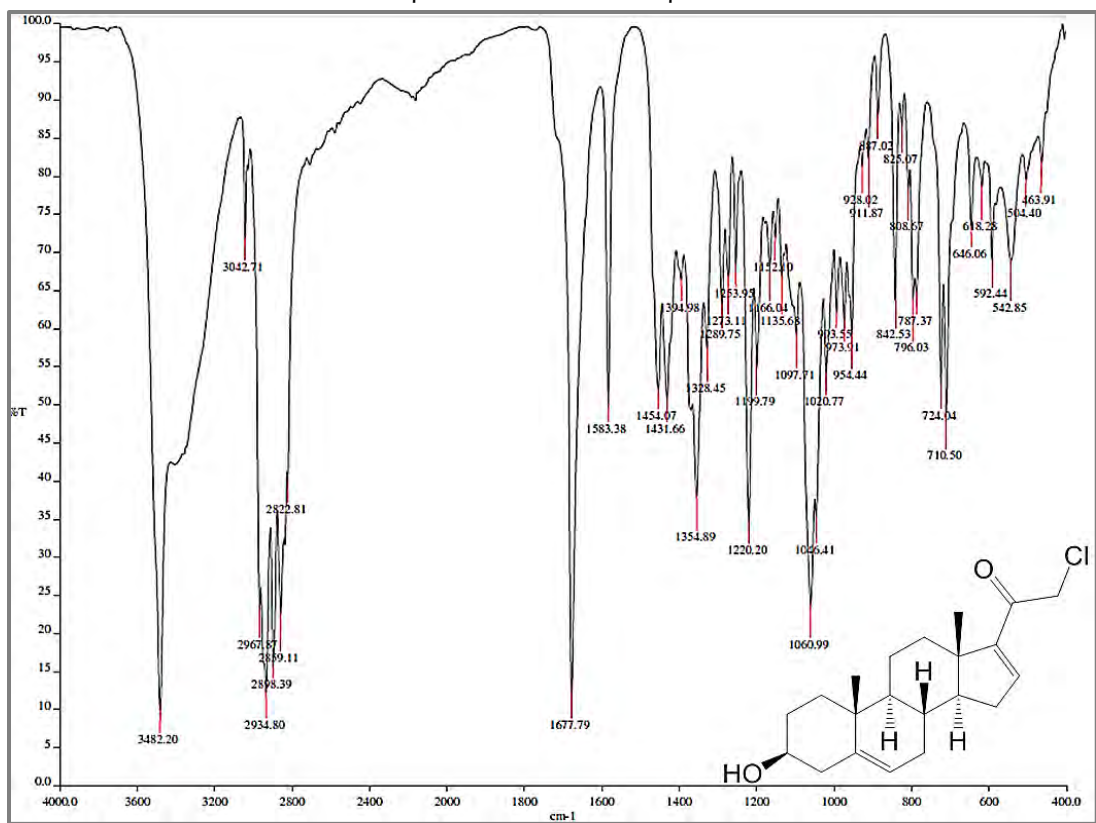
A7. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 2.



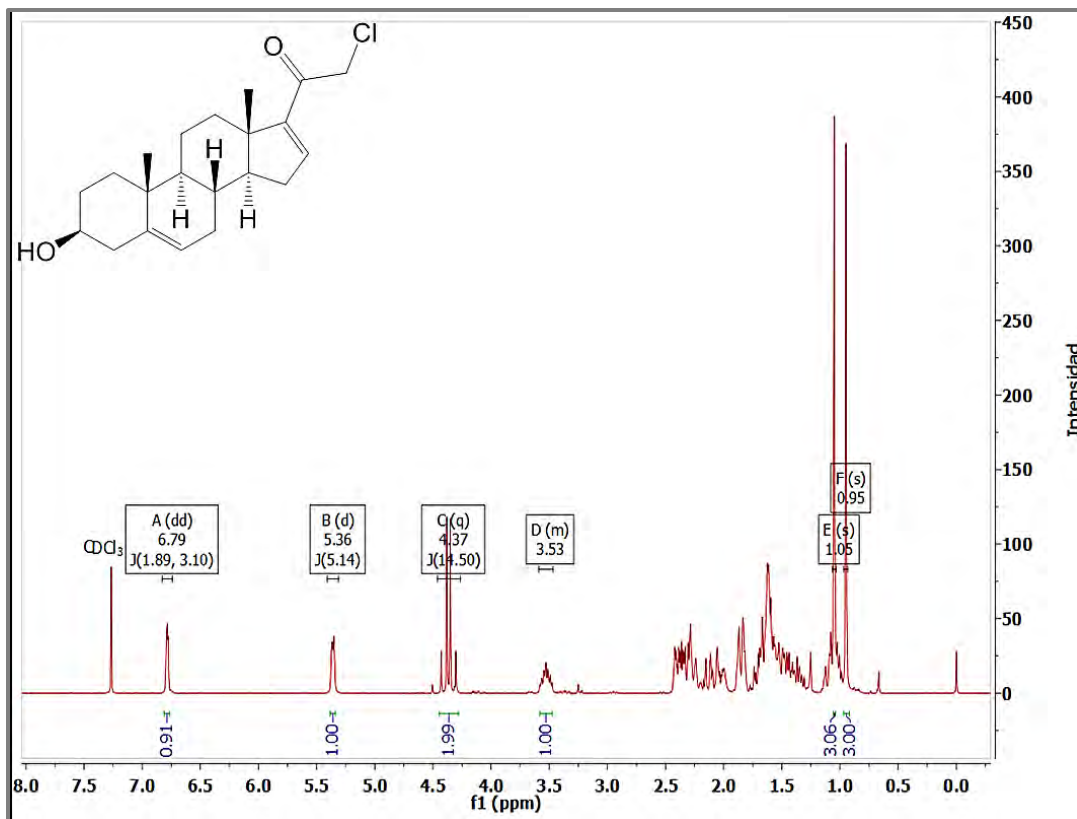
A8. Espectro de masas del compuesto 2. [Técnica: EM-FAB].



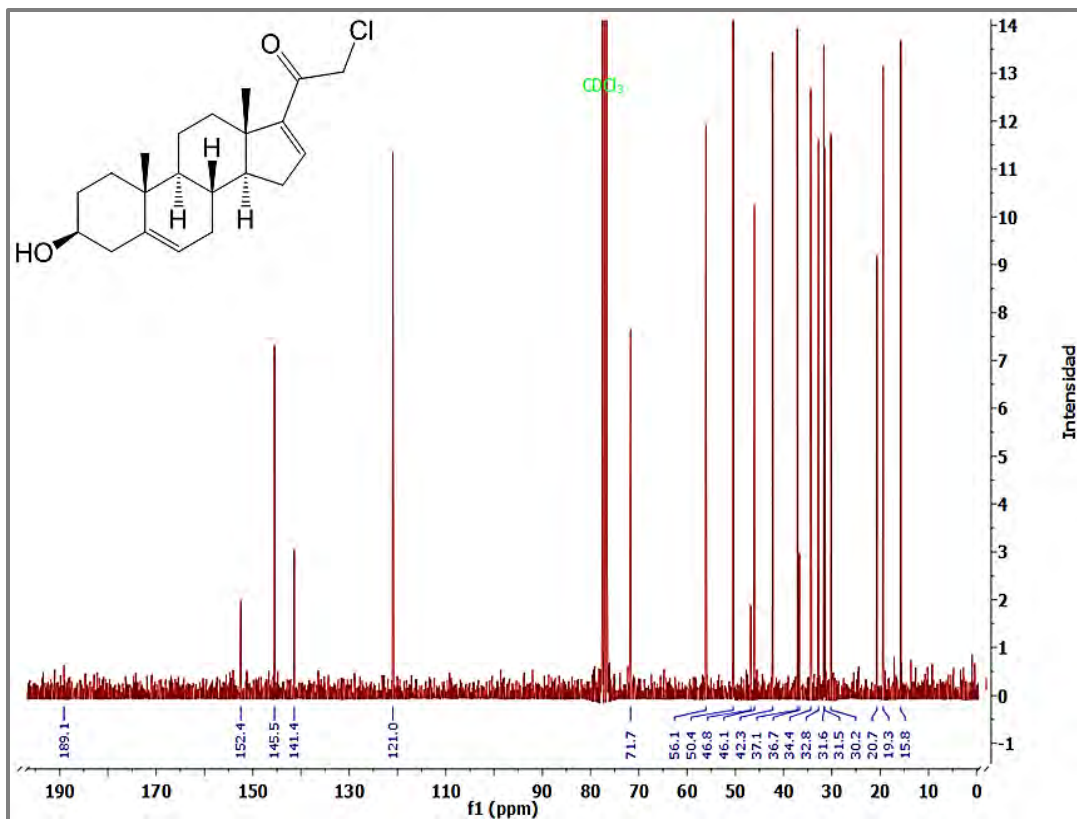
A9. Espectro de UV del compuesto 3.



A10. Espectro de IR del compuesto 3.

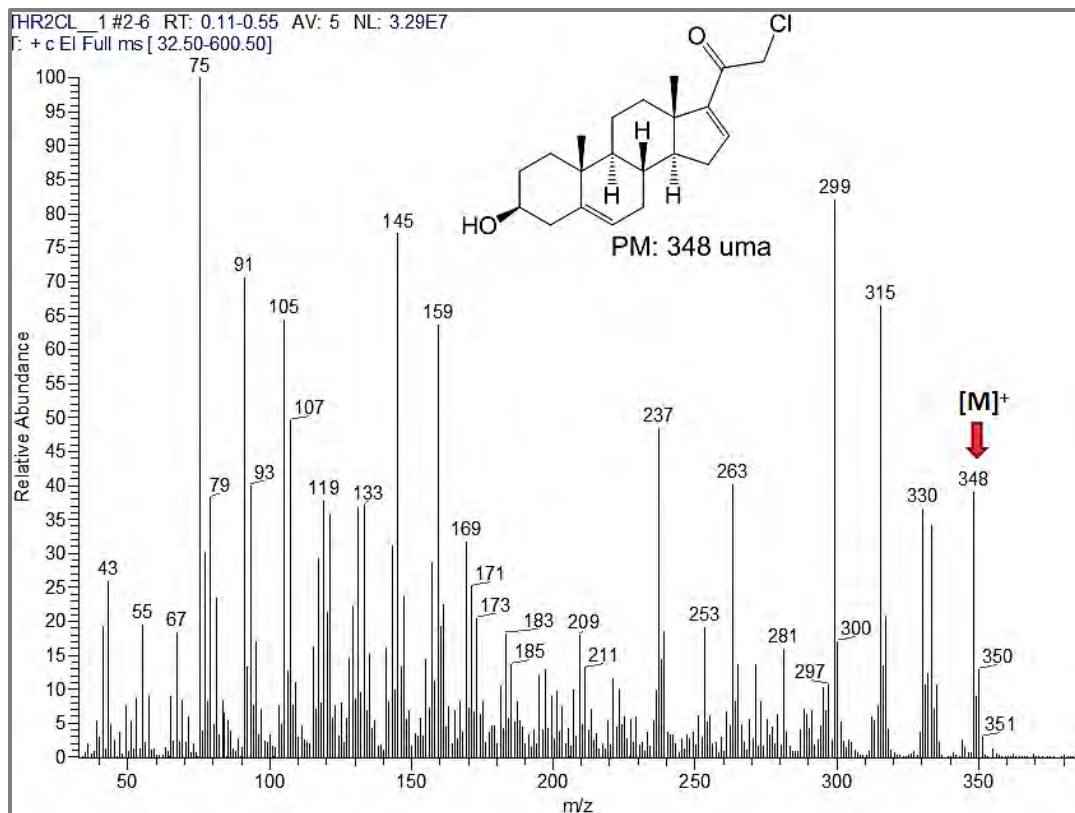


A11. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 3.

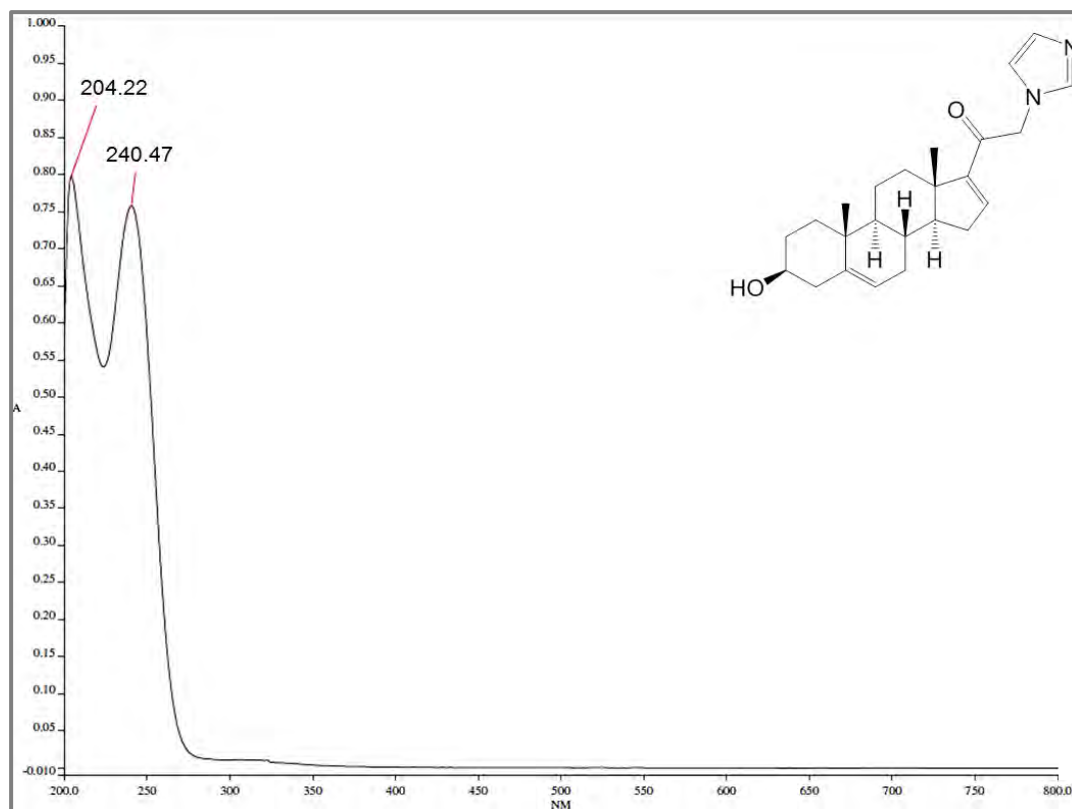


A12. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 3.

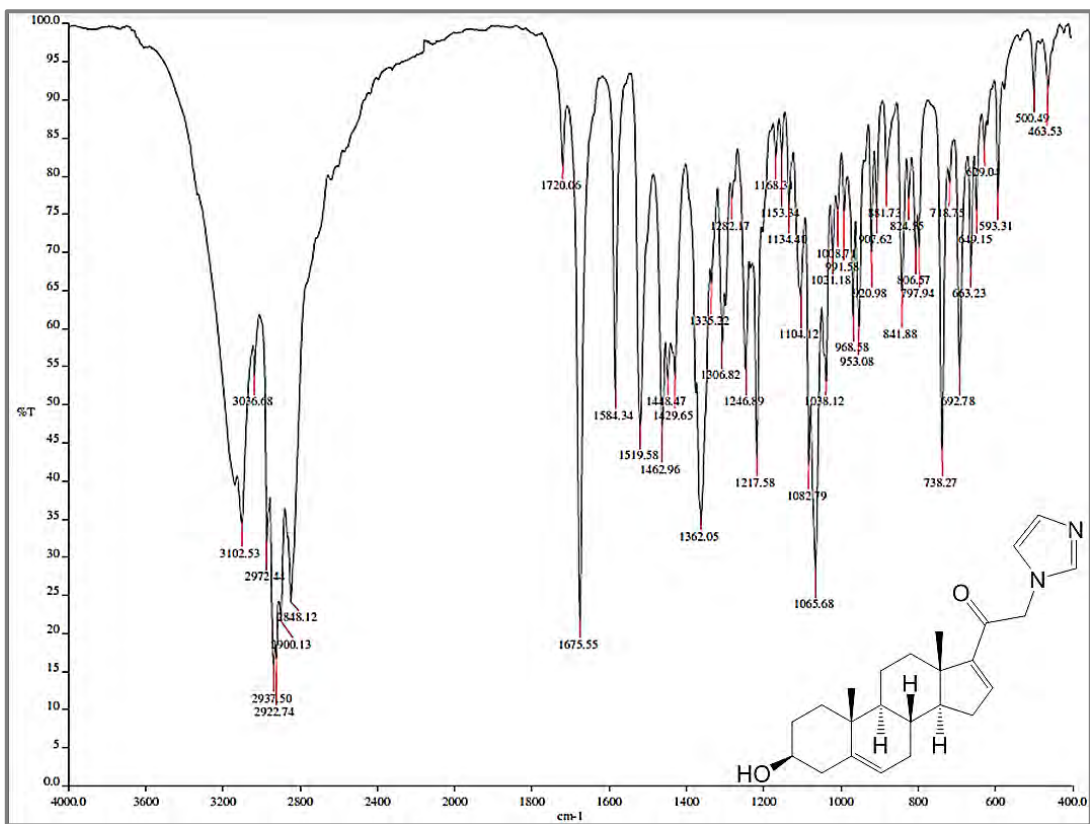




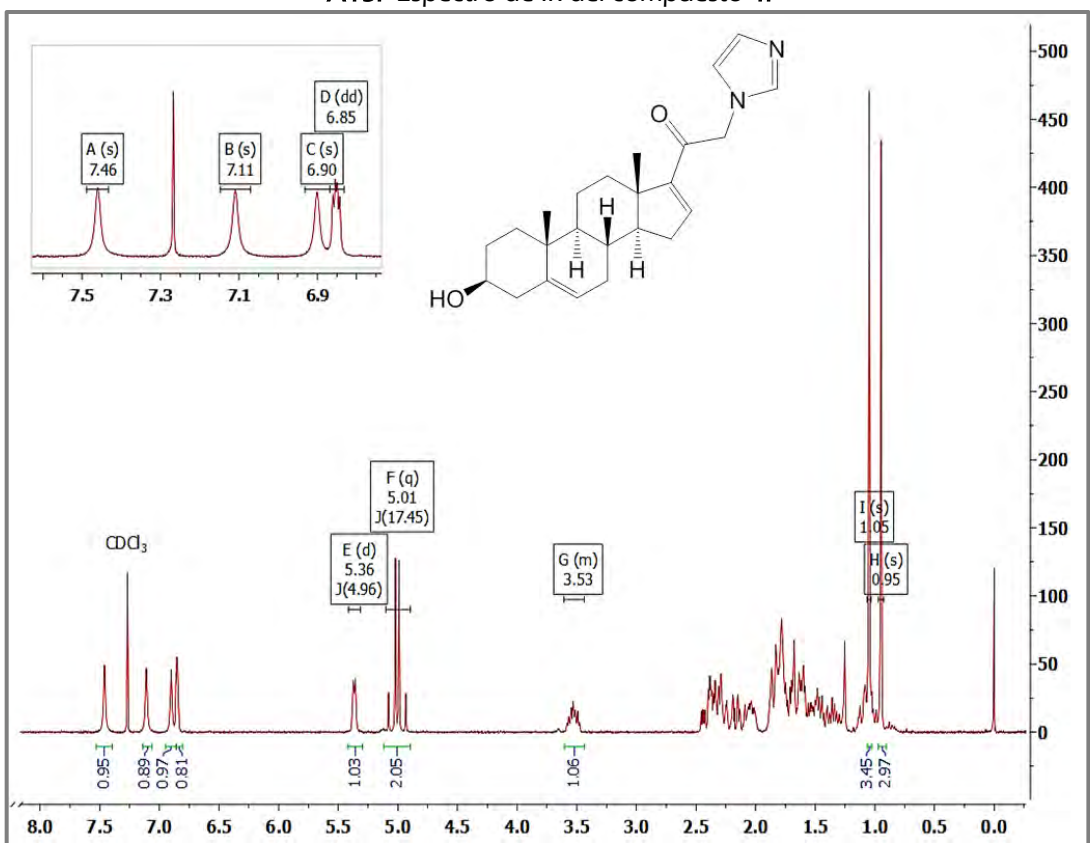
A13. Espectro de masas del compuesto 3. [Técnica: EM-IE].



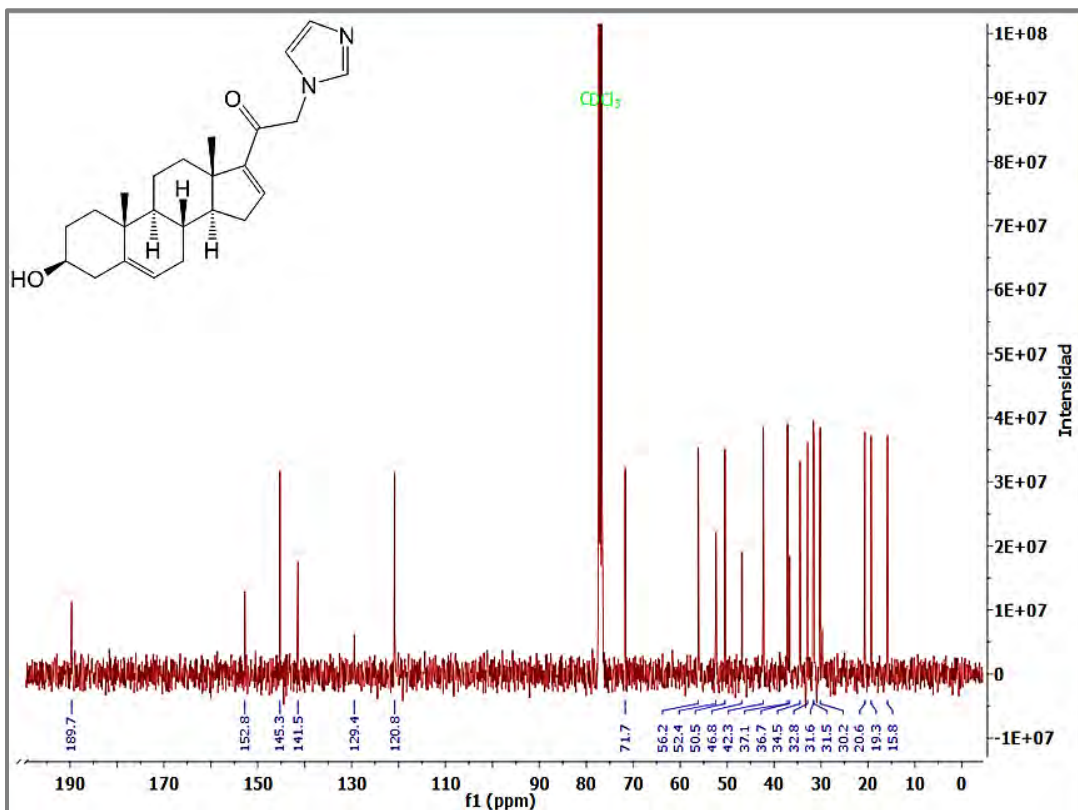
A14. Espectro de UV del compuesto 4.



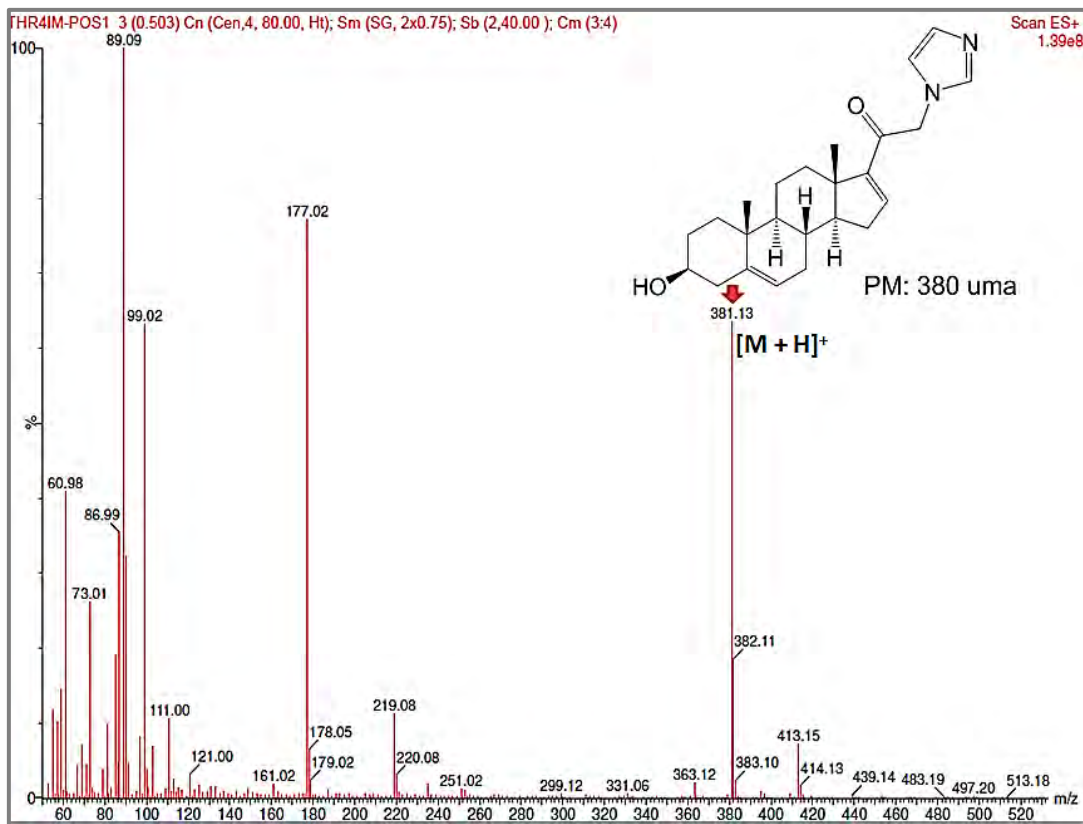
A15. Espectro de IR del compuesto 4.



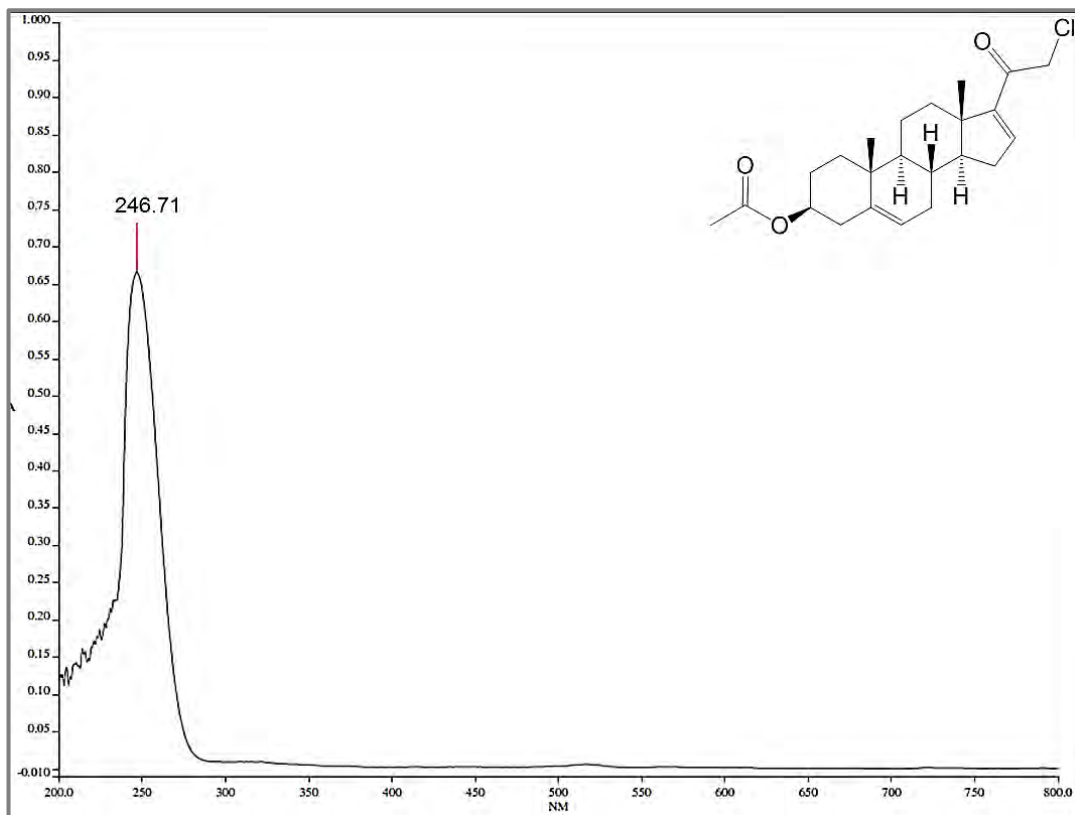
A16. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 4.



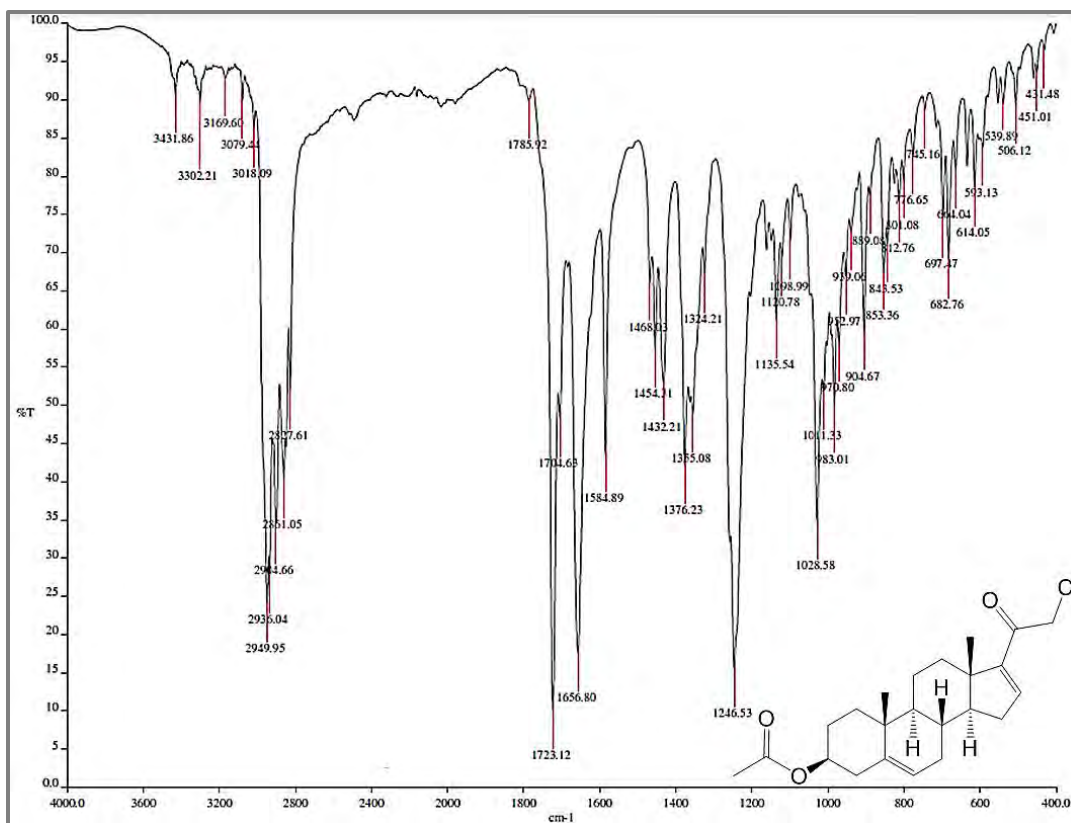
A17. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 4.



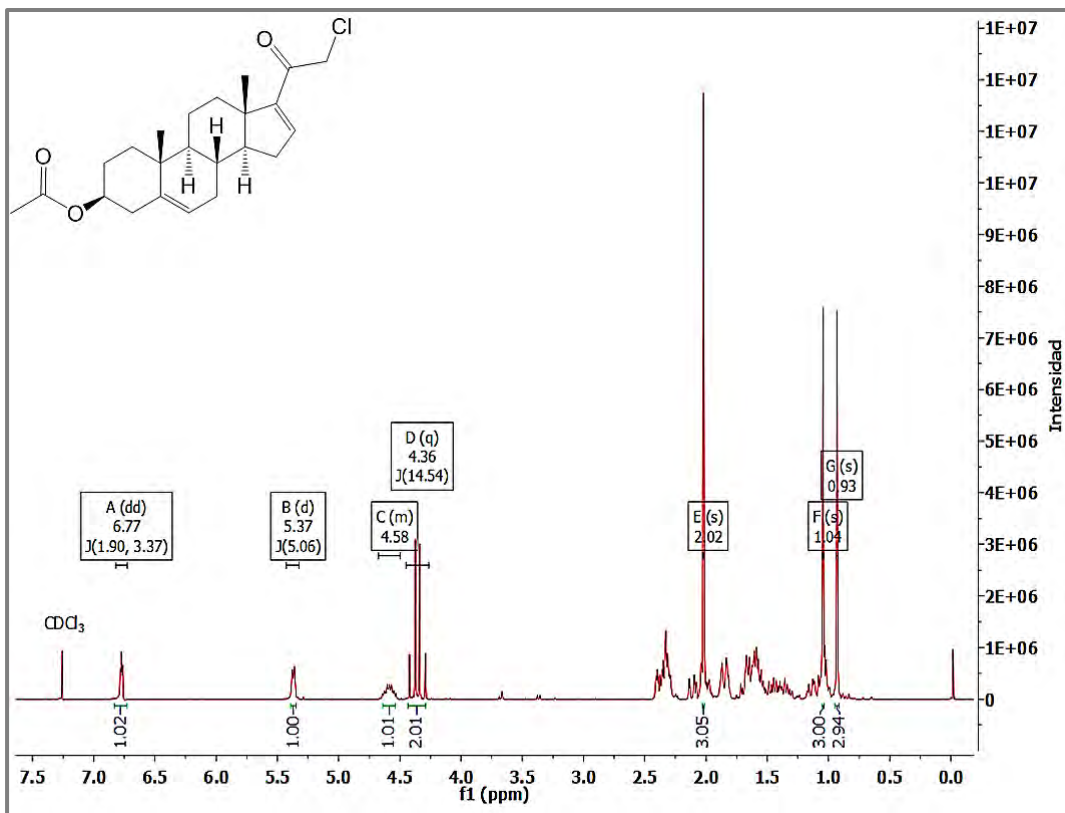
A18. Espectro de masas del compuesto 4. [Técnica: EM-ESI (+)].



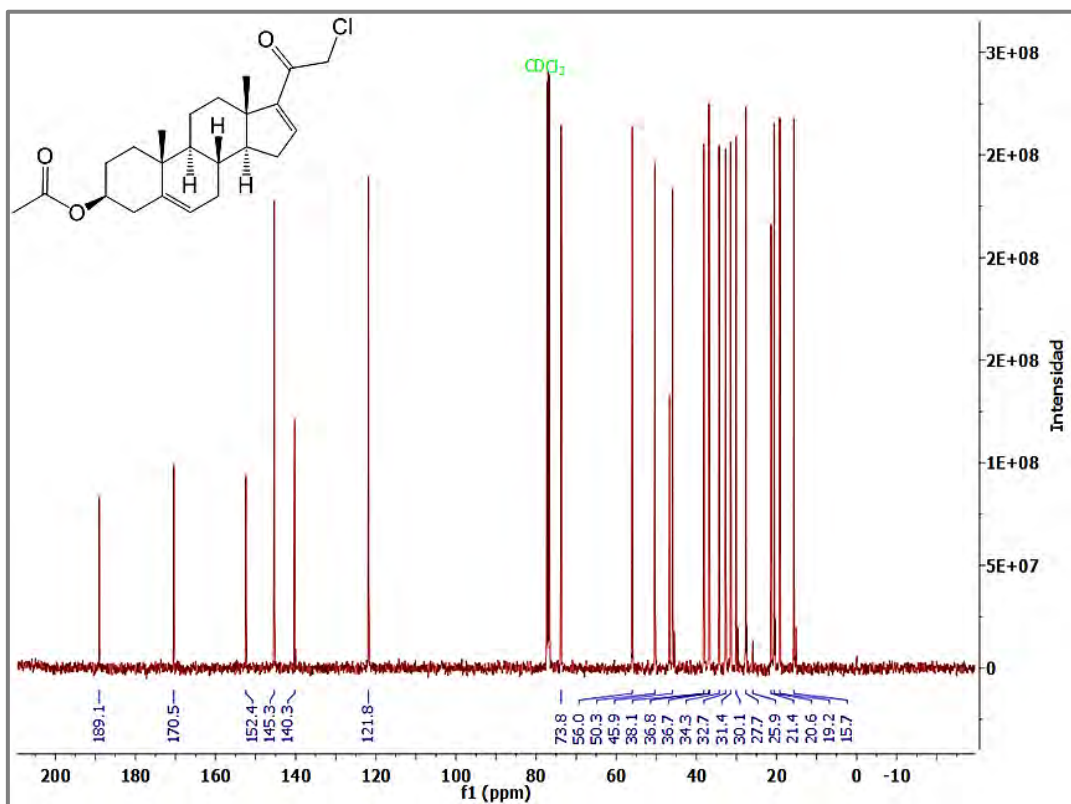
A19. Espectro de UV del compuesto 5a.



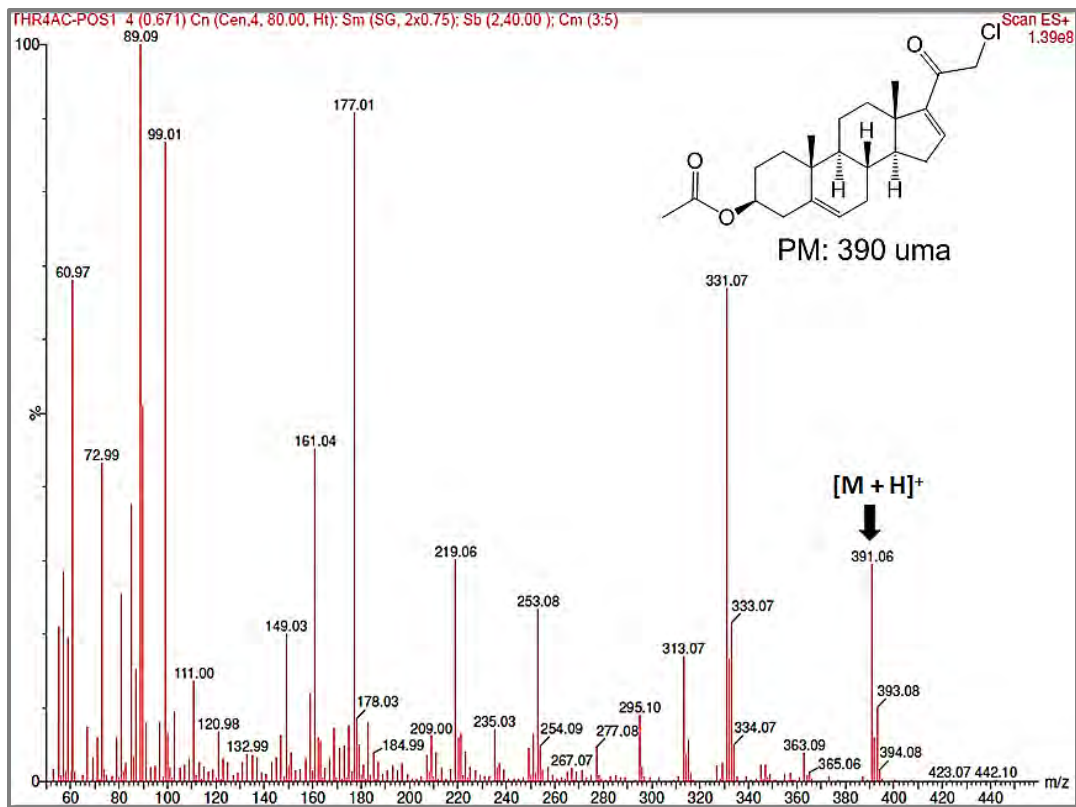
A20. Espectro de IR del compuesto 5a.



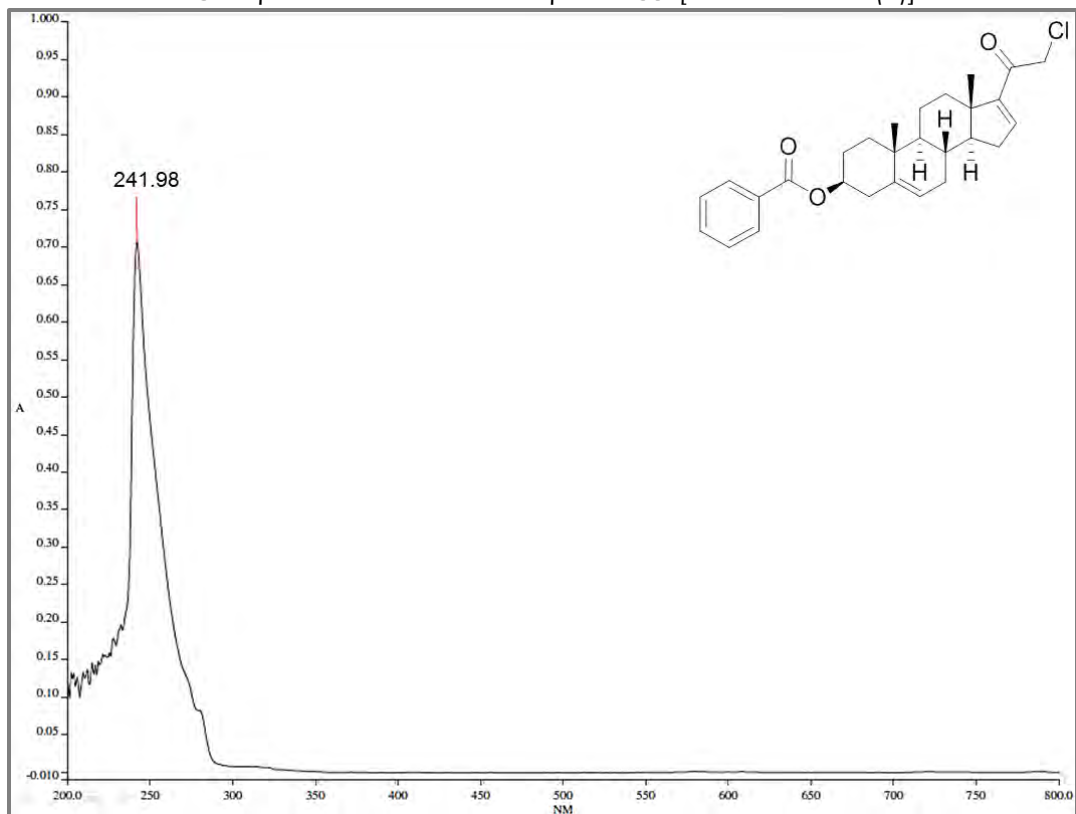
A21. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 5a.



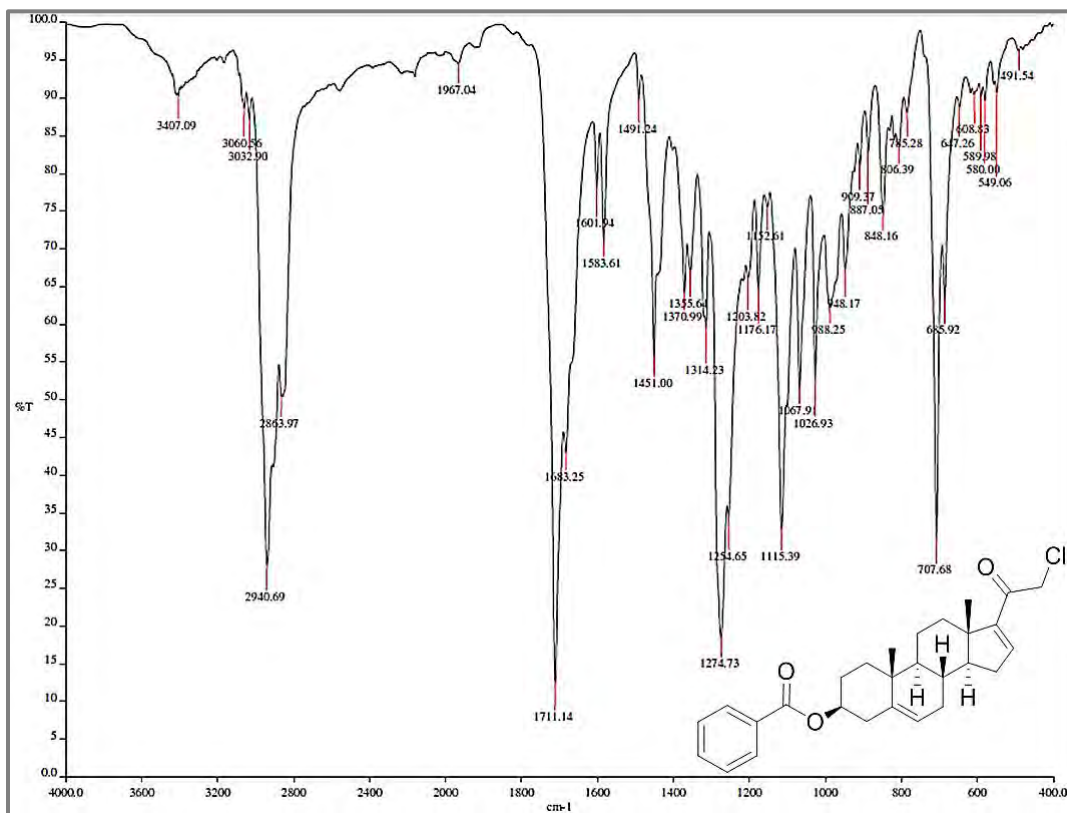
A22. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 5a.



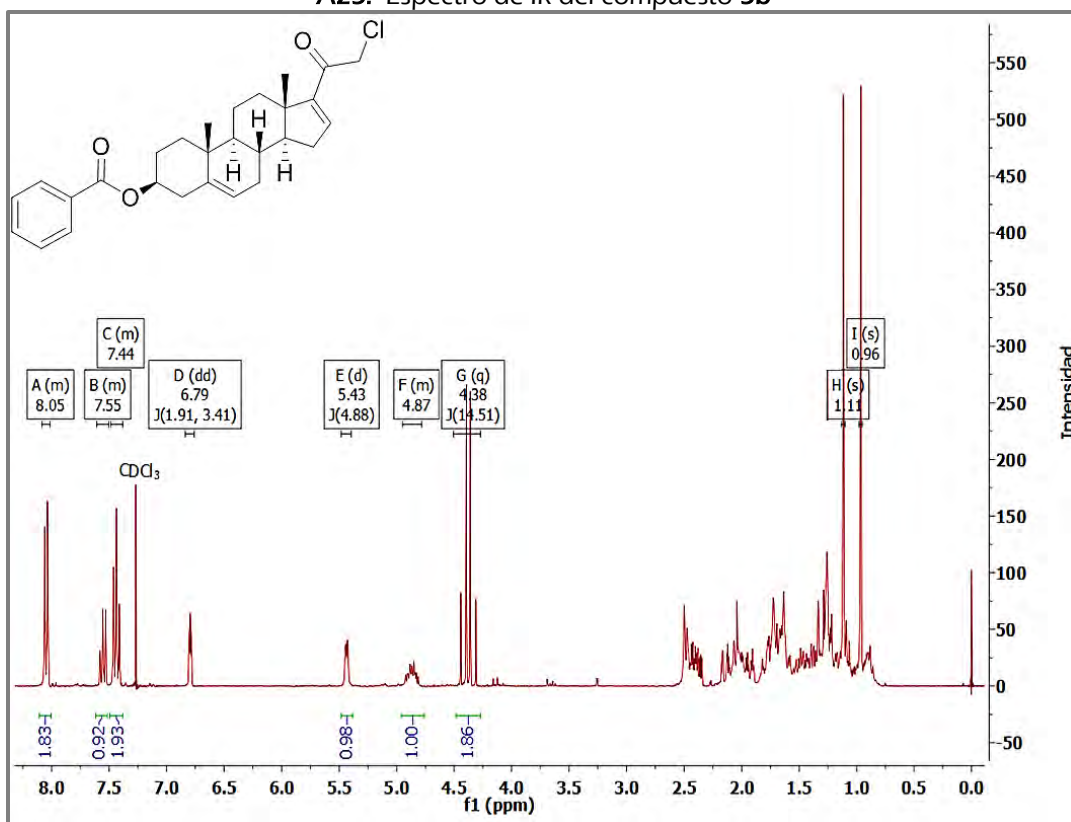
A23. Espectro de masas del compuesto 5a. [Técnica: EM-ESI (+)].



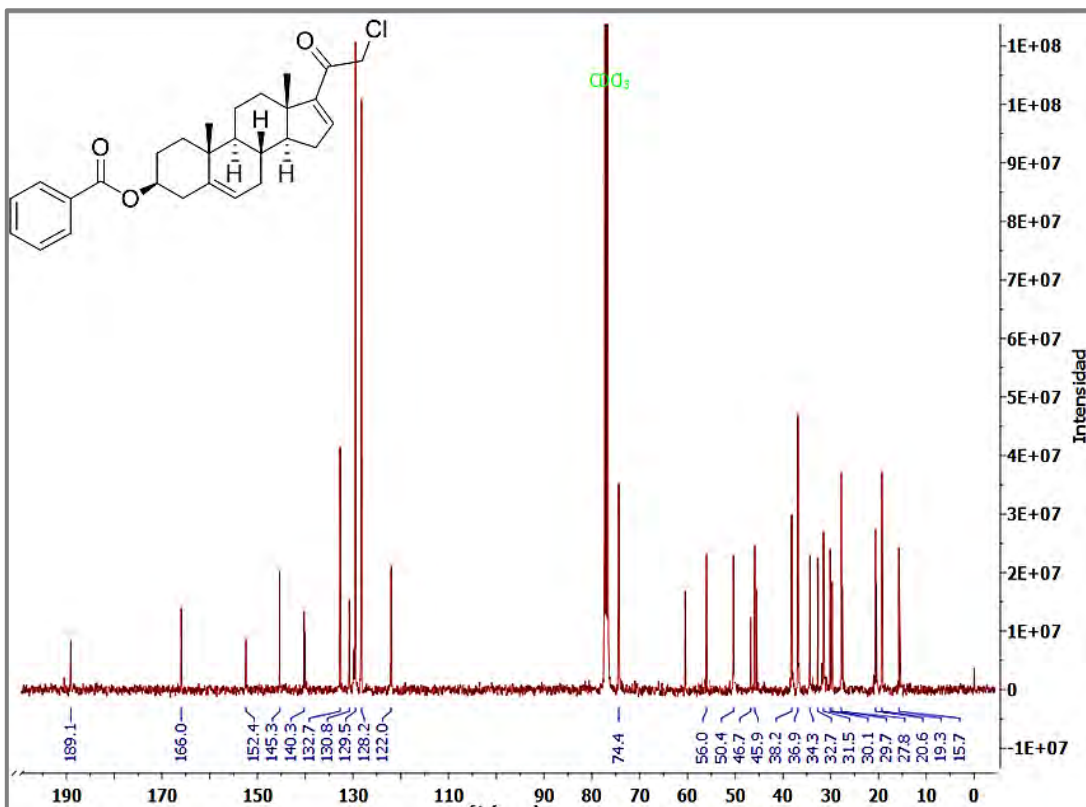
A24. Espectro de UV del compuesto 5b.



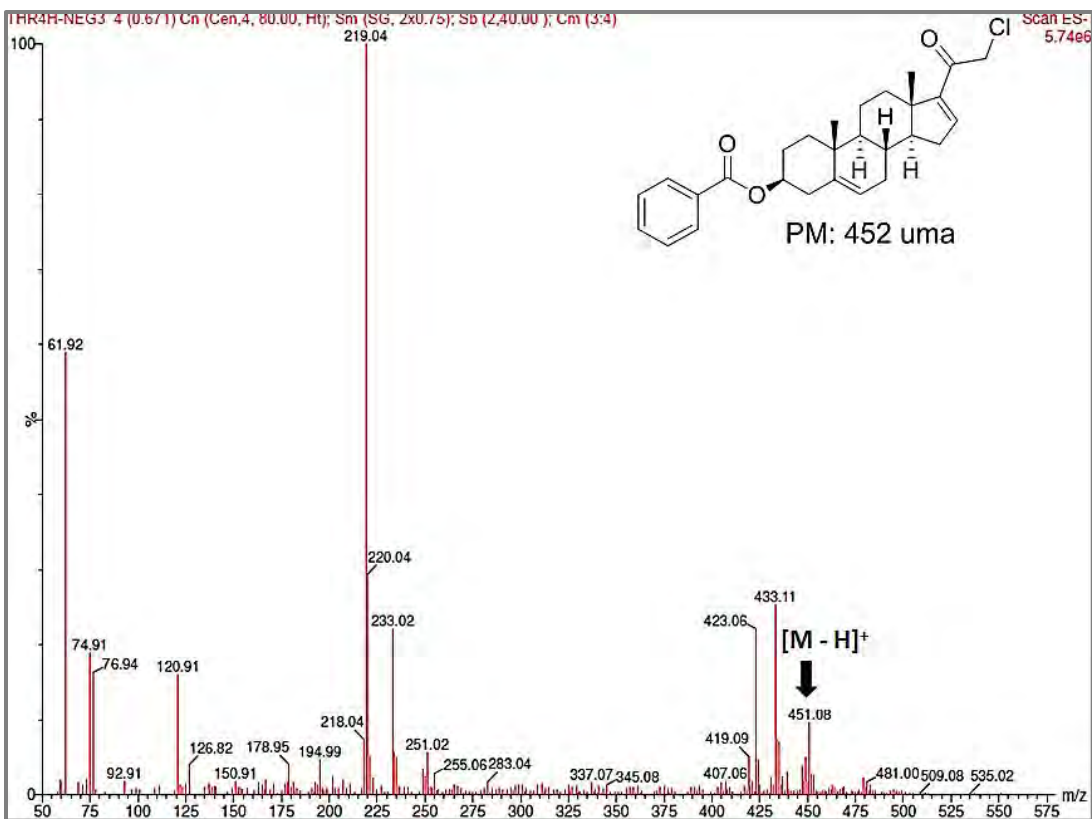
A25. Espectro de IR del compuesto 5b



A26. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 5b.

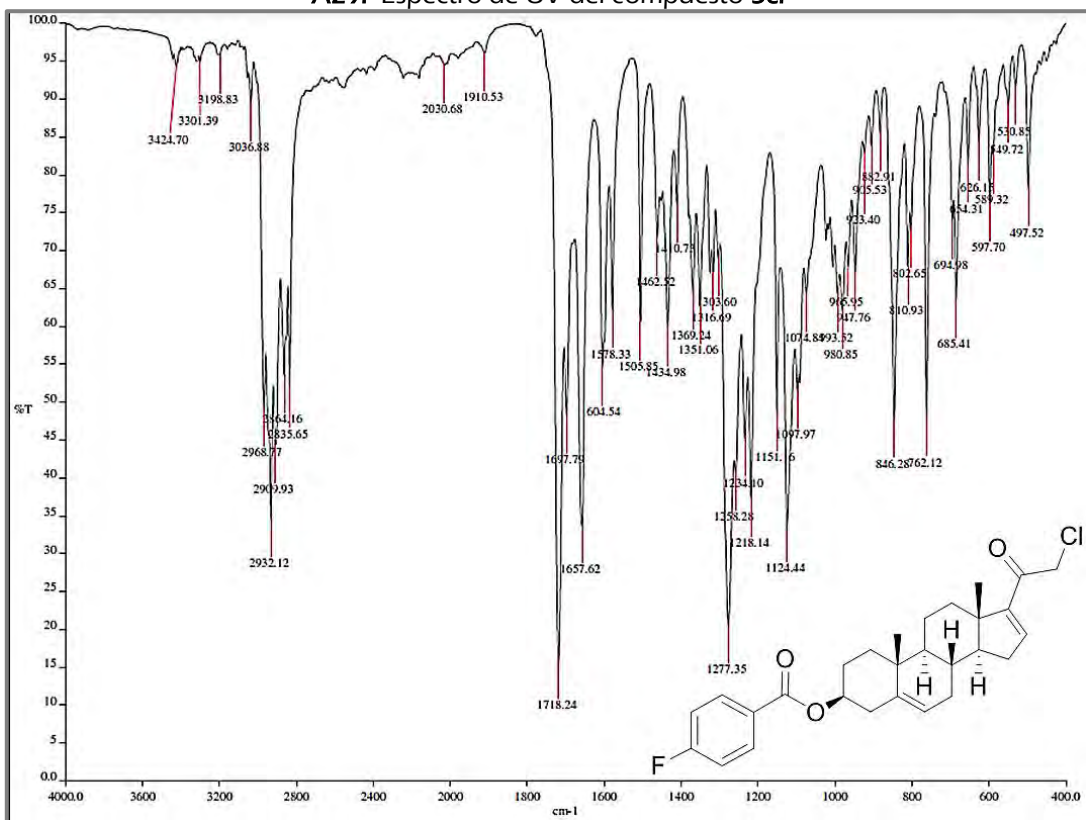
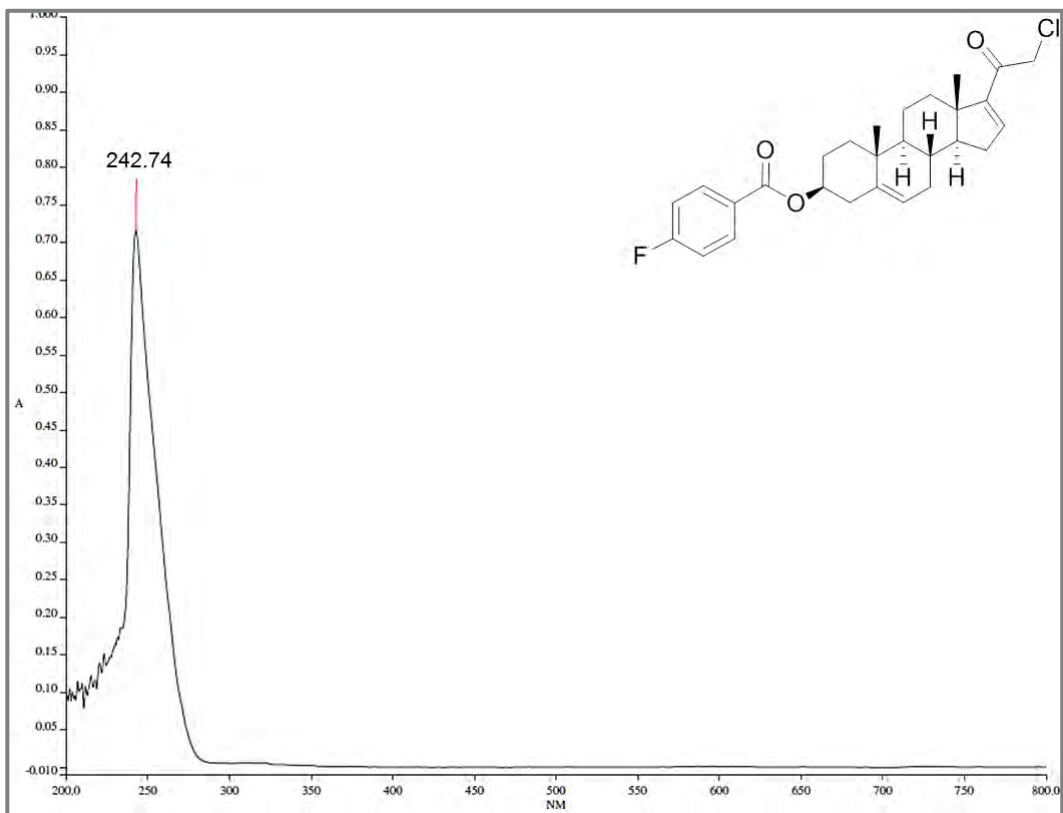


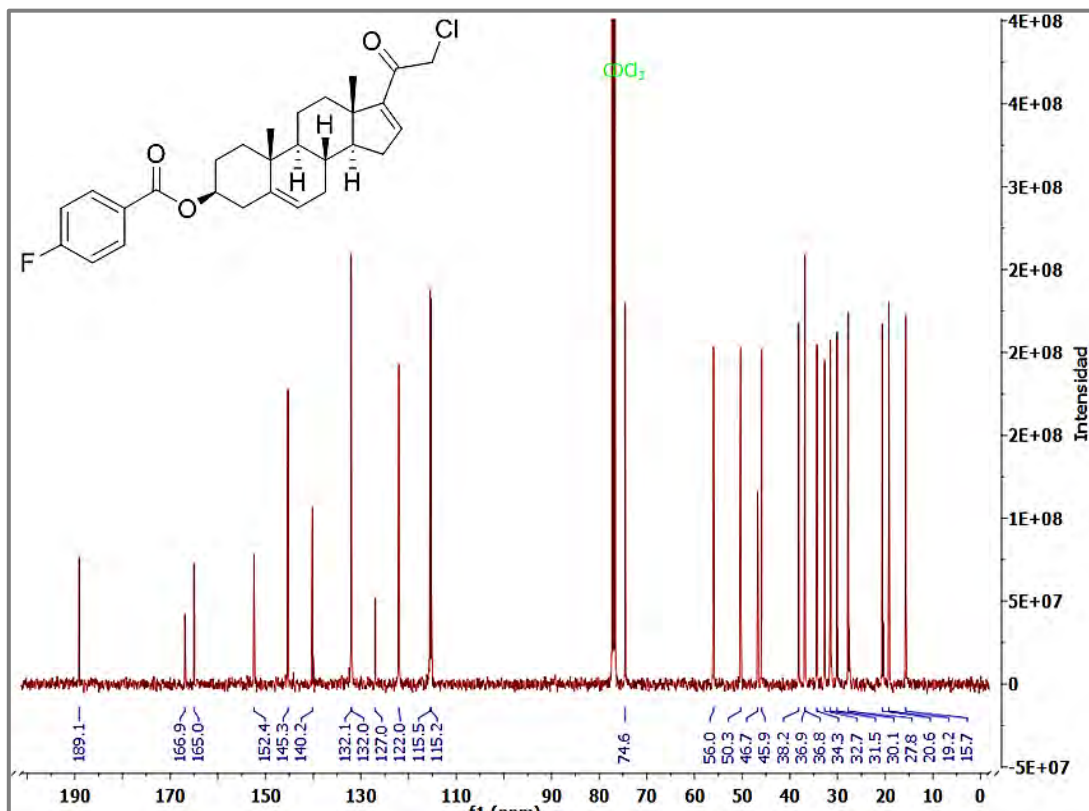
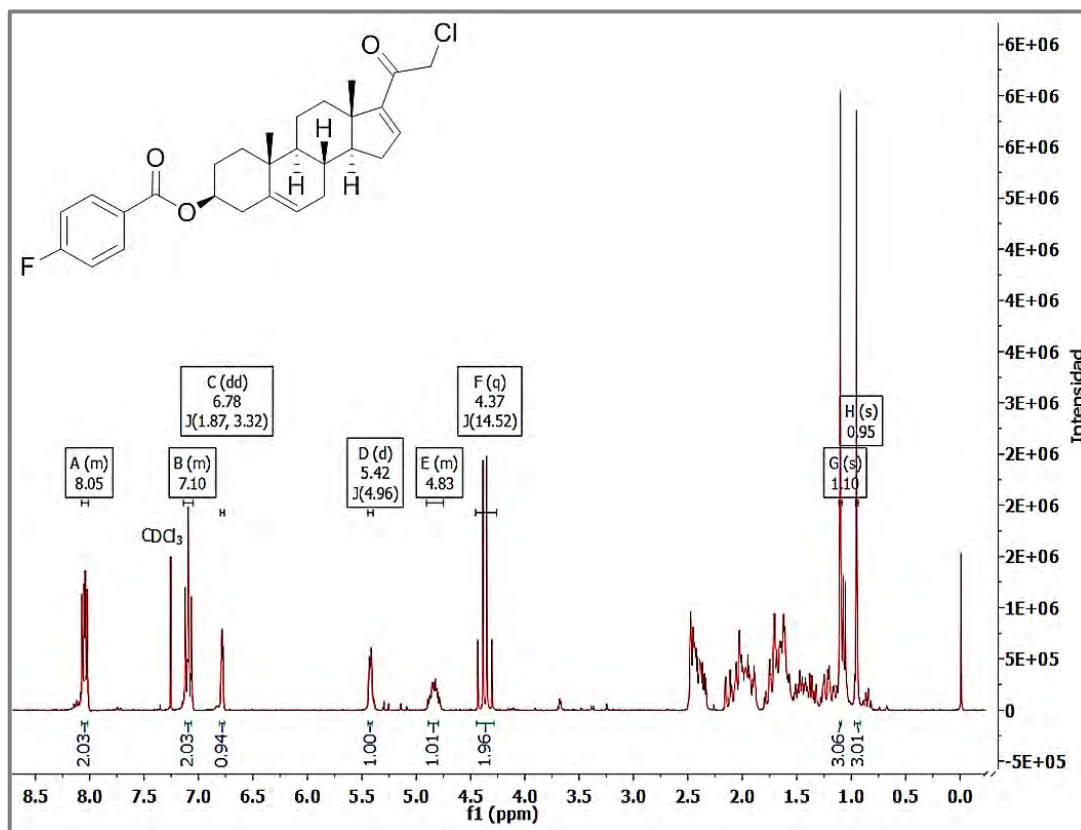
A27. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 5b.

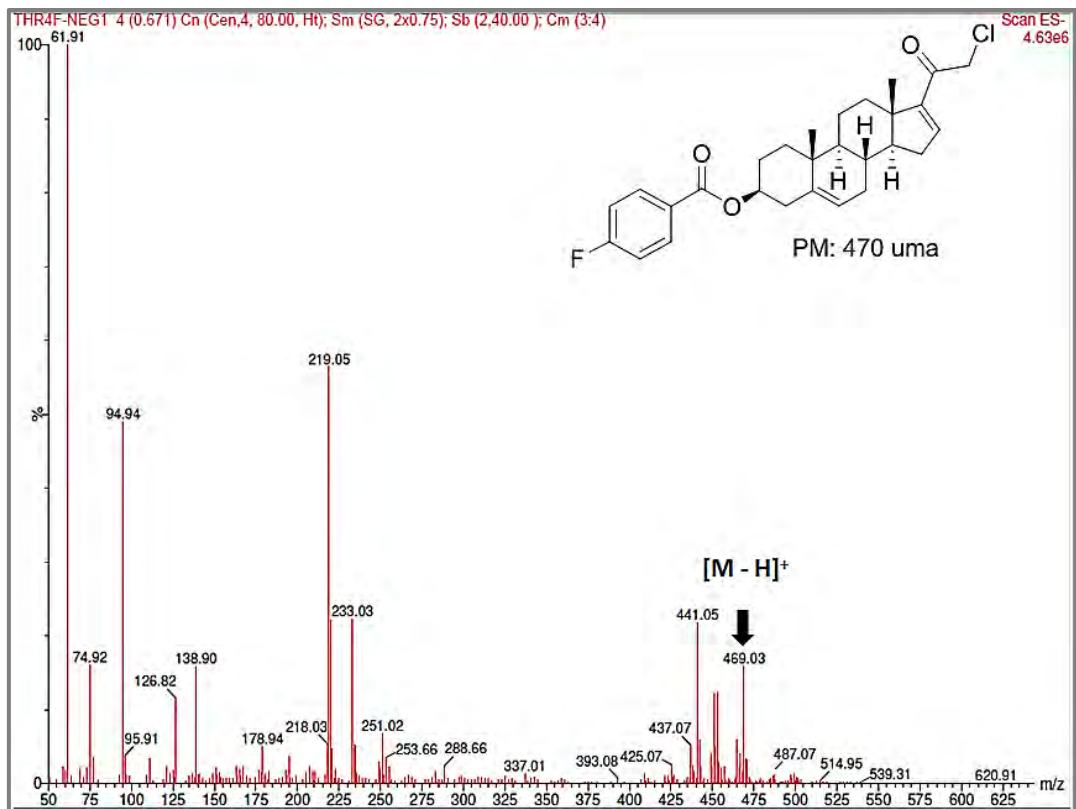


A28. Espectro de masas del compuesto 5b. [Técnica: EM-ESI (-)].

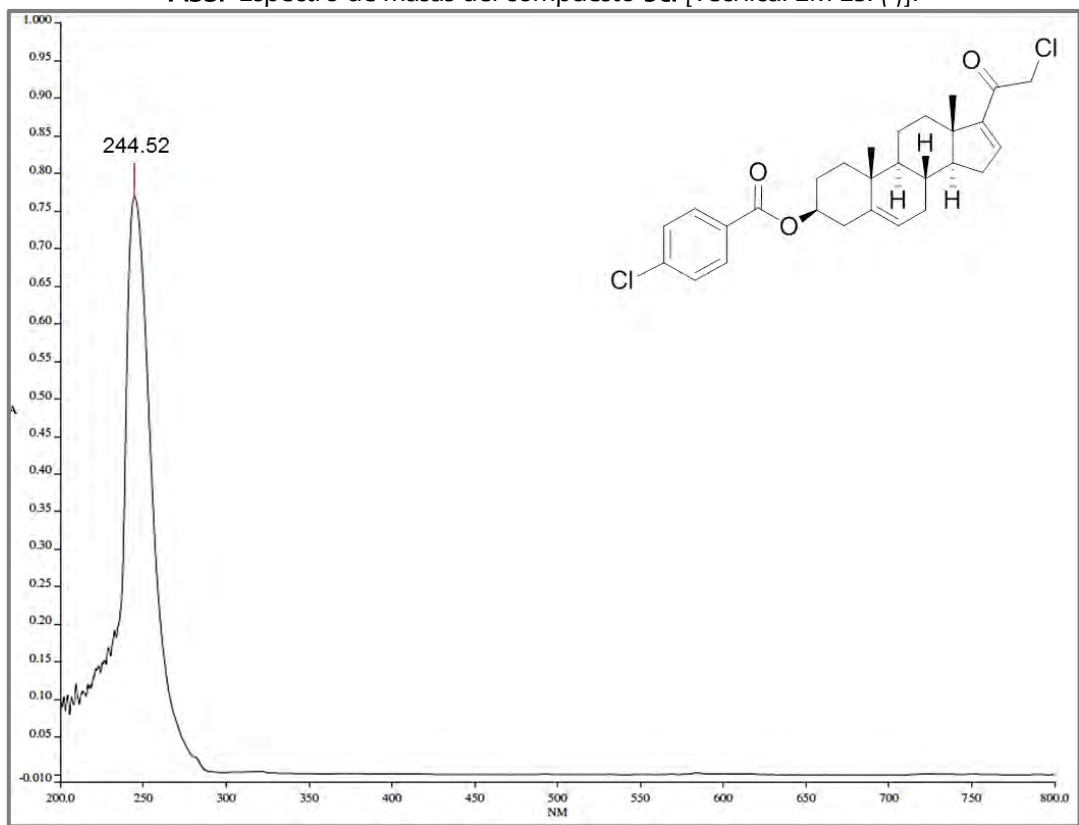




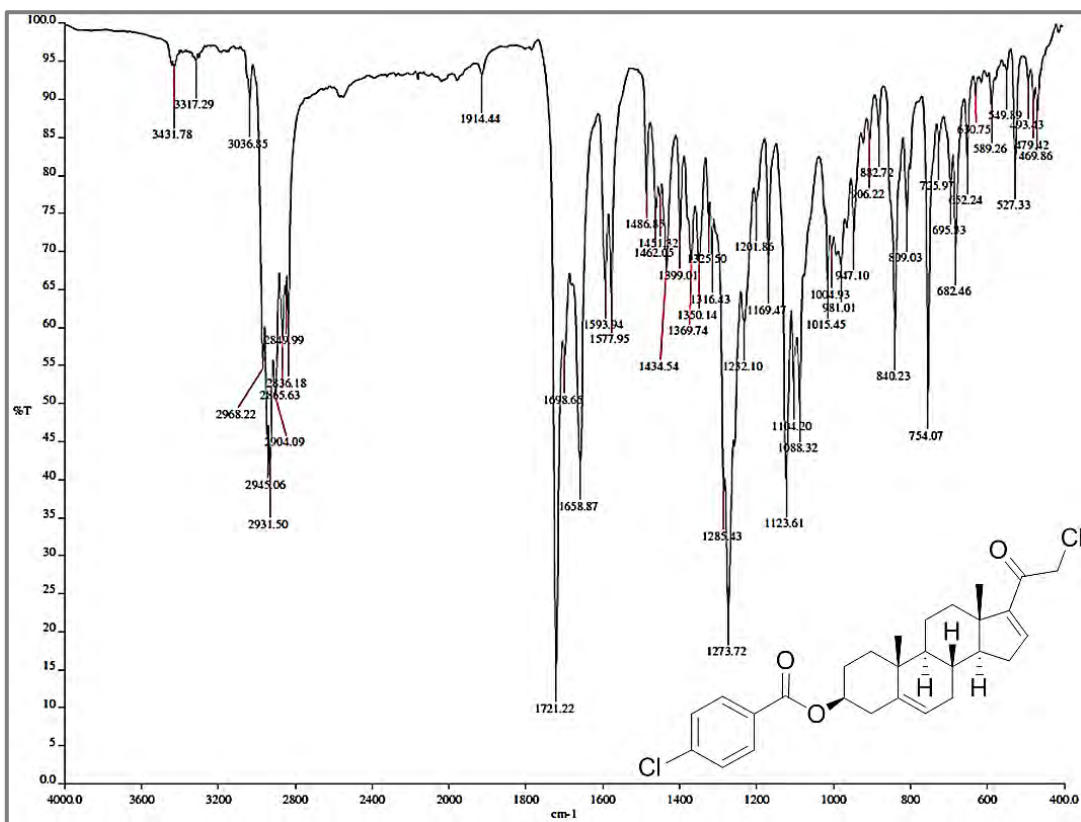




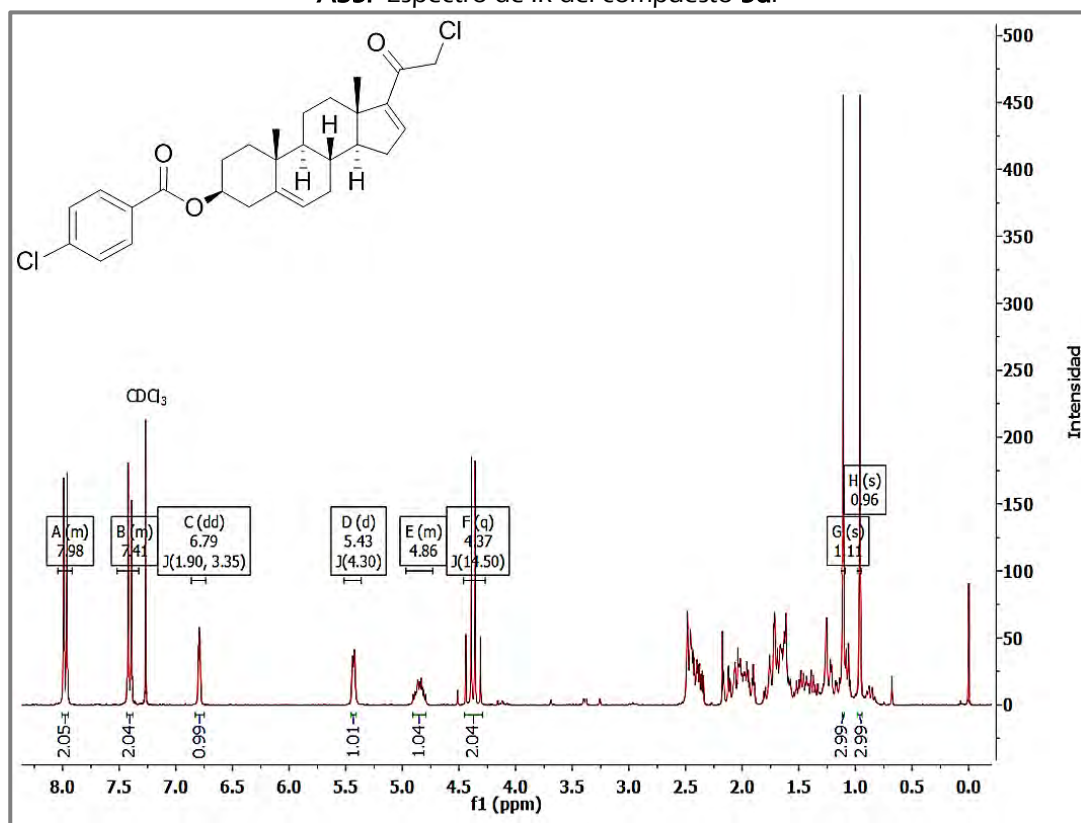
A33. Espectro de masas del compuesto 5c. [Técnica: EM-ESI (-)].



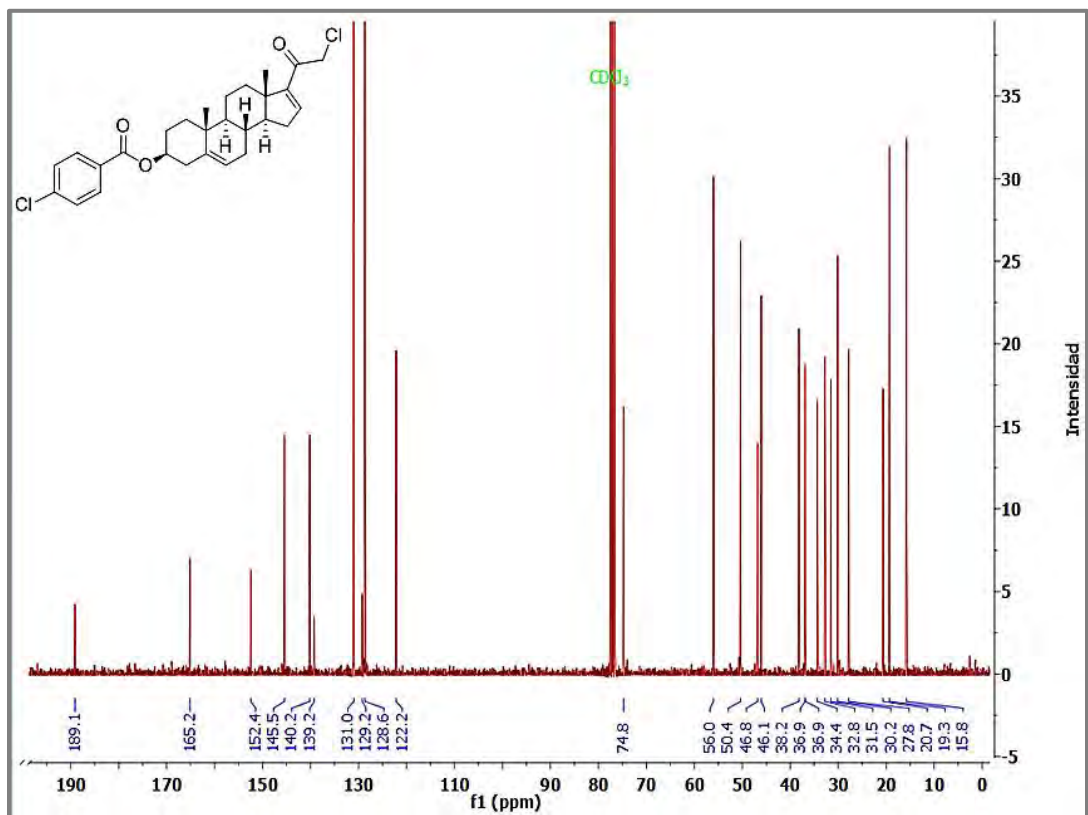
A34. Espectro de UV del compuesto 5d.



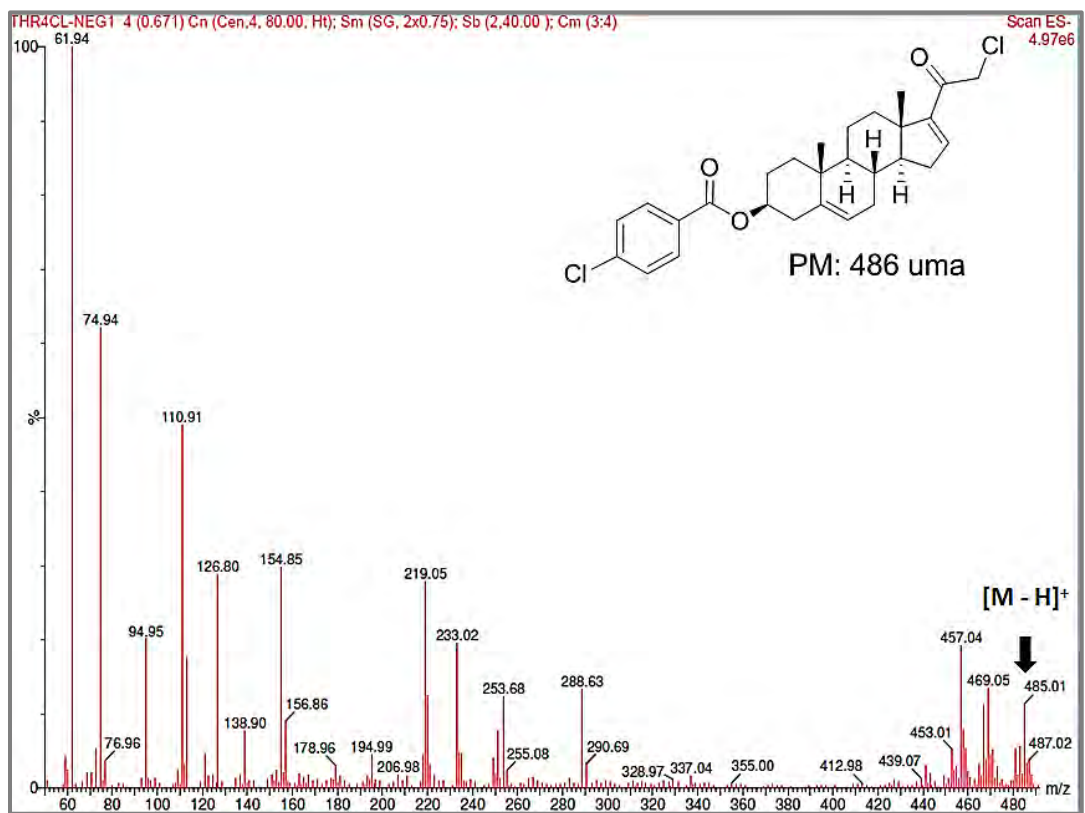
A35. Espectro de IR del compuesto 5d.



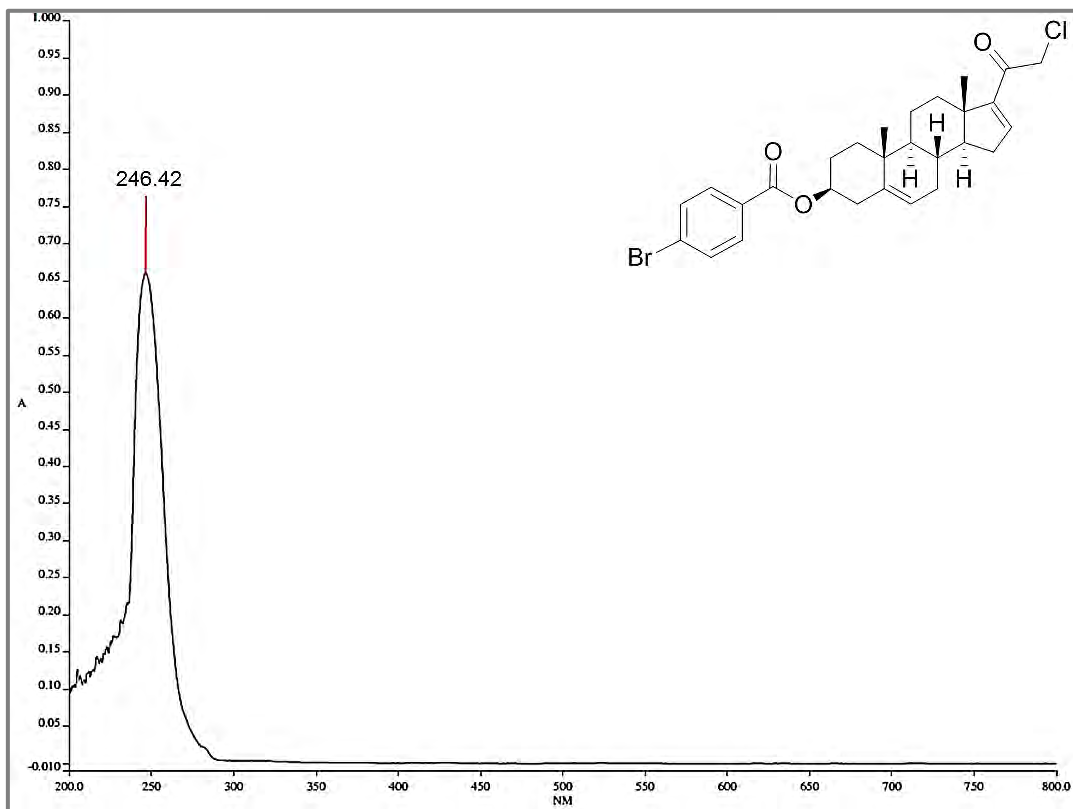
A36. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 5d.



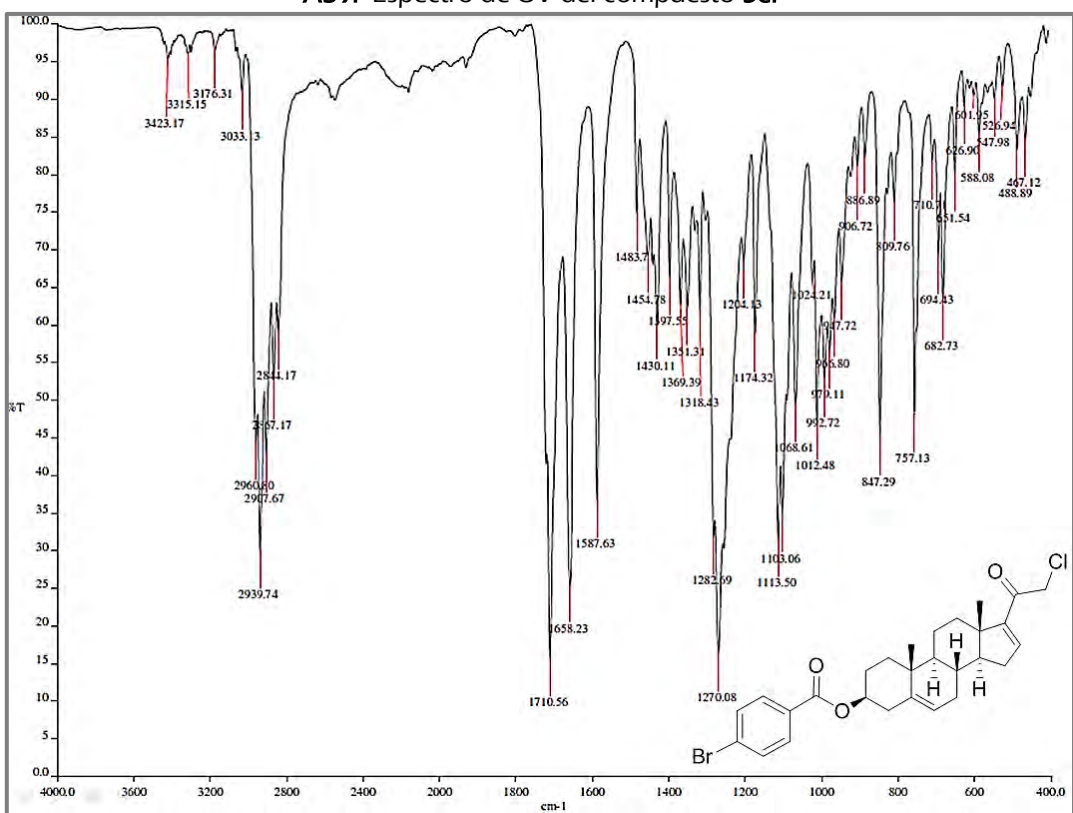
A37. Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto 5d.



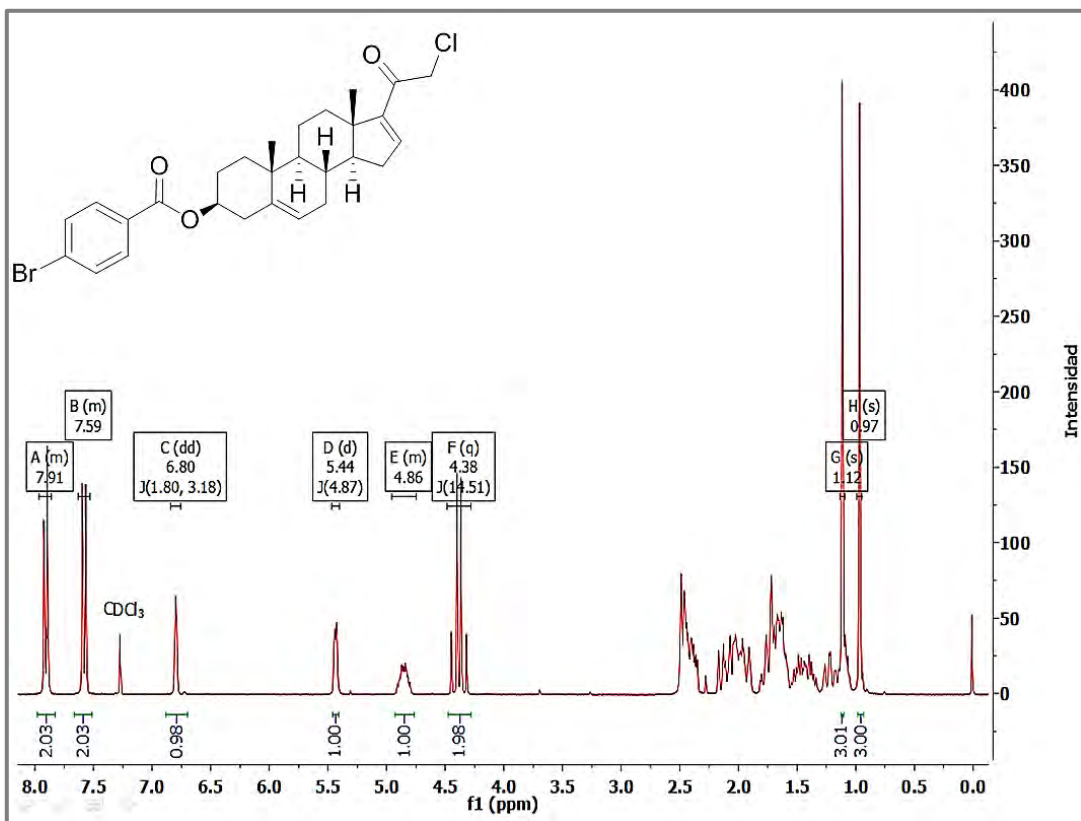
A38. Espectro de masas del compuesto 5d. [Técnica: EM-ESI (-)].



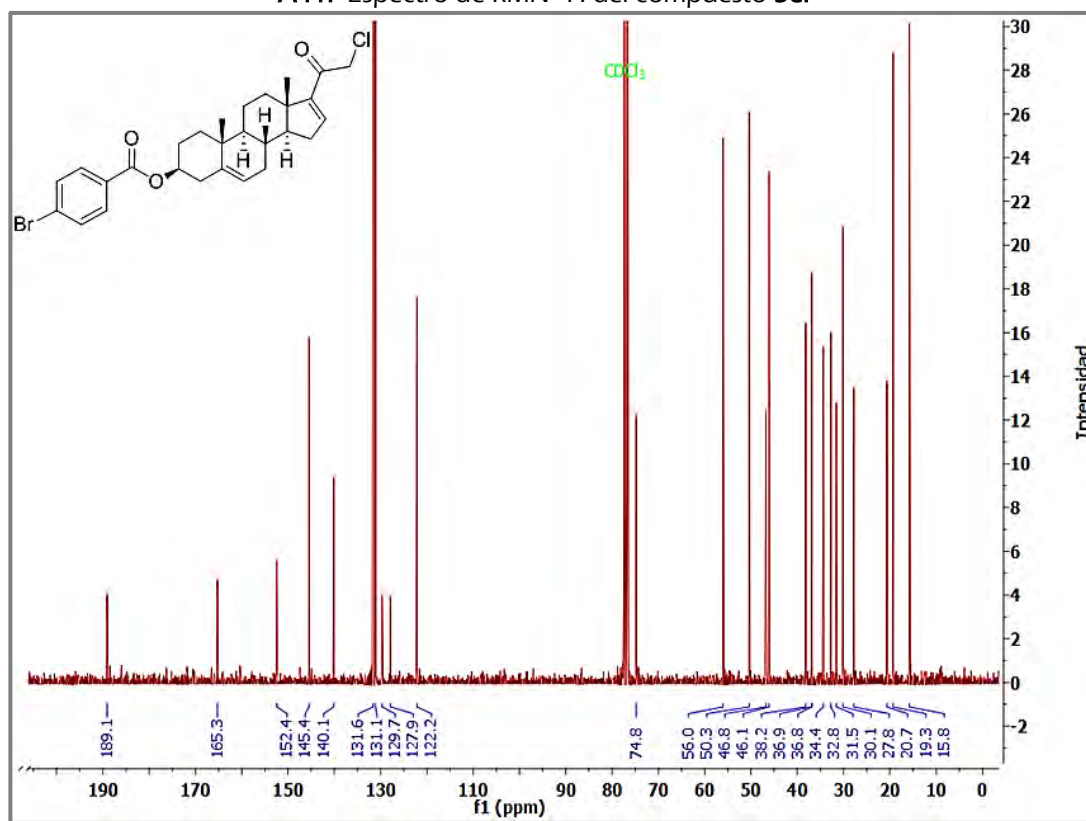
A39. Espectro de UV del compuesto 5e.



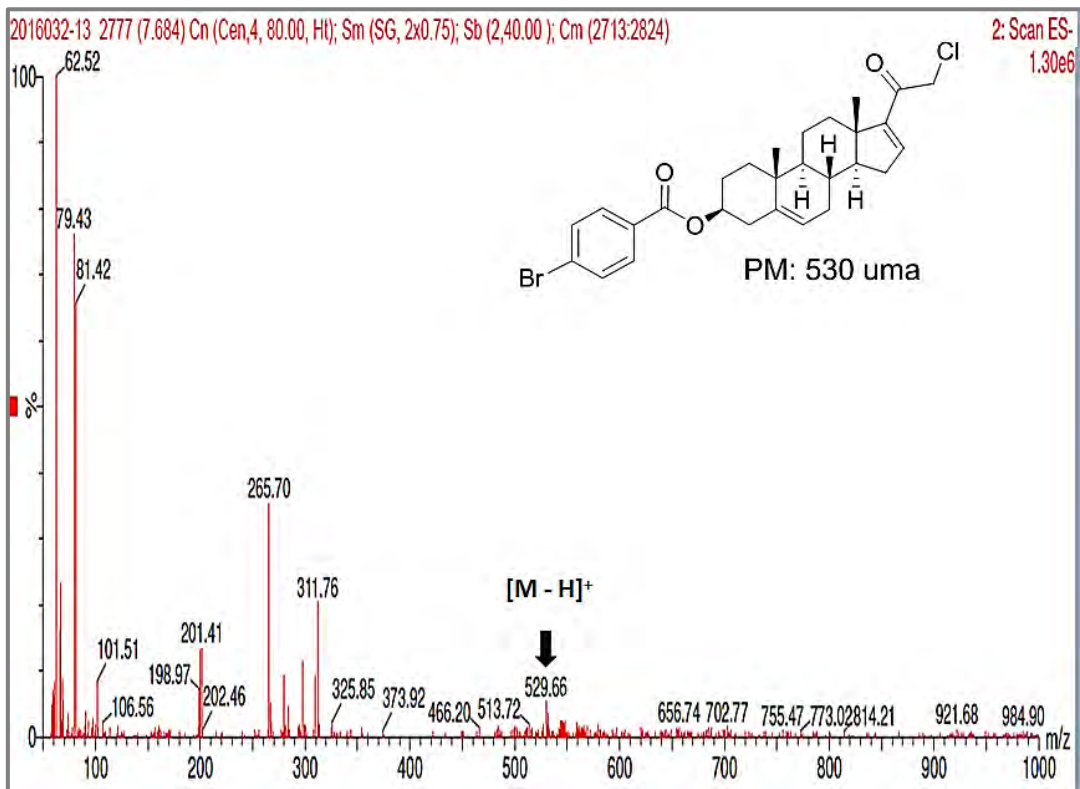
A40. Espectro de IR del compuesto 5e.



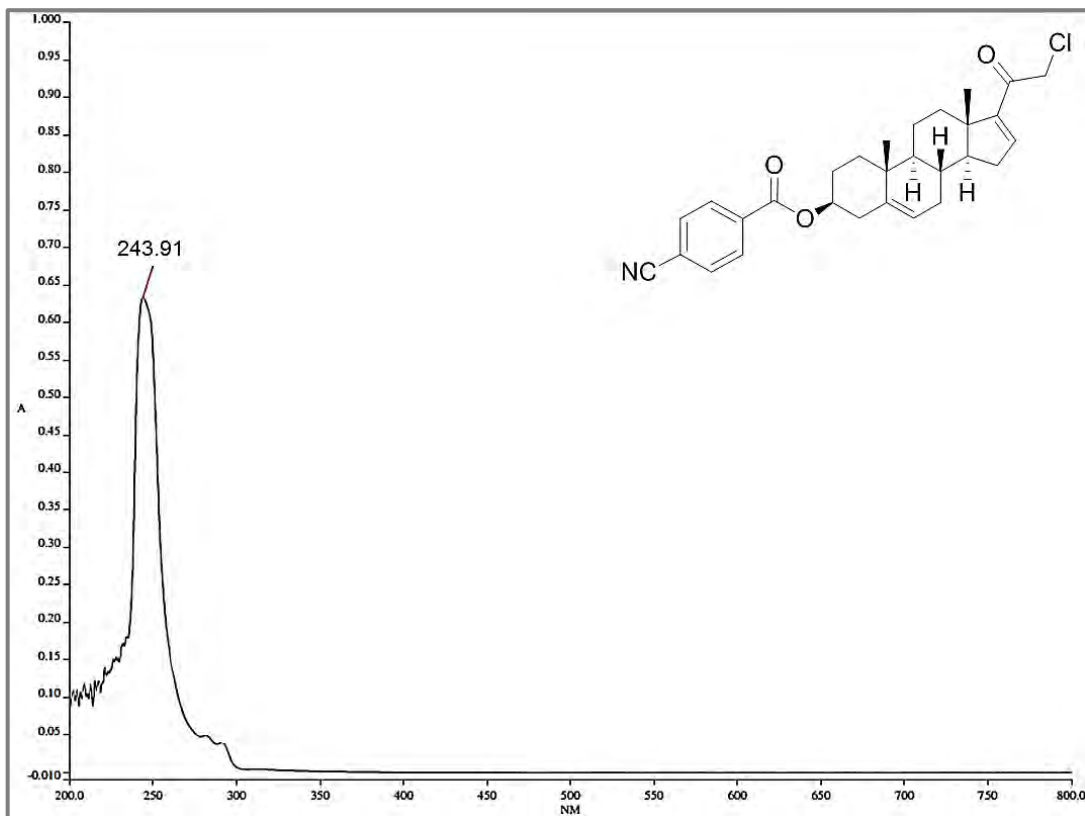
A41. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **5e**.



A42. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **5e**.

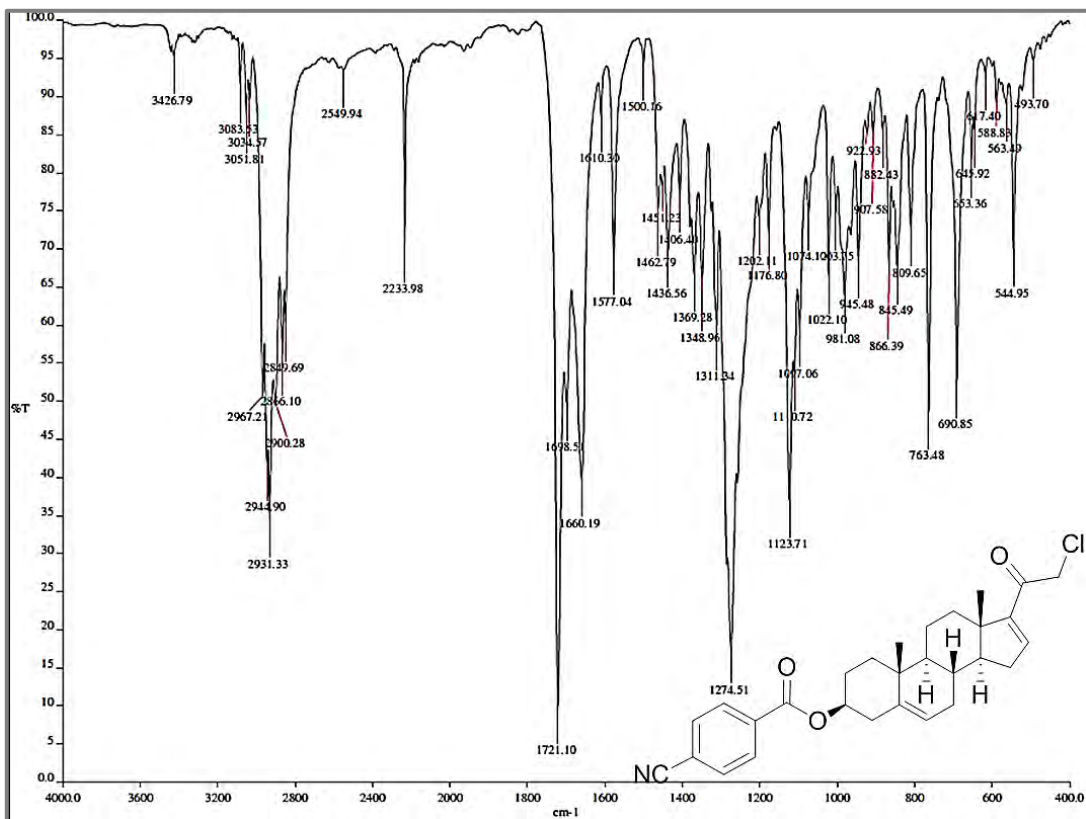


A43. Espectro de masas del compuesto 5e. [Técnica: EM-ESI (-)].

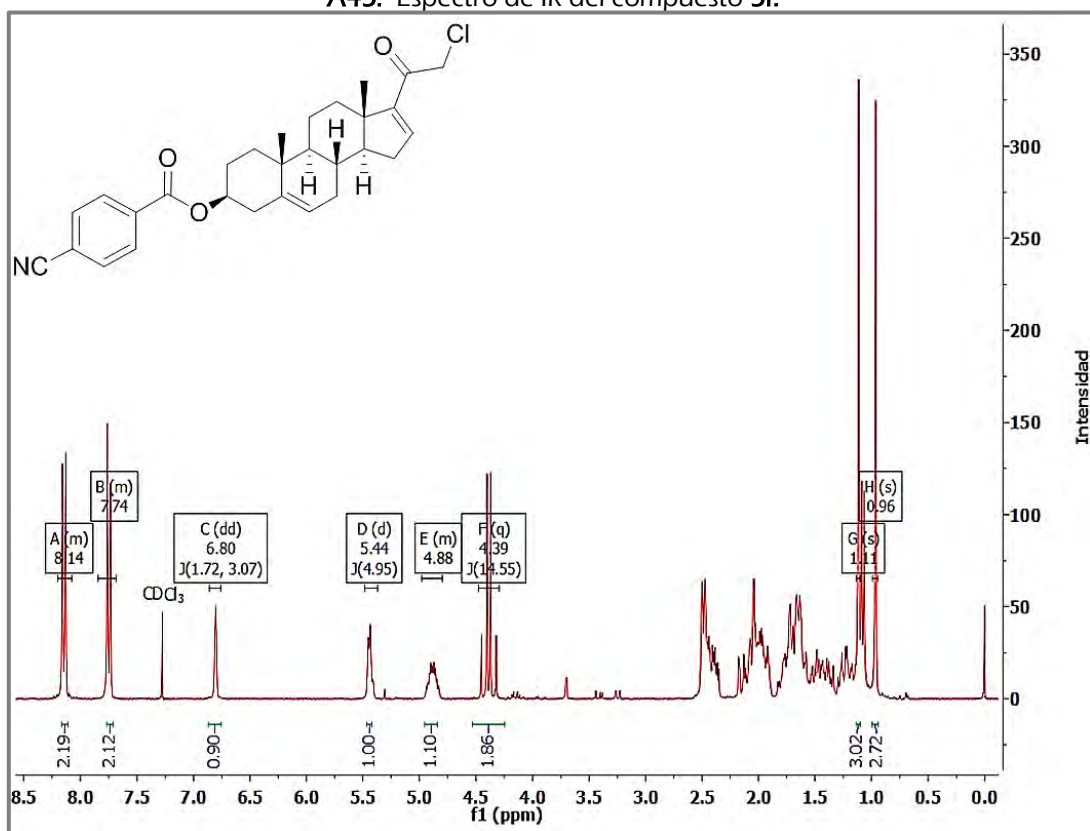


A44. Espectro de UV del compuesto 5f.

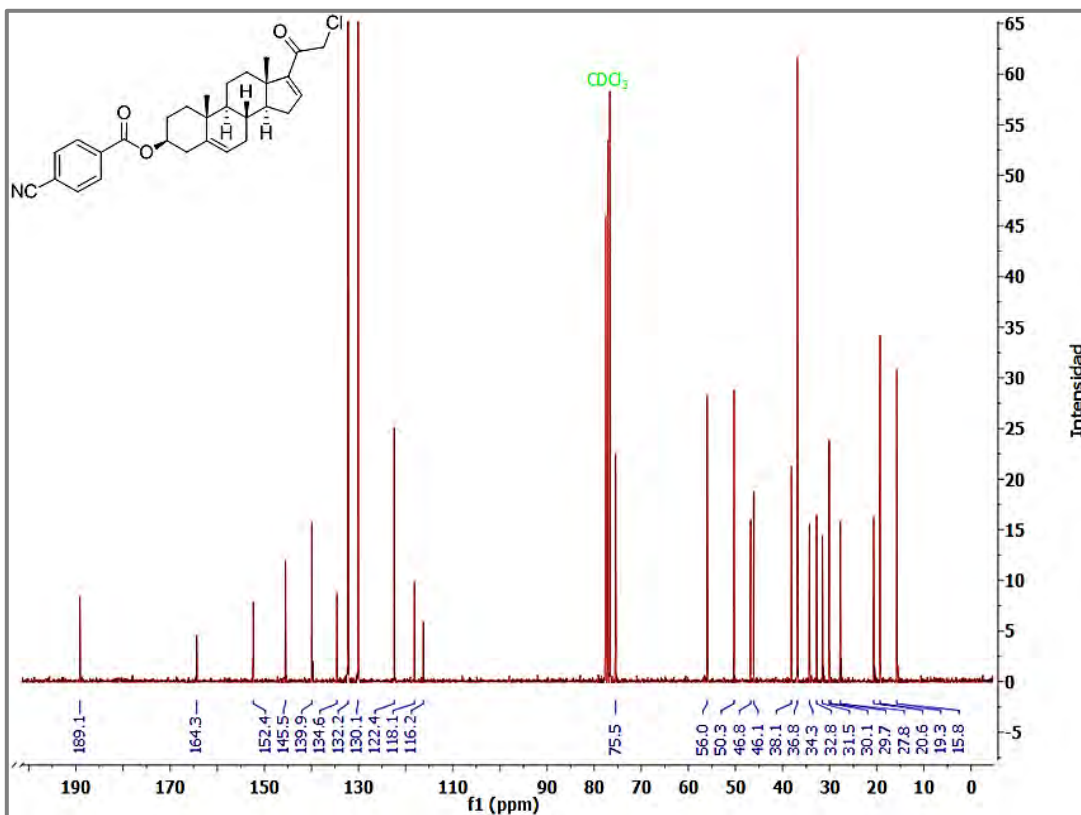




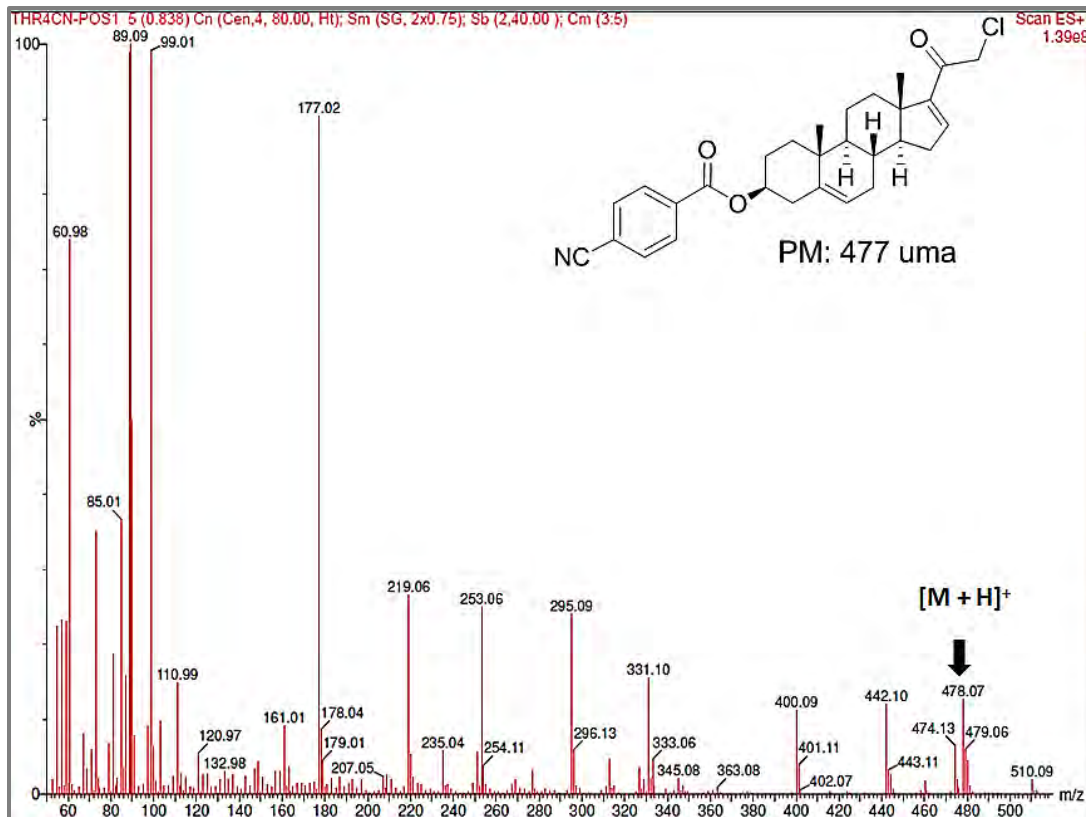
A45. Espectro de IR del compuesto 5f.



A46. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto 5f.



A47. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 5f.



A48. Espectro de masas del compuesto 5f. [Técnica: EM-ESI (+)].



**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.