



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS
DE ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA CON UN GRUPO
ÉSTER EN C-3 Y UNA FUNCIÓN AZOL EN C-21”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. AYLIN VIVIANA SILVA ORTIZ

TUTOR: EUGENE A. BRATOEFF T. (†)
SUPERVISOR: RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CDMX

FEBRERO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS
DE ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA CON UN GRUPO
ÉSTER EN C-3 Y UNA FUNCIÓN AZOL EN C-21”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. AYLIN VIVIANA SILVA ORTIZ

**TUTOR: EUGENE A. BRATOEFF T. (†)
SUPERVISOR: RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**



CDMX

FEBRERO 2017

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dr. Francisco Yuste López
VOCAL:	Dr. Jesús Sandoval Ramírez
VOCAL:	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
VOCAL:	Dr. Cecilio Álvarez Toledano
SECRETARIO:	Dr. José Fausto Rivero Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

- Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Conjunto “E”, Laboratorio L-125, UNAM, bajo la dirección del Dr. Eugene Bratoeff y posterior supervisión del Dr. Rafael Castillo Bocanegra.
- Laboratorio G-006, Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco, bajo la dirección de la Dra. Marisa Cabeza Salinas.
- Unidad de pruebas biológicas, Edificio “B”, Instituto de Química, UNAM, bajo la dirección de la M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apan.
- Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zuribán, Bajo la dirección del Dr. David Barrera Hernández y la Dra. Roció García Becerra.

COMITÉ TUTOR:

Dr. Eugene Bratoeff Titeff, Tutor (†)
Dr. Rafael Castillo Bocanegra, Supervisor
Dr. Jesús Sandoval Ramírez
Dr. Federico García Jiménez

PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTE PROYECTO FUERON PRESENTADOS EN:

VII Congreso de la Red Latinoamericana de Ciencias Ambientales, Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica, 2013

Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica, del 11 al 15 de noviembre del 2013.

“Síntesis de nuevos inhibidores de la enzima 5 alfa-reductasa basados en el esqueleto del pregnano con un grupo éster en c-3 y función azol en c-21 implementando el concepto de química verde”

Aylin Viviana Silva Ortiz¹, Eugene A. Bratoeff T.¹ ¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., C.P. 04510 México.

Segundo ciclo de conferencias QUIDE 2014, FES Zaragoza, 2014

Auditorio campo 1, FES Zaragoza, UNAM, México, D.F., del 13 al 17 de enero, 2014.

“Síntesis y evaluación biología de derivados esteroidales con potencial actividad antiandrogenica para el tratamiento de la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) y el Cáncer de Próstata (CP)”

Aylin Viviana Silva Ortiz¹, Eugene Bratoeff¹, Marisa Cabeza Salinas², María Teresa Obdulia Ramírez Apan³. ¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., C.P. 04510 México. ²Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal. UAM-Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100. México, D.F., C.P. 04960, México. ³ Instituto de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., C.P. 04510 México.

4º Congreso de Alumnos de Posgrado, UNAM, 2014

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

“Síntesis de nuevos inhibidores de la enzima 5 alfa-reductasa basados en el esqueleto del pregnano con un grupo éster en c-3 y función azol en c-21 implementando el concepto de química verde”

Aylin Viviana Silva Ortiz¹, Eugene A. Bratoeff T.¹ ¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., C.P. 04510 México.

II Foro de conferencias del Programa de Química (Día del Químico), Universidad del Quindío, Quindío, Colombia. 2014

Salón 202, Bloque 50 años, Universidad del Quindío, Quindío, Colombia, el 5 y 6 de noviembre del 2014.

“Síntesis y evaluación biológica de derivados esteroidales para el tratamiento del Cáncer de Próstata (CP) y la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)”

Aylin Viviana Silva Ortiz¹, Eugene Bratoeff¹, Marisa Cabeza Salinas², María Teresa Obdulia Ramírez Apan³. ¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., C.P. 04510 México. ²Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal. UAM-Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100. México, D.F., C.P. 04960, México. ³ Instituto de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., C.P. 04510 México.

5º Congreso de Alumnos de Posgrado, UNAM, 2015

Unidad de Posgrado, UNAM, México, D.F., del 23 al 25 de Marzo de 2015.

“Síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados basados en el esqueleto del pregnano con un grupo éster en C-3 y un grupo azol en C-21.”

Aylin Viviana Silva Ortiz¹, Eugene Bratoeff¹, Marisa Cabeza Salinas², María Teresa Obdulia Ramírez Apan³. ¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., C.P. 04510 México. ²Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal. UAM-Xochimilco, Calzada del Hueso No.

1100. México, D.F., C.P. 04960, México. ³ Instituto de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., C.P. 04510 México.

4th International Conference on Medicinal Chemistry & computer Aided Drug Designing.

OMICS international conference, Atlanta, Georgia, USA, del 2 al 4 de noviembre de 2015.

“Synthesis and biological evaluation of novel 16-dehydropregnenolone acetate derivatives having an ester function at C-3 and triazole ring at C-21 on the 5 α -reductase isoenzymes, and on cancer cell lines”

Aylin Viviana Silva Ortiz¹, Eugene Bratoeff¹, Marisa Cabeza Salinas², María Teresa Obdulia Ramírez Apan³. ¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., C.P. 04510 México. ²Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal. UAM-Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100. México, D.F., C.P. 04960, México. ³ Instituto de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., C.P. 04510 México.

ESTE TRABAJO GENERÓ LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES:

- **Silva-Ortiz, A.V.**, Bratoeff, E., Ramírez-Apan, T., Heuze, Y., Sanchez, A., Soriano, J., Cabeza, M., Synthesis and activity of novel 16-dehydropregnenolone acetate derivatives as inhibitors of type 1 5 α -reductase and on cancer cell line SK-LU-1, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2015).
 - **Silva-Ortiz, A.V.**, Bratoeff, E., Ramírez-Apan, T., García-Becerra, R., Ordaz-Rosado, D., Noyola-Martínez, N., Castillo-Bocanegra, R., Barrera, D., Synthesis and biological activity of two pregnane derivatives with a triazole or imidazole ring at C-21, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (2016).
 - **Silva-Ortiz, A.V.**, Bratoeff, E., Ramírez-Apan, T., Heuze, Y., Sanchez, A., Soriano, J., Moreno, I., Bravo, M., Bautista, L., Cabeza, M., Synthesis of new derivatives of 21-imidazolyl-16-dehydropregnenolone as inhibitors of 5 α -reductase 2 and with cytotoxic activity in cancer cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2017).
-

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Nacional de México por la oportunidad otorgada para llevar a cabo mis estudios de posgrado, por permitirme formar parte de esta prestigiosa casa de conocimiento.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM por permitirme realizar mis estudios de Doctorado y superarme académicamente.

A el Dr. Eugene Bratoeff (†), por aceptarme y permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por todo el tiempo y la paciencia brindada, por compartir conmigo un poco de todo su conocimiento. Fue y será un honor para mí ser su alumna siempre. Para usted mi total gratitud y admiración.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por su apoyo y el tiempo brindado, gracias por las asesorías, por las correcciones y por todo el conocimiento aportado para el desarrollo de este trabajo. Mil gracias.

A la Dra. Marisa Cabeza y a la M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apan por su colaboración con la realización de las pruebas biológicas.

Al Dr. David Barrera Hernández y la Dra. Roció García Becerra por su colaboración con los estudios de biología molecular, por el apoyo y el conocimiento brindado.

Al Biol. David Ordaz Rosado y la M. en C. Nancy Noyola por el tiempo, el apoyo y las enseñanzas brindadas para la realización de las pruebas en líneas celulares y estudio de genes.

Al personal de la USAI, por la realización de los experimentos de IR, UV, RMN y Masas.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Benjamín Ortiz Mendoza, Federico García y al Dr. Jesús Sandoval Ramírez por sus consejos, enseñanzas y apoyo.

A los miembros del jurado, por las correcciones y aportes realizados para la realización de este trabajo.

Al proyecto DGAPA IN211312 por el apoyo económico brindado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de Doctorado, sin su apoyo no hubiera sido posible desarrollar este trabajo (numero de becario 258067)

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Nelcy Ortiz Ospina, Gracias porque sin ti no lo hubiera logrado, por tu paciencia y devoción interminable, eres y serás siempre mi ejemplo a seguir, de ti he aprendido la humildad, la perseverancia y el amor incondicional. Me ensañaste que entre más grande sea la lucha más grande será el triunfo. “Muchas mujeres hicieron el bien más tu sobrepasas a todas”.

A mis abuelos Leonor Ospina (†) y Julio Ortiz (†), a ustedes especialmente les dedico este logro, gracias por enseñarme la paciencia y el amor verdadero, gracias por todas las enseñanzas de vida que me dejaron. Los veré en la eternidad.

A mi tía Lorena, gracias por la ternura, por las risas y por todos los momentos compartidos, gracias por ser la alegría de la casa.

A mi familia, por todas las oraciones, fueron mi soporte en tiempos difíciles, sin su apoyo no hubiera sido posible alcanzar esta meta.

A Gustavo Guerrero, gracias por las horas y los días compartidos, por estar conmigo en los momentos de alegría y apoyarme en los difíciles. Por tratar de borrar mis momentos de tristeza y soledad. Por brindarme la calidez de un hogar aun estando lejos de mí casa. Te llevare siempre conmigo.

A mis amigos Jennifer Pulido, Yurany Ariza, Héctor Cortes y Sebastián Rivera, gracias por el apoyo, aún en la distancia siempre fueron un gran soporte para mí, los quiero.

A mis compañeros del laboratorio 125, gracias.

A la Dra. Elena Guadalupe Ramírez, gracias por mostrarse siempre con una cálida sonrisa.

A todos los que formaron parte de este proceso y que estando cerca o lejos me apoyaron.
De corazón muchas gracias.

A mis Abuelos Leonor y Julio

A mi Madre

"De nada sirve la inteligencia sin Dios pues Él es quien da la victoria"

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ESQUEMAS	viii
ABREVIATURAS	ix
ABSTRACT	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	6
1.1. Los esteroides y las hormonas esteroidales	6
1.1.1. Receptores nucleares (RN)	7
1.1.2. Mecanismos de acción de las hormonas esteroidales	8
1.1.1.1. Agonismo y antagonismo	9
1.2. Generalidades sobre el cáncer	10
1.3. Hiperplasia prostática (HPB) y cáncer de próstata (CP)	11
1.3.1. La enzima 5α-reductasa	13
1.3.2. Posibles factores de riesgo	14
1.3.3. Detección temprana del cáncer de próstata	15
1.3.4. Tratamientos comunes sobre el cáncer de próstata	15
1.3.4.1. Terapia hormonal	16
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS	21
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos específicos	22
CAPÍTULO 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	23
4.1. Desarrollo químico	24
4.1.1. Rutas sintéticas	26
4.1.2. Propiedades físicas y espectroscópicas de la 3β-acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1)	29
4.1.3. Síntesis de la 16α,17α-epoxi-3β-hidroxipregna-5-en-20-ona (2)	30
4.1.4. Síntesis de la 3β-{[<i>tert</i>-butil(dimetil)silil]oxi}-16α,17α-epoxipregna-5-en-20-ona (3 en ruta 1)	31
4.1.5. Síntesis de 3β-{[<i>tert</i>-butil(dimetil)silil]oxi}-20,20-dimetoxi-16α,17α-	32

epoxipregn-5-en-21-ol (4 en ruta 1)	
4.1.6. Síntesis de 3 β -{[<i>tert</i> -butil(dimetil)silil]oxi}-21-cloro-20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-eno (5 en ruta 1)	33
4.1.7. Síntesis de 3 β -{[<i>tert</i> -butil(dimetil)silil]oxi}-20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-21-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-eno (6 en ruta 1)	34
4.1.8. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-en-20-ona (7 en ruta 1)	35
4.1.9. Síntesis de 3 β -hidroxi-21-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (8 en ruta 1, 7 en ruta 2)	36
4.1.10. Síntesis del acetato de 20-oxo-21-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3 β -ilo (9a en ruta 1)	37
4.1.11. Síntesis de los derivados esterificados de 20-oxo-21-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3 β -ilo (9b-e en ruta 1)	38
4.1.12. Síntesis de 3 β -(tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-iloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona (3 en ruta 2)	40
4.1.13. Síntesis de 20,20-dimetoxi-3 β -(tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-iloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-21-ol (4 en ruta 2)	41
4.1.14. Síntesis de 21-cloro-20,20-dimetoxi-3 β -(tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-iloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-5-eno (5 en ruta 2)	42
4.1.15. Síntesis de 20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -(tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-iloxi)-21-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-eno (T6 en ruta 2)	43
4.1.16. Síntesis de 3 β -hidroxi-21-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (T7 en ruta 2)	44
4.1.17. Síntesis de los derivados esterificados de 20-oxo-21-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3 β -ilo (T8f-j en ruta 2)	45
4.1.18. Síntesis de 20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -(tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-iloxi)-21-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)pregn-5-eno (I6 en ruta 2)	47
4.1.19. Síntesis de 3 β -hidroxi-21-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (I7 ruta 2)	48
4.1.20. Síntesis de derivados esterificados de 20-oxo-21-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)pregna-5,16-dien-3 β -ilo (I8a-j en ruta 2)	49
4.2. Desarrollo parte biológica	54
4.2.1. Material biológico	54
4.2.2. Equipos	54
4.2.3. Sustancias	54
4.2.4. Ensayo <i>in vitro</i> (inhibición de la enzima 5 α -reductasa)	54
4.2.4.1. Extracción y aislamiento de la enzima 5 α -reductasa (tipo 1)	55

ÍNDICE

4.2.4.2. Extracción y aislamiento de la enzima 5 α -reductasa (tipo 2)	55
4.2.4.3. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀) de la enzima 5 α -reductasa	56
4.2.4.4. Determinación de la unión al receptor de andrógenos en próstata de rata	57
4.2.5. Ensayo <i>in vivo</i> (determinación de actividad androgénica)	59
4.2.6. Ensayo <i>in vitro</i> , citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas	61
4.2.7. Determinación de la CI ₂₀ y la CI ₅₀ en líneas celulares de cáncer de los compuestos T7 e I7	63
4.2.8. Determinación de la expresión génica del compuesto I7	63
4.2.9. Evaluación del compuesto I7 sobre los receptores de andrógeno y progesterona en células HeLa	65
4.3. Estudios Docking para los compuestos T7 e I7 sobre RP, RA y RVD	66
CAPÍTULO 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	68
5.1. Parte química	68
5.2. Parte biológica	81
CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFÍA	96
ANEXOS	102
PUBLICACIONES	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Diferencias entre las isoenzimas tipo 1 y 2 de la 5 α -reductasa.	14
Tabla 1.2.	Antiandrógenos de tipo no esteroidal.	18
Tabla 1.3.	Antiandrógenos de tipo esteroidal.	18
Tabla 4.1.	Compuestos finales.	24
Tabla 4.2.	Propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas (9b-e en ruta 1)	38
Tabla 4.3.	Propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas (T8f-j en ruta 2)	45
Tabla 4.4.	Propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas (I8a-e en ruta 2)	49
Tabla 4.5.	Propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas (I8f-j en ruta 2)	52
Tabla 4.6.	Valores de CI ₅₀ para las isoenzimas 5 α -R y el porcentaje de unión al receptor de andrógenos (I7a-e en ruta 2)	58
Tabla 4.7.	Resultados de pruebas <i>in vivo</i> .	60
Tabla 4.8.	Porcentaje de inhibición de la proliferación sobre diferentes líneas celulares de cáncer.	62
Tabla 4.9.	Genes estudiados relacionados con la proliferación y la apoptosis.	63
Tabla 4.10.	Sondas y cebadores utilizados para la qPCR	65
Tabla 5.1.	CI ₂₀ y CI ₅₀ para los compuestos T7 y I7 sobre líneas celulares de cáncer.	84
Tabla 5.2.	Energías de unión y cluster size de los compuestos T7 e I7 sobre RP, RA y RVD.	91
Tabla 5.3.	Valores teóricos de Log P para los derivados esteroideos sintetizados	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figure A.1.	Finasteride	2
Figura R.1.	Finasterida	4
Figura. 1.1.	Núcleo del ciclopenta[a]perhidrofenantreno	6
Figura. 1.2.	Esteroidogénesis en los humanos	7
Figura. 1.3.	Mecanismo de acción de los receptores nucleares por la vía clásica.	8
Figura. 1.4.	Agonismo y antagonismo	9
Figura. 1.5.	Diferencia en la división celular de células normales y cancerígenas.	10
Figura. 1.6.	Próstata normal, próstata con hiperplasia prostática benigna (HPB) y próstata con cáncer (CP).	12
Figura. 1.6.	Transformación de la T a DHT por efecto de las isoenzimas 5 α -reductasa	13
Figura. 1.7.	Mecanismo de transformación de T a DHT.	14
Figura. 1.8.	Mecanismo de transformación de Finasterida a Dihidrofinasterida.	19
Figura. 1.9.	Abiraterona.	19
Figura 5.1.	Actividad de los compuestos sobre diámetro de la mancha pigmentada.	82
Figura 5.2.	Actividad de los compuestos sobre el peso de la próstata y las vesículas seminales	82
Figura 5.3.	Porcentaje de inhibición del crecimiento celular sobre líneas celulares de cáncer	83
Figura 5.4.	Curvas de proliferación celular de los compuestos T7 (A) y I7 (B).	84
Figura 5.5.	Respuesta de los genes CCND1 y CCNE1 a diferentes concentraciones del compuesto I7 sobre las líneas celulares de cáncer PC-3 y MCF7.	86
Figura 5.6.	Expresión de las ciclinas en las diferentes fases del ciclo celular.	87
Figura 5.7.	Respuesta del gen Survivina a diferentes concentraciones del compuesto I7 .	88
Figura 5.8.	Estudio de agonismo o antagonismo del compuesto I7 sobre el receptor de andrógenos y/o progesterona.	89
Figura 5.9.	Expresión del gen CYP24A1 a diferentes concentraciones de I7 sobre la línea celular PC-3.	90

Figura 5.10. Interacciones moleculares de los compuestos **T7** e **I7** con los 92 receptores hormonales. RP: A) Progesterona, B) progesterona en ambas caras del RP, C) **T7** y D) **I7** en la cara B del RP; RA: E) 5α -DHT, F) **T7** y G) **I7**; RVD: H) Calcitriol, I) **T7** y J) **I7**. En A, B, D y G se observan los ligandos naturales.

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 4.1.	Ruta sintética propuesta inicialmente	26
Esquema 4.2.	Ruta sintética implementada para obtener los primeros compuestos finales	27
Esquema 4.3.	Ruta sintética implementada para obtener los demás compuestos finales	28
Esquema 5.1.	Mecanismo de reacción para la epoxidación y obtención del compuesto 2 .	69
Esquema 5.2.	Mecanismo de reacción para la protección en C-3 y obtención del compuesto 3 .	70
Esquema 5.2.	Mecanismo de reacción para la oxidación en C-21 y obtención de 4 .	71
Esquema 5.4.	Mecanismo de reacción para la cloración en C-21 y obtención de 5 .	72
Esquema 5.5.	Mecanismo de reacción para la adición del triazol en C-21 y obtención de 6 .	73
Esquema 5.6.	Mecanismo de reacción para la desprotección en C-3 y eliminación del cetil en C-20 para la obtención del compuesto 7 .	74
Esquema 5.7.	Mecanismo de eliminación del epóxido en C-16 y obtención de T7 .	75
Esquema 5.8.	Mecanismo de protección en C-3 y obtención del compuesto 3 en ruta 2 .	76
Esquema 5.9.	Mecanismo de desprotección en C-3 y obtención del compuesto T7 en ruta 2 .	78
Esquema 5.10.	Mecanismo de acetilación en C-3.	80
Esquema 5.11.	Mecanismo de para la esterificación en C-3 por el método de Steglich.	80

ABREVIATURAS

SÍMBOLOS

HPB	Hiperplasia prostática benigna
CP	Cáncer de próstata
DHT	Dihidrotestosterona
16-DPA	Acetato de 16-dehidropregnenolona
T	Testosterona
5 α -R	5 α -reductasa
5 α -DHT	5 α -dihidrotestosterona
IR	Infrarrojo
UV	Ultravioleta
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
EM	Espectrometría de masas
ADN	Acido desoxirribonucleico
NADPH	Nicotinamida de adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NADP ⁺	Nicotinamida de adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
CCF	Cromatografía en capa fina
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DMAP	Dimetilaminopiridina
uma	Unidad de masa atómica
J	Constante de acoplamiento
ppm	Partes por millón
m/z	Relación masa carga en EM
nm	Nanómetros
MHz	MegaHertz
mL	Mililitros
mg	Miligramos
mmol	Milimoles
DMF	Dimetilformamida
μ L	Microlitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
RP	Receptor de progesterona
RA	Receptor de andrógenos
RVD	Receptor de vitamina D
CCND1	Ciclina D1
CCNE1	Ciclina E1
P ₄	Progesterona
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

ABSTRACT

Today cancer is a problem of national and global environment, due to its high rate in the population, both male and female and completely indistinct from age.

Several types of cancers, one of them, are carcinomas, it begins in the skin or tissues that line or cover internal organs, that is, it derives from epithelial and glandular cells, generating mostly malignant cancer.

There are several types of carcinomas, including adenocarcinomas, which have their origin specifically in cells that constitute the lining of glands secretion, they are directly related to the processes of secretions in the body, most of these secretions are hormonal, because of this, the most common adenocarcinomas are: prostate, breast, lung, colon, stomach, kidney, among others.

This thesis describes the synthesis and biological evaluation of various compounds derived from 16-dehydropregnenolone acetate (16-DPA), which is one of the most important intermediates in the synthesis of hormonal drugs and related steroids. For this reason we started from the 16-DPA that was derivatized to obtain various linear and alicyclic esters at C-3; with 1,2,4-triazole and 1,3-imidazole at C-21. The chemical structures were characterized by spectroscopic analysis and IR, UV, ^1H NMR and ^{13}C NMR and mass spectrometry.

The development of biological assessment was conducted in four parts, first *in vitro*, where the cytotoxicity was evaluated on different cancer cell lines; in the second test the percent of the inhibition of 5α -reductase enzyme in prostatic human cadaver and hamster was evaluated; in the third part different genes related with to cell proliferation and apoptosis were evaluated. Furthermore, the binding capacity of the compound on different nuclear receptors (androgen, progesterone and vitamin D) were performed using the genic transactivation method, the androgen (AR) and progesterone (PR) receptor were performed for this, but the vitamin D receptor (VDR) was performed using the gene induction method on CYP24A1 gene.

The fourth part consisted *in vivo* evaluation on Syrian Golden castrated hamsters, evaluating the growth of the prostate, seminal vesicles and the diameter of the pigmented spot, comparing the effect of compounds with finasteride (Proscar) (figure A.1.), the drug most commonly used in market.

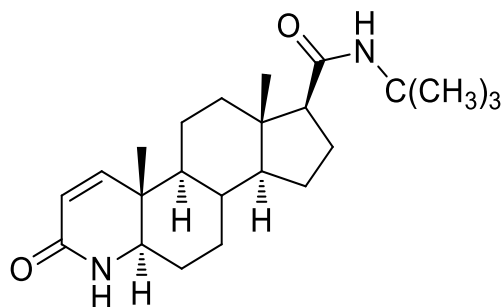


Figure A.1. Finasteride

In the *in vitro* test on cancer cell lines (PC-3, MCF7, SK-LU-1) were tested only compounds containing linear esters at C-3 for both of the synthesized series (series 1: triazole compounds, series 2: imidazole compounds), only the compounds containing hydroxyl group or small esters (**T7**, **T8a**, **I7**, **I8a**) at C-3 showed a good inhibition activity on the cell growth.

About the study 5 α - reductase isoenzymes, most of the compounds studied in both series did not show any activity, except, the **T8c** and **T8e** compounds, they showed a better IC₅₀ on the 5 α R1 enzyme than Finasteride,

As additional work, the two compounds that showed the better activity on cell proliferation (**T7**, **I7**) were chosen and their IC₂₀ and IC₅₀ were determined on the three cancer cell lines studied, observing a better inhibition by the **I7** compound on PC-3 cell line.

Finally the results obtained in the study about the genes involved in cell proliferation and apoptosis, showed that the **I7** compound has a downregulation of genes CCND1 and CCNE1 and have activity on the progesterone receptor showing an antagonist effect.

RESUMEN

En la actualidad el cáncer constituye un problema de entorno nacional y mundial, debido a su alto índice en la población, tanto masculina como femenina, completamente indistinto a la edad.

Existen varios tipos de cánceres, uno de ellos, son los carcinomas, los cuales empiezan en la piel o tejidos que revisten o cubren los órganos internos, es decir, tiene su origen en células epiteliales o glandulares, generando en su mayoría cáncer de tipo maligno.

Hay varios tipos de carcinomas, entre ellos los adenocarcinomas, los cuales tienen su origen específicamente en las células que constituyen el revestimiento interno de las glándulas de secreción, es decir, están directamente relacionados con los procesos de secreciones en el cuerpo, la mayoría de estas secreciones son de tipo hormonal, debido a esto los adenocarcinomas más comunes son: de próstata, de mama, de pulmón, colon, estomago, renal, entre otros.

En esta tesis se describe la síntesis y evaluación biológica de varios compuestos derivados del Acetato de 16-dehidropregnenolona (16-DPA), el cual es uno de los intermediarios más importantes en la síntesis de fármacos hormonales y esteroides relacionados. Por tal razón se partió de la 16-DPA y se derivatizó hasta obtener varios ésteres de tipo lineal y alicíclicos en C-3; además un 1,2,4-triazol y/o 1,3-imidazol en C-21. Las estructuras químicas se caracterizaron por medio de análisis espectroscópicos como IR, UV, RMN¹H y RMN¹³C y espectrometría de masas.

El desarrollo de la evaluación biológica se llevó a cabo en cuatro partes, primero *in vitro*, donde se evaluó la citotoxicidad en líneas celulares cancerosas; en el segundo ensayo se evaluó el porcentaje de inhibición de la enzima 5 α -reductasa en próstata de cadáver humano y de hámster; en la tercera parte se evaluaron diferentes genes, los cuales están relacionados con la apoptosis y la proliferación celular, además de evaluar la capacidad de unión del compuesto con mejor actividad sobre diferentes receptores nucleares (andrógeno, progesterona y vitamina D) utilizando el método de la transactivación génica, para la evaluación del receptor de andrógenos (RA) y el receptor de progesterona (RP); para el receptor de vitamina D (RVD) el método utilizado fue el de inducción del gen CYP24A1.

RESUMEN

La cuarta parte consistió en la evaluación *in vivo* sobre hámsteres castrados de la cepa *Syriam Golden*, evaluando el crecimiento de la próstata, las vesículas seminales y el diámetro de la mancha pigmentada, comparando el efecto de los compuestos con la Finasterida (Proscar[®]) (figura R.1.), fármaco de preferencia en el mercado.

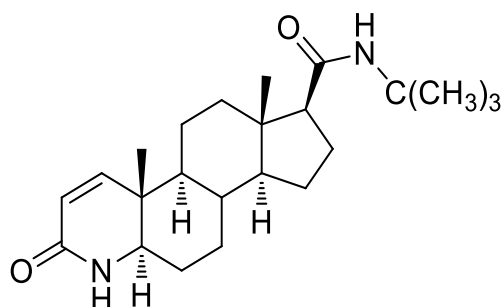


Figura R.1. Finasterida

En el ensayo *in vitro* sobre líneas celulares cancerosas (PC-3, MCF7, SK-LU-1), fueron evaluados únicamente los compuestos que contenían ésteres lineales en C-3 para ambas de las series sintetizadas (serie 1: compuestos con triazol, serie 2: compuestos con imidazol) donde solo los compuestos que contenían el grupo hidroxilo o ésteres de tamaño pequeño (**T7**, **T8a**, **I7**, **I8a**) en C-3 presentaron una buena actividad de inhibición del crecimiento celular.

Sobre el estudio en las isoenzimas de 5α- reductasa, la mayoría de los compuestos de ambas series estudiadas, no presentaron ningún tipo de actividad, excepto, los compuestos **T8c** y **T8e**, que presentaron una IC₅₀ mejor que la Finasterida sobre la enzima 5αR1.

Como un trabajo complementario se escogieron los dos compuestos con mejor actividad sobre la proliferación celular (**T7**, **I7**) y se determinaron sus CI₂₀ y su CI₅₀ sobre las tres líneas de cáncer estudiadas, observando una mejor inhibición por parte del compuesto **I7** sobre la PC-3.

Finalmente, los resultados obtenidos en el estudio de los genes implicados en la proliferación celular y la apoptosis, mostró que el compuesto **I7** tiene una regulación a la baja de los genes CCND1 y CCNE1 y tienen actividad sobre el receptor de progesterona mostrando un efecto antagonista.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los tumores malignos constituyen un problema de entorno nacional y mundial, debido a su alta incidencia, tanto en hombres y mujeres de diferentes edades. Es la segunda causa de muerte en el mundo, en países como Estados Unidos se estima un total de 1.658.370 casos nuevos de cáncer y 589.430 muertes estimadas para este año.¹⁻²

Es bien conocido que los esteroides juegan un papel crucial como reguladores del crecimiento y de procesos de supervivencia en las células. La literatura describe numerosos ejemplos de compuestos esteroidales utilizados en tratamientos contra el cáncer de tipo hormono-dependiente o independiente, tales como, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cervical y cáncer de próstata, entre otros.

Particularmente, el cáncer de próstata (CP) se encuentra reportado como uno de los tipos de cáncer más frecuentes en la población masculina a nivel mundial. Debido al envejecimiento la mayoría de hombres (mayores de 50 años) padecen de una condición conocida como Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), la cual consiste en el crecimiento no controlado de la próstata, comprimiendo la uretra y causando problemas al orinar, tales como la nocturia, disuria, hematuria e insuficiencia renal. El tratamiento más común para esta enfermedad es la cirugía, debido a que es un tumor de tipo neoplásico benigno. Los métodos preventivos de estas enfermedades comprenden el Examen Digital Rectal (EDR) y el Antígeno Prostático Específico (PSA), la cirugía es el método más aceptado para el tratamiento de estas enfermedades. Sin embargo, afecta la calidad de vida del paciente.³

Una de las alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer de próstata o la HPB son los antiandrógenos (Terapia hormonal), los cuales pueden ser tipo esterooidal o no esterooidal, encargados de evitar el crecimiento y por consiguiente la inflamación de la próstata, utilizando diferentes mecanismos de acción.

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue sintetizar y evaluar nuevos compuestos derivados del acetato de 16-dehydropregnenolona como posibles antiandrógenos o agentes antineoplásicos, que puedan ser utilizados en tratamientos contra el cáncer de próstata y la HPB, mejorando las condiciones de calidad de vida en pacientes masculinos.

1. ANTECEDENTES

1.1. Los Esteroides y las hormonas esteroidales

Los esteroides son compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en forma libre (agliconas esteroidales) o como ésteres o glicósidos (contienen azúcares ramificados).⁴ Su principal característica es que poseen como núcleo estructural un conjunto de 4 anillos conocidos como el ciclopenta[a]perhidrofenantreno (Fig. 1.1).⁵⁻⁶

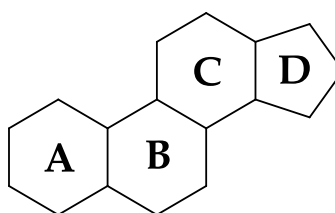


Figura. 1.1. Núcleo del ciclopenta[a]perhidrofenantreno.

En los animales y en el hombre la mayoría de los esteroides tienen funciones como hormonas, las cuales actúan como mensajeros químicos, secretados por células específicas (glándulas endocrinas) en órganos como, los testículos, la corteza adrenal, ovarios y placenta.

El colesterol es el precursor para todos los esteroides producidos en el cuerpo humano, este, es transportado al interior de la mitocondria donde es transformado en pregnenolona, seguido este último viaja al citosol donde se llevan a cabo el resto de reacciones que conllevan la síntesis de los esteroides.⁷

Las hormonas ayudan con el control del metabolismo, la inflamación, funciones inmunológicas, equilibrio de electrolitos, desarrollo de características sexuales y la capacidad de resistir enfermedades, entre otros.⁸

Según su naturaleza química, se encuentran clasificadas en 3 tipos de hormonas:

- **Derivadas de aminoácidos:** son aquellas que provienen de los aminoácidos triptófano y tirosina, por ejemplo: la tiroxina.⁹
- **Hormonas peptídicas:** son aquellas que se encuentran constituidas de aminoácidos y sus receptores se encuentran en la membrana celular, ya que debido a su estructura química no atraviesan la membrana.¹⁰

- Hormonas lipídicas:** son esteroides como la testosterona, dado su carácter lipofílico atraviesan fácilmente la bicapa lipídica de las membranas celulares y sus receptores se encuentran en el interior de la célula.¹¹

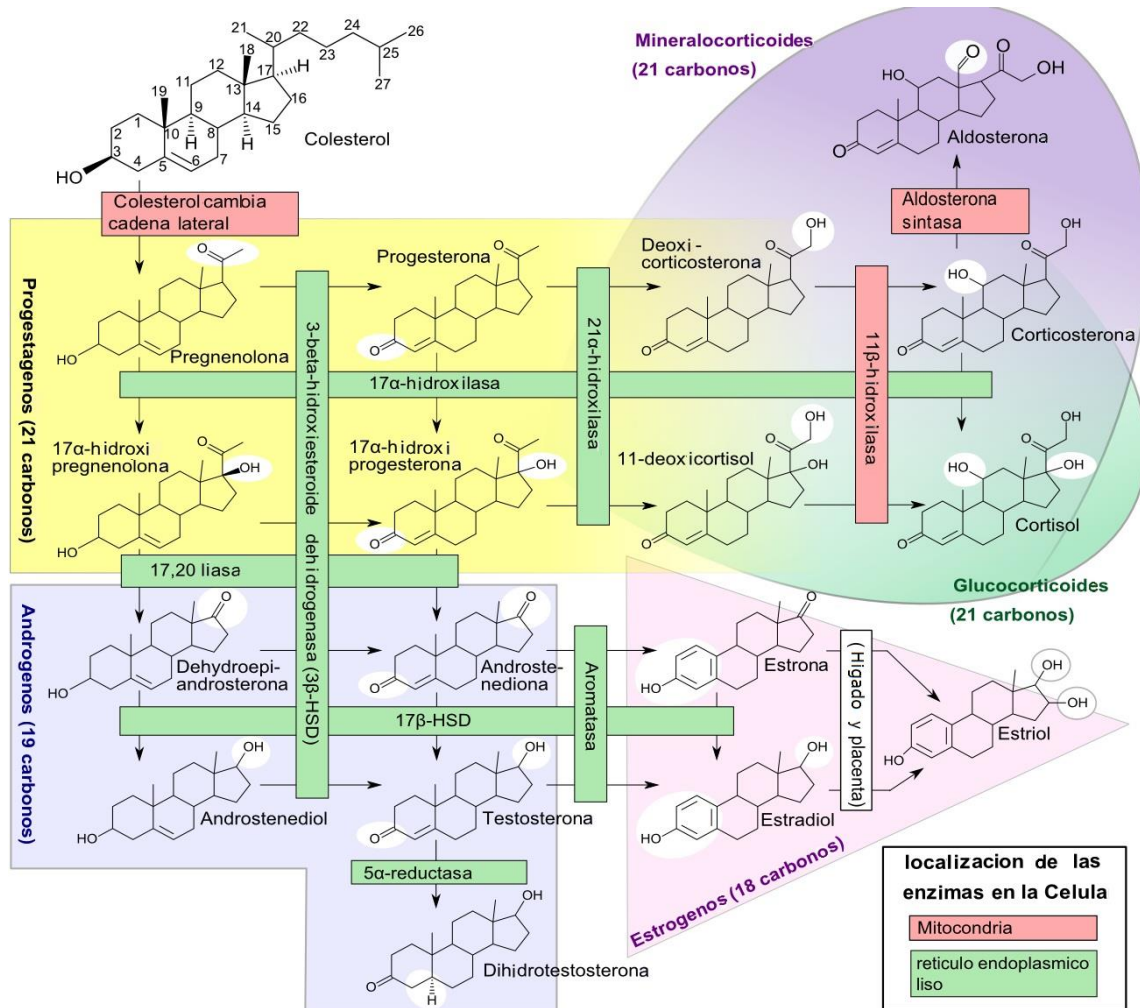


Figura. 1.2. Esteroidogénesis en los humanos.¹²

1.1.1. Receptores nucleares (RN)

Un número considerable de moléculas pueden ingresar al núcleo celular y allí ejercer efectos sobre la expresión de ciertos genes porque al ingresar se encuentran con los receptores nucleares, que al unirse a esas moléculas actúan como factores de transcripción que activan o silencian la expresión génica.

Los receptores nucleares no son siempre proteínas únicas, ni su función es un proceso directo si no que muchas veces se trata de complejos de múltiples proteínas o que actúan a través de mediadores (correguladores, coexpresores y coactivadores). Estos receptores pueden ser de tipo hormonal, de proteínas y de otras sustancias no hormonales, hasta el momento se conocen alrededor de 50 receptores de tipo nuclear, los cuales son considerados parte de una “superfamilia” y se clasifican en 6 subfamilias.¹³⁻¹⁵

1.1.2. Mecanismos de acción de las hormonas esteroidales

Generalmente, muchos de los efectos celulares de los esteroides se encuentran mediados a través del mecanismo genómico clásico, donde se toman los esteroides de la circulación a las células y se unen a receptores específicos (nucleares), el complejo hormona-receptor se dimeriza induciendo una disociación de las proteínas de choque térmico (HSP), después son translocados desde el citoplasma hasta el núcleo donde se reconocen los elementos de respuesta de la hormona e inducen cambios en la expresión de los genes diana, que expresaran proteínas que darán lugar a cambios en la función celular.¹⁶

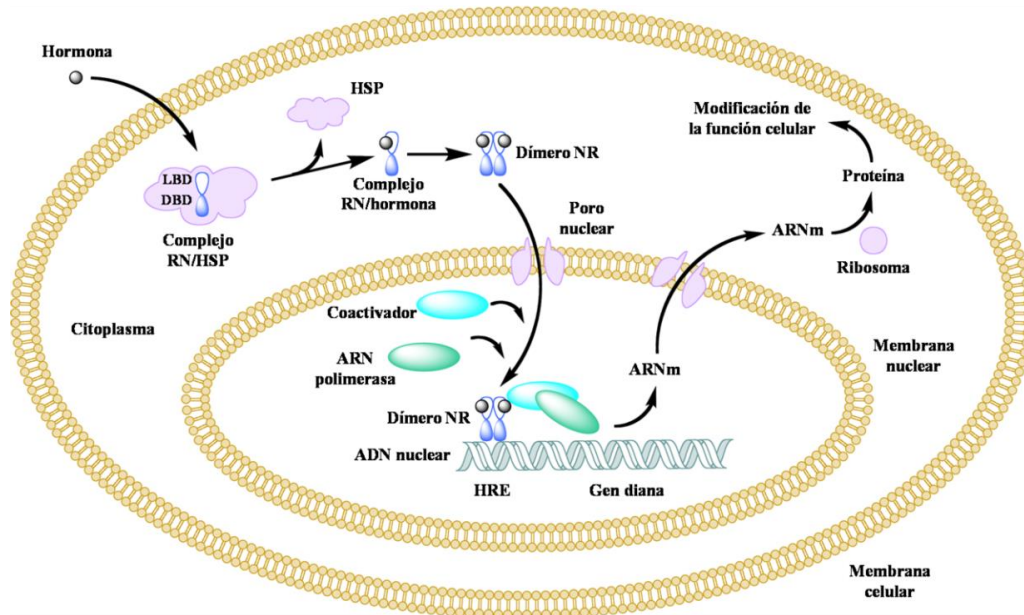


Figura. 1.3. Mecanismo de acción de los receptores nucleares por la vía clásica.¹⁷

Además de esta vía, también se han descrito varias acciones de tipo no genómica, donde los canales iónicos, receptores esteroideos asociados a la membrana, receptores ligados a

ANTECEDENTES

enzimas y proteínas citoplasmáticas activan cascadas de señalización intracelular que a su vez activan segundos mensajeros.¹⁸

1.1.1.1 Agonismo y Antagonismo

Dependiendo del receptor, del ligando y del tejido, los receptores nucleares pueden generar diversos efectos de respuesta entre los cuales se encuentran:

- **Agonistas:** sucede cuando los ligandos naturales se unen a sus correspondientes receptores nucleares, para activar la expresión génica y desencadenar los elementos de respuesta que se verán reflejados a nivel biológico. A los fármacos capaces de reproducir estos elementos de respuesta se les conoce como **Agonistas**.
- **Antagonistas:** contrario a los agonistas, los antagonistas son aquellos ligandos que no poseen ningún efecto, ni desencadenan elementos de respuesta al unirse al receptor nuclear, siendo capaces de bloquear el efecto del agonista y establecer una carrera competitiva por el mismo sitio activo del receptor. A los fármacos capaces de actuar de manera competitiva con un agonista se les conoce como **Antagonistas**.¹⁹

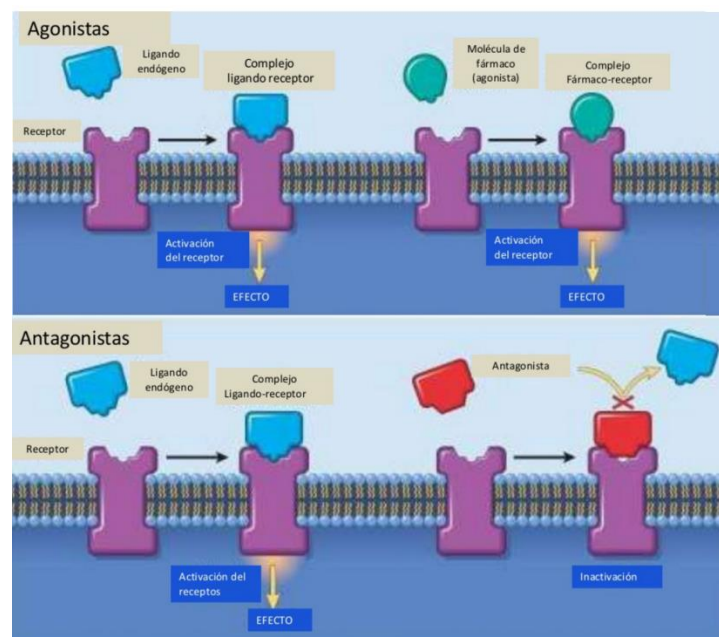


Figura. 1.4. Agonismo y antagonismo.²⁰

1.2. Generalidades sobre el cáncer

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) el cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación descontrolado de células anormales en el cuerpo.²¹

Las células normales se multiplican cuando el cuerpo las necesita y mueren cuando envejecen, se dañan o cuando el cuerpo ya no las requiere. Durante los primeros años de vida, el cuerpo genera células con más rapidez que en la etapa adulta, llegado a esta etapa el cuerpo solo genera nuevas células para reemplazar a las que se encuentran desgastadas o están muriendo.

El cáncer parece ocurrir cuando el material genético de una célula se altera, evitando que estas células mueran como deberían, y estimulando que se reproduzcan de manera descontrolada, transfiriéndole a sus células hijas el material genético dañado, haciéndolas resistentes a procesos de apoptosis (muerte celular programada). Debido a esto las células anormales son capaces de crecer de manera rápida y generar masas conocidas como tumores.

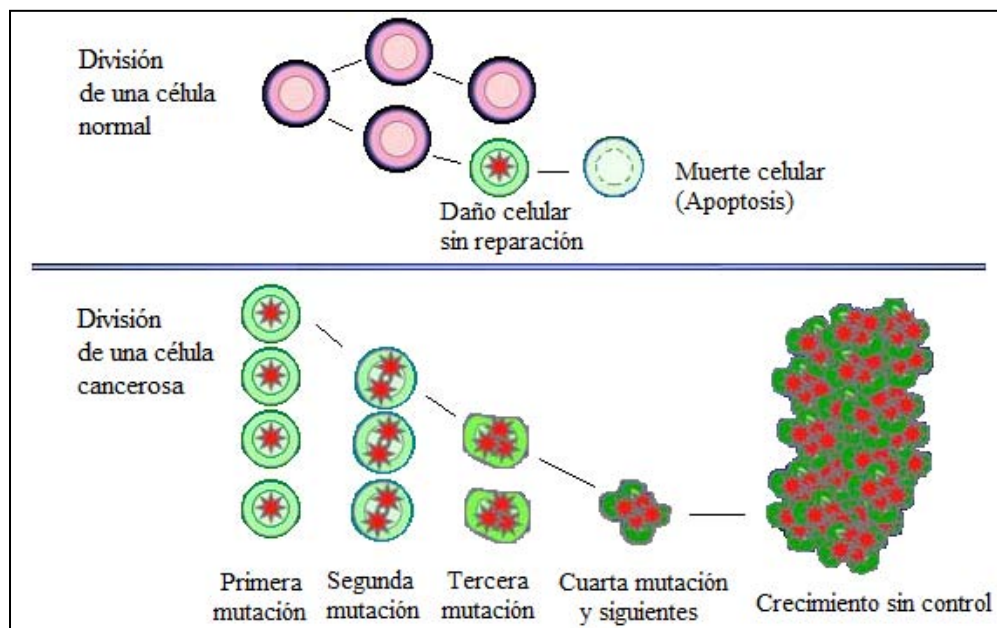


Figura. 1.5. Diferencia en la división celular de células normales y cancerígenas.¹

Muchos cánceres forman tumores sólidos en la mayoría de los casos, los cuales son masas de tejido, solo algunos tipos, como la leucemia, rara vez forman un tumor.

Los tumores de tipo cancerosos son aquellos donde las células anormales son capaces, no solo de crecer de manera descontrolada, sino que también son capaces de propagarse e invadir otros tejidos (metástasis), algo que las células normales no pueden hacer, esto define una célula como cancerosa, ya que es capaz de sobrevivir a la muerte programada e invadir tejidos. Al contrario que los tumores de tipo maligno, los tumores benignos no se extienden a otros tejidos cercanos.

Las células cancerosas difieren de las células normales de muchas maneras que les permiten crecer sin control y se vuelven invasivas. Una diferencia muy importante es que las células cancerosas son menos especializadas, es decir, las células normales tienen funciones muy específicas, mientras que las células cancerosas no; además, las células cancerosas tienen la capacidad de influir en células normales, en moléculas y en generar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis).²²

1.3. Hiperplasia prostática benigna (HPB) y Cáncer de próstata (CP)

La próstata es una glándula que se encuentra presente solo en hombres, se encuentra ubicada debajo de la vejiga y delante del recto. Su función es generar el líquido que protege y nutre a los espermatozoides en el semen.

El tamaño de la próstata va cambiando con la edad, crece rápidamente en la pubertad, estimulada por el aumento de las hormonas masculinas (andrógenos), como la testosterona (T) y la dihidrotestosterona (DHT).

Por lo general, la próstata se mantiene del mismo tamaño en los adultos o crece lentamente, conforme el hombre envejece la parte interna de la próstata sigue creciendo lo que puede llevar a un padecimiento conocido como Hiperplasia Prostática Benigna (HPB). Debido a el tamaño anormal de la próstata se presiona la uretra causando problemas para liberar la orina. La HPB no es cáncer y no se convertirá en cáncer, pero puede ser un serio problema para algunos hombres.²³

En la próstata se encuentran varios tipos de células, pero casi todos los cánceres se desarrollan a partir de las células glandulares. El término médico para este tipo de células es *Adenocarcinoma*.

ANTECEDENTES

Otros tipos de cáncer también pueden comenzar en la glándula prostática, incluyendo sarcomas, carcinomas de células pequeñas, y carcinomas de células de transición. Pero estos tipos de cáncer de próstata no son frecuentes.

Es de aclararse que el cáncer de próstata, después del cáncer de piel, es el cáncer más común en los hombres. Según la Sociedad Americana del Cáncer (SAC) cerca de 220.800 casos nuevos y 27.540 muertes fueron reportados en el 2015. Alrededor de 1 hombre de cada 7 será diagnosticado con cáncer de próstata en su vida.²⁴



Figura. 1.6. Próstata normal, próstata con hiperplasia prostática benigna (HPB) y próstata con cáncer (CP).¹

Los andrógenos (T y DHT) estimulan los receptores androgénicos de la próstata y son transportados dentro de células epiteliales, donde se convierte la T en DHT por efecto de las isoenzimas 5α -reductasa (tipo 1 y 2). Cabe aclarar que en la próstata esta biotransformación es llevada a cabo por la isoforma tipo 2, ya que se encuentra en mayor proporción en los tejidos prostáticos.

La DHT es conocida como la forma activa de la T (con 30 veces mayor afinidad por el RA), hasta el momento se conocen dos isoformas del receptor de andrógenos RA-A y RA-B, predominando la isoforma B en la próstata.

Es bien conocido que el mecanismo de acción del RA se lleva a cabo por la vía clásica de los receptores nucleares, en estos el receptor contiene un dominio de unión al ADN, el dominio de unión a la hormona y los dominios de activación. La unión de los andrógenos (T y DHT) desencadenan una cascada de señalización que incluye la fosforilación del receptor y su cambio conformacional, lo que disocia el complejo que forma con proteínas citoplasmáticas conocidas como chaperonas (Hsp), migrando hacia el núcleo. El RA

activado regula la expresión génica uniéndose a los elementos de respuesta androgénica (ERA) presentes en la región promotora o amplificadora de los genes. Como ocurre con otros receptores, el RA lleva a cabo la regulación transcripcional en concierto con otras proteínas nucleares que actúan como coactivadores o correpresores de la misma.²⁵

1.3.1. La enzima 5 α -reductasa

La enzima 5 α -reductasa es la encargada de catalizar la reducción reversible de la T a otro 4-eno-3-ceto esteroides tales como la DHT o 5-dihidro-3-ceto-esteroides utilizando como cofactor para la reducción el NADPH (forma reducida).

Hasta el momento se han encontrado 3 isoformas de la enzima: 5 α R1, 5 α R2 y 5 α R3.

La isoenzima tipo 1 se encuentra principalmente en el hígado, cerebro y el cuero cabelludo, mientras que la isoforma tipo 2 se encuentra principalmente en la próstata, vesículas seminales y en la piel de los genitales, mientras que la isoforma tipo 3 ha sido recientemente encontrada en tejidos de tipo no androgénicos (páncreas y cerebro) y en el cáncer próstata resistente a la castración (CPRC).²⁶⁻²⁷

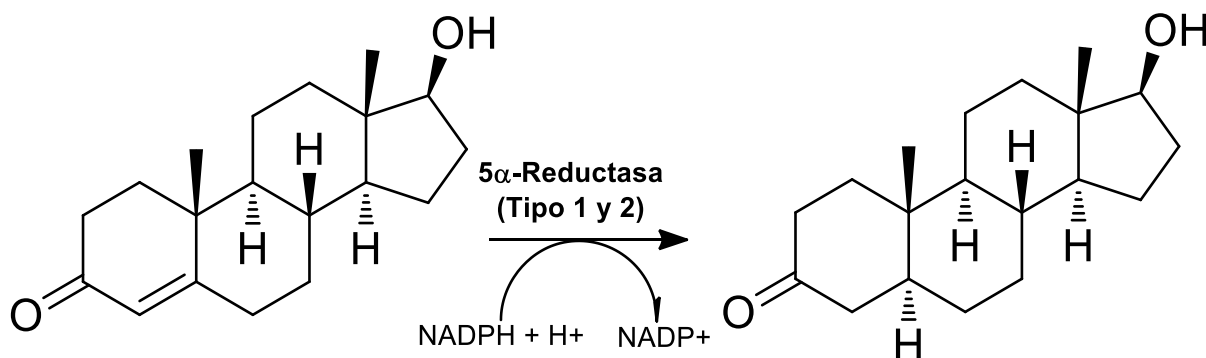


Figura. 1.6. Transformación de la T a DHT por efecto de las isoenzimas 5 α -reductasa.

Las isoformas 1 y 2 comparten un 60 % de similitud entre ellas y se pueden distinguir claramente por:

Tabla 1.1. Diferencias entre las isoenzimas tipo 1 y 2 de la 5 α -reductasa²⁷

	Isoforma 1	Isoforma 2
Peso molecular	29.5 kDa	28.4 kDa
Numero de aminoácidos	259	254
pH optimo	Alcalino ~6-8.5	Acido ~5-5.5
Constantes cinéticas (Km)	1-5 μ M	0.1-1 μ M
Distribución	Hígado, piel, cerebro, ovarios, testículos, próstata.	Próstata, vesículas seminales, útero, pecho, folículo capilar, epidídimo, placenta, testículos.
Gen que la codifica	SRD5A1	SRD5A2
Estado bioquímico	Hidrofóbica	Hidrofóbica

El mecanismo de acción de la enzima 5 α -reductasa se da mediante la donación directa de un hidruro *pro-S* por parte del cofactor NADPH hacia la cara α , la cual es la menos impedida de la T, una vez que ha sido activada la enona por la interacción electrostática entre la enzima y la T, el enolato que se genera es estabilizado por la enzima y subsecuentemente es protonado para generar la 5 α -DHT (Fig. 1.7.).²⁸⁻²⁹

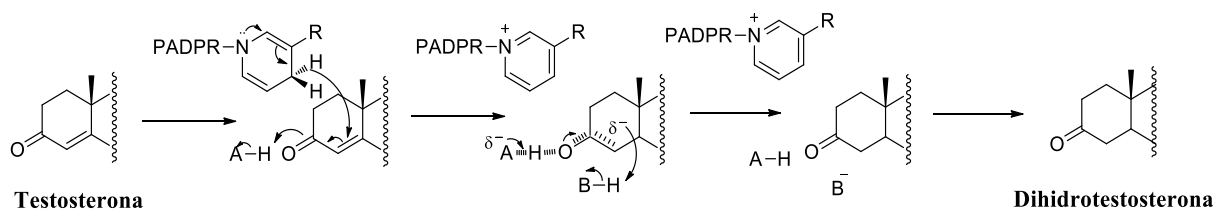


Figura. 1.7. Mecanismo de transformación de T a DHT.³⁰

Ninguna de las isoenzimas ha sido purificada a la fecha debido a que son proteínas de membrana y su naturaleza es inestable, por lo que los inhibidores de estas han sido diseñados basados en sustrato natural y sus características químicas.

1.3.2. Posibles factores de riesgo

A pesar de que no se entiende por completo las posibles causas del cáncer de próstata, existen varios factores que pueden aumentar el riesgo de padecer la enfermedad.³¹ Algunos factores de riesgo son:

ANTECEDENTES

- Edad.³²
- Raza.³³
- Antecedentes familiares.³⁴
- Genes.³⁵
- Alimentación.³⁶
- Tabaquismo.³⁷

1.3.3. Detección temprana del cáncer de próstata

La detección temprana del CP, la cual busca detectar a tiempo la presencia del cáncer, se basa en las pruebas que se realizan para encontrar la enfermedad. Estas pruebas son:

- **Examen digito-rectal (DRE):** el médico introduce un dedo cubierto con un guante en el recto a fin de palpar cualquier abultamiento anormal en la próstata que pudiese ser cáncer. La glándula prostática se encuentra inmediatamente delante del recto y la mayoría de los cánceres comienzan en la parte posterior de la glándula.
- **Prueba prostática del antígeno específico (PSA):** el antígeno prostático específico es una sustancia producida por las células de la glándula prostática. El PSA se encuentra en el semen, aunque también se puede encontrar en la sangre en pequeñas cantidades. En hombres sanos la concentración de PSA es menor a 4 nanogramos por mililitro de sangre (ng/mL). A mayor cantidad de PSA en la sangre, mayor es la probabilidad de padecer cáncer.

1.3.4. Tratamientos comunes sobre el cáncer de próstata

Existen varios tratamientos para los pacientes con cáncer de próstata. Algunos de los tratamientos son estándares, es decir, son los más utilizados en la actualidad, algunos están en etapa de investigación.

Algunos de los tratamientos son:

- Terapia expectante (espera en observación) o vigilancia activa.³⁸
- Cirugía.³⁹

ANTECEDENTES

- Radioterapia.⁴⁰
- Criocirugía (crioterapia).⁴¹
- Quimioterapia.⁴²
- Tratamiento con vacunas.⁴³
- Terapia hormonal.⁴⁴

1.3.4.1. Terapia hormonal: también llamada hormonoterapia, tratamiento hormonal o terapia endocrina. Consiste en retardar o detener el crecimiento de tumores sensibles a hormonas, que bloquean o interfieren con la producción de hormonas en el cuerpo. Aquellos tumores que no son sensibles a hormonas, conocido como hormono-independientes no reaccionan a estas terapias.

En el cáncer de próstata hormono-dependiente el tratamiento de terapia hormonal es también conocido como *terapia de privación de andrógenos (ADT)* o *terapia supresora de andrógenos*. El objetivo de este tratamiento es reducir los niveles de andrógenos o prevenir que estas hormonas alcancen las células cancerosas de la próstata, que pueden estimular el crecimiento del mismo.

Se puede emplear varios tipos de terapia hormonal para tratar el cáncer de próstata:

- **Orquiectomía:** consiste en un procedimiento quirúrgico para extirpar uno o ambos testículos (castración), disminuyendo la cantidad de andrógenos (T y DHT). Al eliminar esta fuente, la mayoría de los cánceres de próstata dejan de crecer o se reduce su tamaño por un tiempo.
- **Análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH):** los agonistas de la luliberina son proteínas sintéticas que se unen al receptor de esta hormona en la glándula hipófisis. Normalmente cuando los niveles de andrógenos están bajos, la luliberina estimula a la glándula hipófisis para que produzca lutropina, la cual a su vez, estimula la producción de andrógenos por los testículos. El tratamiento con agonista se llama castración química, porque puede bajar las concentraciones andrógenos en el cuerpo al mismo grado que la orquiectomía. El efecto de estos fármacos es reversible.
- **Antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH):** estos actúan impidiendo que la luliberina se una a sus receptores en la glándula hipófisis, lo cual, a su vez impide la secreción de la lutropina, bajando los niveles de

ANTECEDENTES

andrógenos. A diferencia que los agonistas, los antagonistas no causan una exacerbación del tumor.

- **Estrógenos:** aunque los estrógenos tienen también la capacidad de inhibir la producción de andrógenos por los testículos, en la actualidad rara vez se usan para el tratamiento del cáncer de próstata debido a sus efectos secundarios.

Es importante mencionar que todos estos tratamientos causan efectos secundarios tales como bochornos, deterioro de la función sexual y pérdida del apetito sexual.

- **Antiandrógenos:** son fármacos que compiten con los andrógenos para unirse a su receptor. Son capaces de bloquear la capacidad del cuerpo para utilizar cualquier andrógeno. Aun después de la orquiectomía o durante el tratamiento con análogos de LHRH, las glándulas suprarrenales continúan produciendo pequeñas cantidades de andrógenos. Ya que los antiandrógenos no bloquean la producción total de andrógenos, se usan en combinación de otros tratamientos.

Existen tratamientos que bloquean la producción de andrógenos en todo el cuerpo, sin embargo ni la castración química ni la quirúrgica bloquean a las glándulas suprarrenales o las células cancerosas de la próstata para que no produzca andrógenos, aun cuando las cantidades de andrógenos son pequeñas, esas cantidades pueden ser suficientes para sostener el crecimiento de algunos tipos de cánceres de próstata.

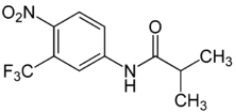
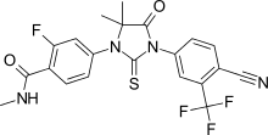
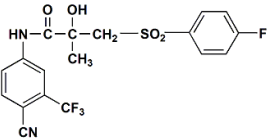
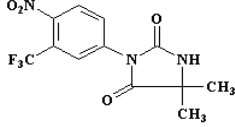
Los fármacos que impiden que las glándulas suprarrenales (así como los testículos y las células cancerosas de la próstata) produzcan andrógenos, se conocen como inhibidores sintéticos, los cuales pueden bajar las concentraciones de testosterona en el cuerpo. Estos fármacos bloquean la producción de testosterona al inhibir la enzima llamada CYP17. Esta enzima, la cual se encuentra en el tejido tisular, en tejido suprarrenal y en el tejido de los tumores de próstata, tiene como función central permitir al cuerpo la producción de testosterona a partir del colesterol.

El primer inhibidor del CYP17 fue el Ketoconazol, el cual aun es empleado en tratamientos contra el cáncer resistente a castración, presenta un efecto de amplio espectro, es decir, no es específico, ya que al mismo tiempo inhibe al citocromo P450, como el CYP34A y el CYP24A1, generando hepatotoxicidad, toxicidad gastrointestinal e insuficiencia renal.⁴⁵

ANTECEDENTES

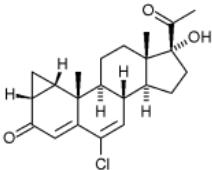
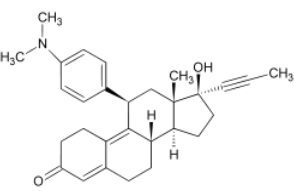
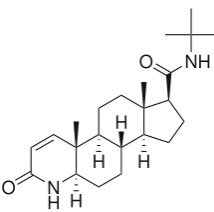
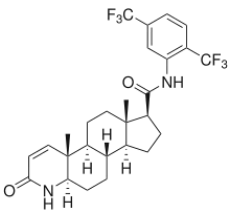
Existen dos tipos de antiandrógenos, los de tipo esteroidal y los de tipo no esteroidal. Los medicamentos de tipo no esteroidal, como la Flutamida (Eulexin®), la enzalutamida (Xtandi®), la Bicalutamida (Casodex®) y la Nilutamida (Nilandron®), se encuentran aprobados en los Estados Unidos y se administran vía oral como píldoras de uso diario.

Tabla 1.2. Antiandrógenos de tipo no esteroidal

No esteroidales			
 <p>Flutamida</p>	 <p>Enzalutamida</p>	 <p>Bicalutamida</p>	 <p>Nilutamida</p>

Entre los medicamentos de tipo esteroidal se encuentran la Ciproterona, Mifepristona, Finasterida (Proscar®) y Dutasterida (Avodart®).

Tabla 1.3. Antiandrógenos de tipo esteroidal

Esteroidales			
 <p>Acetato de ciproterona</p>	 <p>Mifepristona</p>	 <p>Finasterida</p>	 <p>Dutasterida</p>

La Finasterida y la Dutasterida son utilizados como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa para tratar la hiperplasia. La Finasterida es conocida por ser capaz de inhibir de manera selectiva la isoforma tipo 2 de la enzima y se ha encontrado que tiene una disminución de los niveles de DHT en suero de un 85% y en próstata en un 90%, la DHT remanente es sintetizada por acción de la isoforma 1. Por otro lado, la Dutasterida es un inhibidor no selectivo de ambas isoenzimas, siendo capaz de disminuir los niveles de DHT en suero en un 95%. Entre los efectos secundarios causados por estos dos medicamentos son disfunción eréctil, disminución de la libido, impotencia sexual, entre otros.⁴⁶

Cabe aclarar que la Finasterida actúa como inhibidor competitivo y su mecanismo de acción, a diferencia de la T, ya no se lleva a cabo la transferencia de protón en el residuo de

la enzima (letra B) al carbanión, lo que promueve la formación de un aducto entre el NADPH y el anillo lactámico.

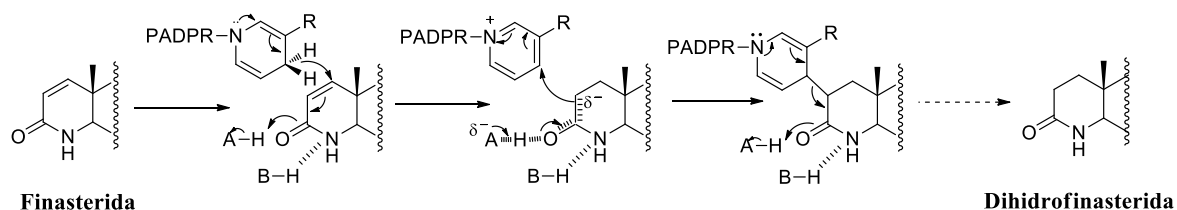


Figura. 1.8. Mecanismo de transformación de Finasterida a Dihidrofinasterida.³⁰

Entre los fármacos más recientes para terapia hormonal se encuentra la Abiraterona (Zytiga®), un fármaco recientemente aprobado por la FDA. La abiraterona es un inhibidor selectivo de la enzima CYP17, éste es capaz de disminuir los niveles de estradiol, DHT y androstenediona. Gracias a esto es posiblemente el antiandrógeno con más éxito en el mercado. Debido a su baja biodisponibilidad, la abiraterona se comercializa como el profármaco, el cual se encuentra metilado en el carbono 3 (acetato de abiraterona).⁴⁷

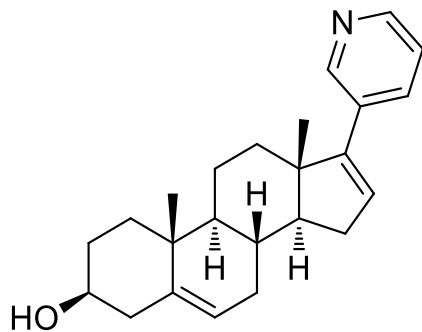


Figura. 1.9. Abiraterona.

Debido a que los métodos de tratamiento utilizados hoy en día presentan efectos colaterales indeseados, en la actualidad hay una continua búsqueda de nuevas estructuras químicas (naturales o sintéticas) que sean capaces de mitigar estos efectos y presenten mayor actividad antiandrogénica y mejor selectividad.

ANTECEDENTES

En la literatura se describen numerosos ejemplos de compuestos sintéticos usados en el tratamiento de tumores cancerígenos, ya sean de tipo hormono-dependiente o independiente.⁴⁸⁻⁵³

La resistencia a estas terapias y los efectos secundarios causados por la terapia hormonal convencional impide lograr un tratamiento eficaz y exitoso. Debido a esto en nuestro grupo de investigación se han desarrollado diferentes tipos de derivados hormonales basados en el esqueleto del pregnano o del androstano, los cuales han mostrado una importante actividad biológica sobre diferentes líneas celulares de cáncer (PC-3: próstata independiente de andrógenos, MCF7: mama, SK-LU-1: pulmón, LNCaP: próstata dependiente de andrógenos) y como inhibidores de las isoenzimas tipo 1 y 2 de la 5 α -reductasa, además, varios de los compuestos obtenidos mostraron una notable disminución en el peso de la próstata, las vesículas seminales y el diámetro de la mancha pigmentada al ser evaluados *in vivo* sobre hámsteres de la cepa *Syriam Golden* previamente tratados con T, convirtiéndolos en potenciales agentes antiandrogénicos.⁵⁴⁻⁶²

2. HIPOTESIS

Considerando que en el transcurso de los últimos años en nuestro grupo de investigación se han sintetizado un gran número de derivados del pregnano y se han obtenido potentes inhibidores de las isoenzimas 5 α -reductasa tipo 1 y 2, con potencial actividad en el tratamiento de la HPB y el CP, se espera que los compuestos sintetizados en este proyecto presenten una buena actividad inhibitoria debido a que el grupo éster en C-3 y la función azol en C-21 le conferirán un mejor efecto lipofílico a la molécula y facilitará su paso a través de las membranas celulares.

3. OBJETIVOS

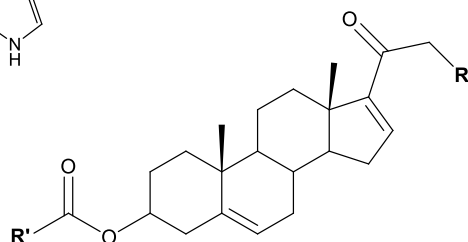
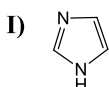
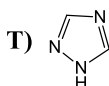
3.1. Objetivo general

Sintetizar nuevos derivados del acetato de 16-dehidropregnenolona con un grupo éster de tipo lineal o alicíclico en C-3 y una función azol en C-21 (1,2,4-triazol o 1*H*-imidazol), esperando que estas nuevas moléculas presenten una alta actividad inhibitoria sobre las isoenzimas 5 α -reductasa y diferentes líneas celulares de cáncer para determinar su efectividad como posibles agentes antiandrogénicos o antineoplásicos.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar nuevos derivados esteroidales basados en el esqueleto del pregnano con un grupo éster de tipo lineal o alicíclico en C-3 y una función azol 1,2,4-triazol o 1*H*-imidazol) en C-21.

R=



R'= a) CH₃-

b) CH₃CH₂-


c) CH₃CH₂CH₂-


d) CH₃CH₂CH₂CH₂-

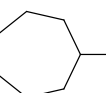
e) CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-

f) 

g) 

h) 

i) 

j) 

- Evaluar *in vitro*:
 - El porcentaje de inhibición del crecimiento sobre líneas celulares de cáncer (PC-3: próstata independiente de andrógenos, MCF7: mama, SK-LU-1: pulmón).
 - La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) para las isoenzimas 1 y 2 de la 5 α -reductasa.
 - La posible unión de los compuestos sintetizados al receptor de andrógenos (RA).
- Evaluar *in vivo* el efecto de los compuestos sobre el peso de la próstata, las vesículas seminales y diámetro de la mancha pigmentada en hámsteres castrados.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental de este proyecto se dividió en tres partes:

La primera parte consistió en la síntesis, purificación, caracterización física, espectroscópica y espectrométrica de los compuestos finales e intermediarios de cada una de las rutas sintéticas implementadas.

La segunda parte consistió en la evaluación biológica de los derivados del pregnano, la cual se llevo a cabo mediante pruebas *in vitro*, por medio de la evaluación citotóxica sobre diferentes líneas celulares de cáncer (PC-3: próstata, MCF7: mama, SK-LU-1: pulmón), La determinación de la CI_{50} sobre las enzimas 5α -reductasa tipo I y II, la afinidad de los compuestos finales por el receptor de andrógenos (en RA de rata).

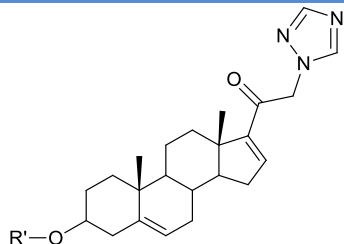
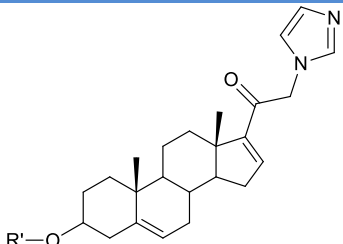
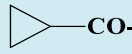
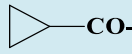
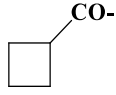
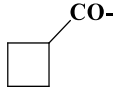
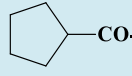
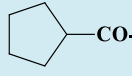
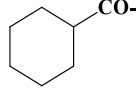
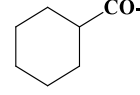
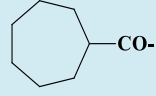
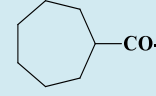
Además como un trabajo complementario a estas pruebas se realizó la determinación de las CI_{20} y CI_{50} , para los dos compuestos con mejor actividad sobre las líneas cancerosas humanas, y en base a estos resultados se tomo el compuesto con mayor efecto antiproliferativo y se evaluó sobre diferentes genes involucrados en la proliferación y la apoptosis celular (ciclina D1, Ciclina E1, EGA1, Ki-67, BIM y survivina). También se realizaron estudios de transactivación génica (transfección) sobre la línea de cáncer cérvico-uterino HeLa con el receptor de progesterona (RP) y de andrógenos (RA) y un estudio de inducción génica sobre el gen CYP24A1 para evaluar el efecto sobre receptor de vitamina D (RVD) sobre la línea celular de cáncer de próstata PC-3.

Finalmente la tercera parte consistió en las evaluaciones *in vivo* las cuales se realizaron sobre hámsteres de la cepa *Syriam Golden* previamente castrados, para determinar el efecto antiandrogénico de los compuestos sintetizados, evaluando el peso de la próstata, vesículas seminales y el diámetro de la mancha pigmentada (órgano flanco).

4.1. Desarrollo químico

Se realizó la síntesis química de los siguientes derivados del pregnano.

Tabla 4.1. Compuestos finales

 T7, T8 (a-j) R	 I7, I8 (a-j) R
8) H-	7) H-
a) CH₃CO-	a) CH₃CO-
b) CH₃CH₂CO-	b) CH₃CH₂CO-
c) CH₃CH₂CH₂CO-	c) CH₃CH₂CH₂CO-
d) CH₃CH₂CH₂CH₂CO-	d) CH₃CH₂CH₂CH₂CO-
e) CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂CO-	e) CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂CO-
f) 	f) 
g) 	g) 
h) 	h) 
i) 	i) 
j) 	j) 

Cada uno con su respectiva caracterización espectroscópica, tanto de los compuestos finales como de los compuestos intermedios.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Las materias primas utilizadas se obtuvieron comercialmente en grado reactivo, con una previa recristalización del acetato de 16-dehidropregnenolona en metanol, con el fin de eliminar impurezas.

Para determinar el avance y la pureza de los productos de cada reacción se usó la cromatografía en capa fina (CCF) en cromatoplasmas de vidrio recubiertas de gel de sílice marca Aldrich® con 0.2 mm de espesor y diferentes sistemas de elución, utilizando una solución de CoCl_2 al 2% en $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (1:4) y lámpara de luz UV ($\lambda=254$ nm) para visualizar las manchas. De igual forma se determinó el punto de fusión de cada uno de los compuestos con un aparato Fisher-Johns (no corregidos).

La purificación por cromatografía abierta en columna se realizó con una fase estacionaria de gel de sílice 60 (Aldrich®) o con Florisil 200 (Aldrich®)

La evaporación de los disolventes se realizó en un rotaevaporador marca IKA modelo RV-10 Basic.

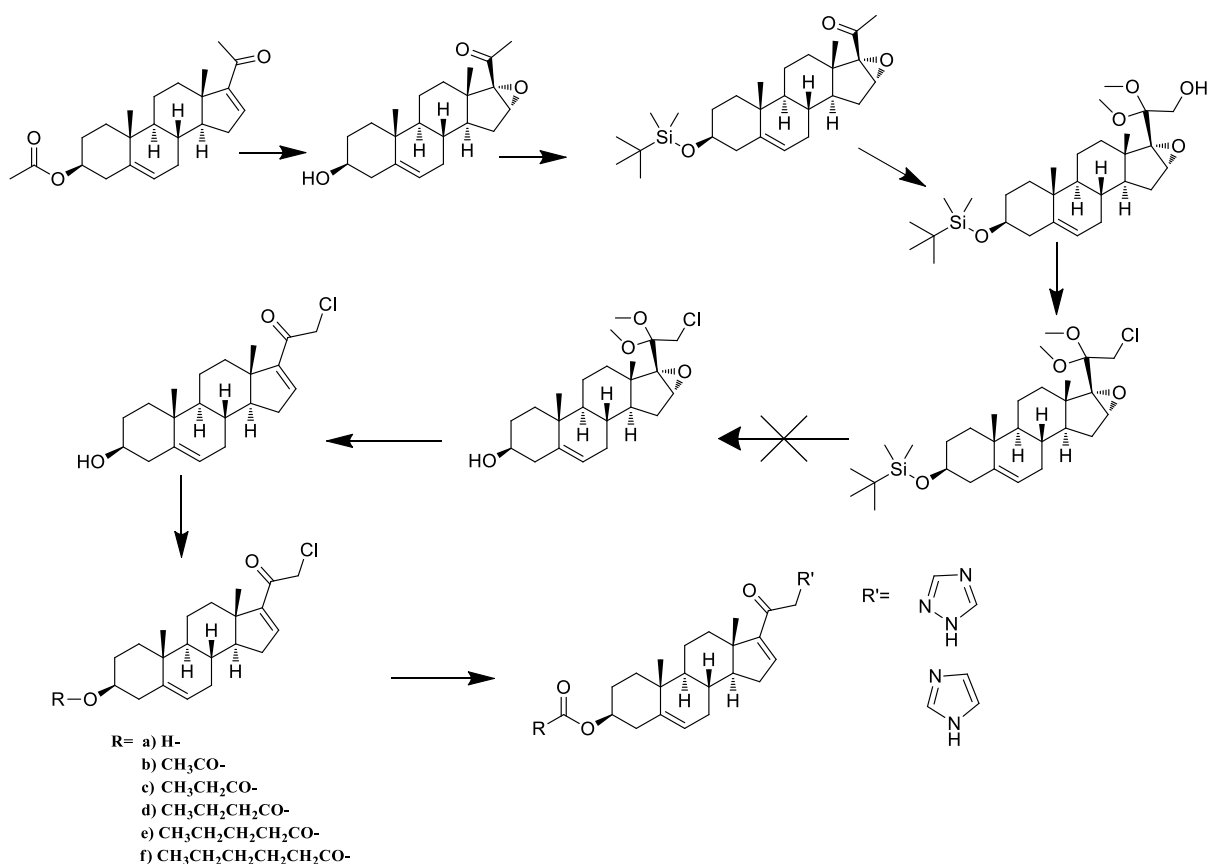
Para la caracterización de los compuestos se tuvieron en cuenta los siguientes equipos de análisis espectroscópico y espectrométrico:

- Para la Espectrofotometría de absorción en el Infrarrojo (IR) un espectrofotómetro FT-IR/FT-FIR Perkin Elmer spectrum 400, utilizando la técnica de Reflectancia por ATR. Las unidades se reportan en cm^{-1} .
- Para el análisis de espectrofotometría de absorción en el Ultravioleta (UV) se utilizó un equipo UV- VIS Perkin Elmer modelo Lambda 2, utilizando como disolvente metanol.
- Para la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ^1H) y Carbono (RMN ^{13}C) se utilizaron equipos Inova Varian VRX-300S (400 MHz) y Inova Varian 300S (75 MHz), utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y donde el 0 es el desplazamiento (δ) del tetrametilsilano (TMS). Para ambos análisis las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hz. La multiplicidad de las señales se expresan como s=simple, d=señal doble, dd= señal doble de doble, ddd=señal doble de doble de doble, sa=señal simple ancha, t=señal triple, m =señal multiplete.

- Para el análisis espectrométrico de masas se utilizó un equipo Thermo-Electron modelo DFS (Double Focus Sector) con un analizador másico de doble sector (magnético y eléctrico, geometría inversa), empleando la técnica FAB⁺ (bombardeo de átomos rápidos, FAB por sus siglas en inglés), utilizando una matriz interna de alcohol *m*-nitrobenílico que fue irradiada con átomos de cesio a temperatura menor de 50 °C, detectando los iones positivos, el ion molecular se indica como M⁺ y *m/z* como la masa/carga.

4.1.1. Rutas sintéticas

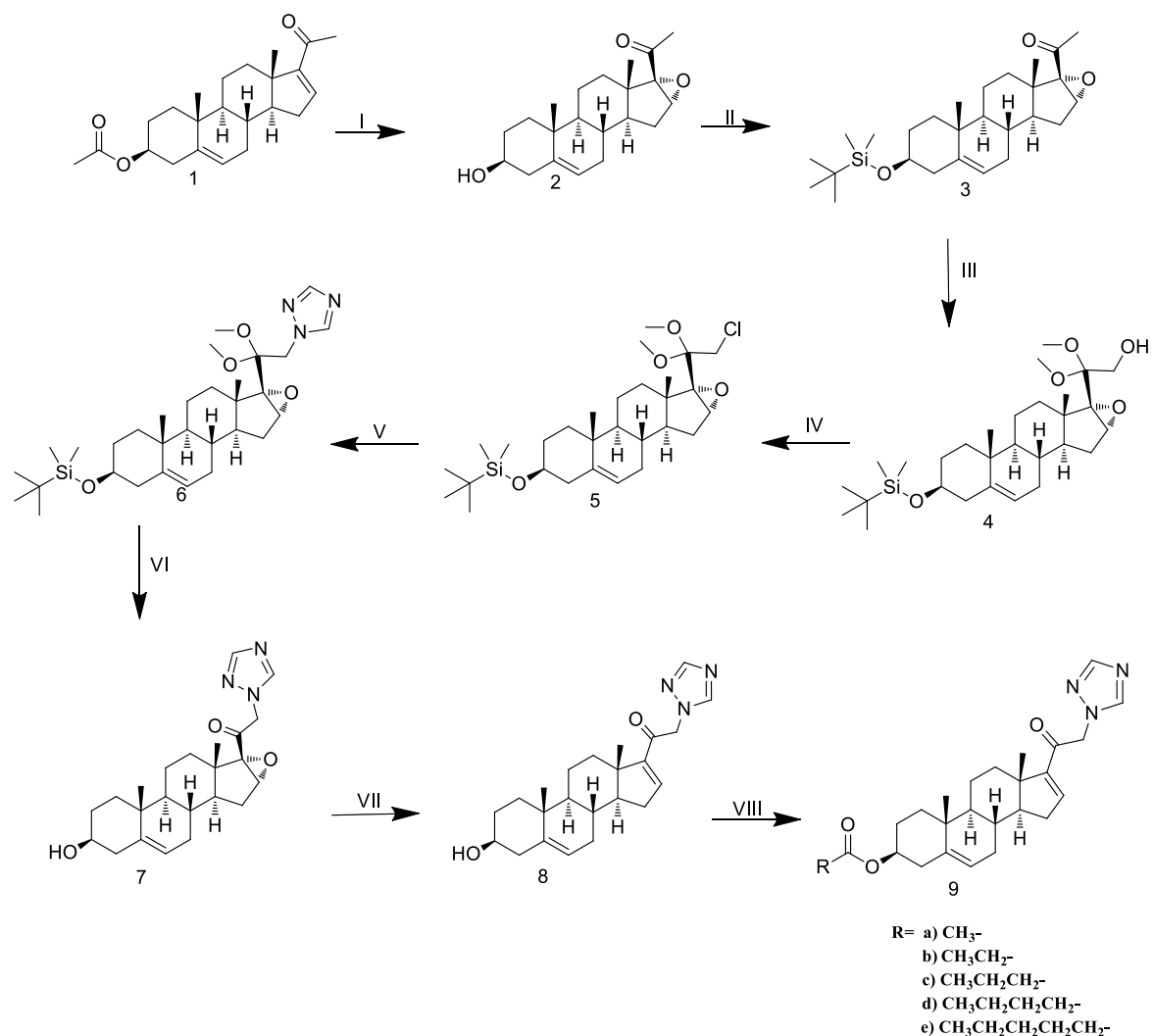
La ruta sintética propuesta inicialmente fue la siguiente.



Esquema 4.1. Ruta sintética propuesta inicialmente.

Debido a que la ruta anterior no fue viable se propuso la siguiente ruta para la síntesis de los compuestos **8**, **9a-e**

RUTA 1

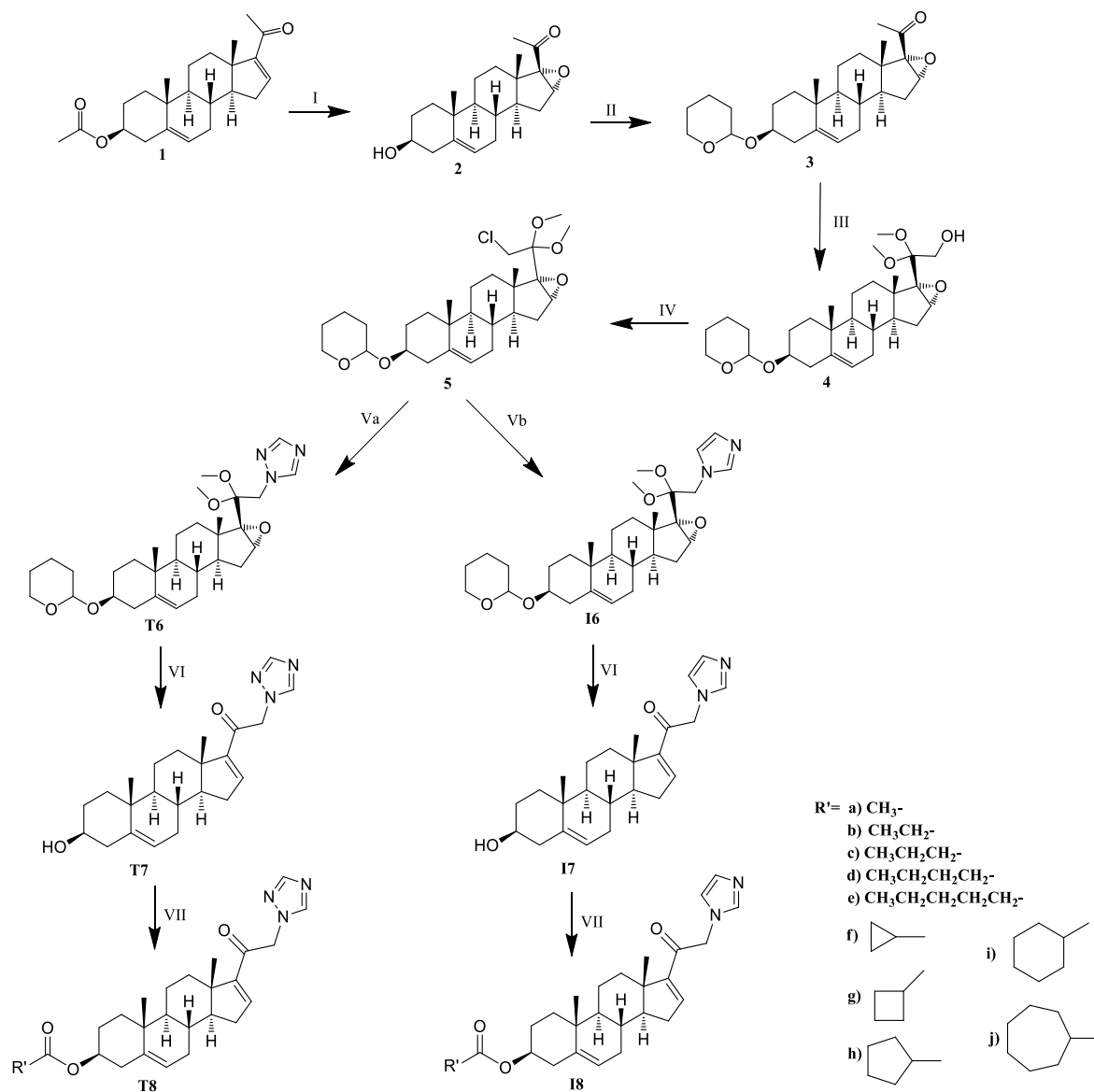


(I) H₂O₂/OH, (II) TBDMS, imidazol/DFM; (III) NaOH, C₆H₅I(OAc)₂/MeOH, (IV) SOCl₂, Py/CH₂Cl₂;
 (V) C₂H₃N₃, K₂CO₃/DMF; (VI) HCl/acetona; (VII) CrCl₂/Ac. Acético, (VIII, b-e) R-COOH, DCC, 4-DMAP/CHCl₃; (VIII a) CH₃COOCOCH₃/Py.

Esquema 4.2. Ruta sintética implementada para obtener los primeros compuestos finales.

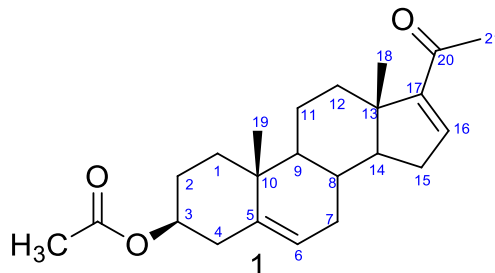
Debido a que en el momento de realizar la síntesis de la siguiente serie de compuestos se terminó el grupo protector utilizado en el paso II (cloruro de *tert*-butil(dimetil)sililo), se propuso otra ruta de síntesis.

RUTA 2



En esta ruta se reduce el número de pasos de reacción y se cambia el grupo protector utilizado en el paso II por el 3,4-Dihidro-2*H*-pirano.

4.1.2. Propiedades físicas y espectroscópicas de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1)



Debido a que la materia prima no es pura, se realizó una recrystalización en metanol, obteniéndose un polvo cristalino de color blanco que presentó las siguientes propiedades.

Fórmula molecular: C₂₃H₃₂O₃

Peso molecular (u.m.a.): 356.24

Punto de fusión (° C): 170-172

UV (nm): 237.96 (Carbonilo α - β insaturado en C-20), 206.07 (Función éster en C-3).

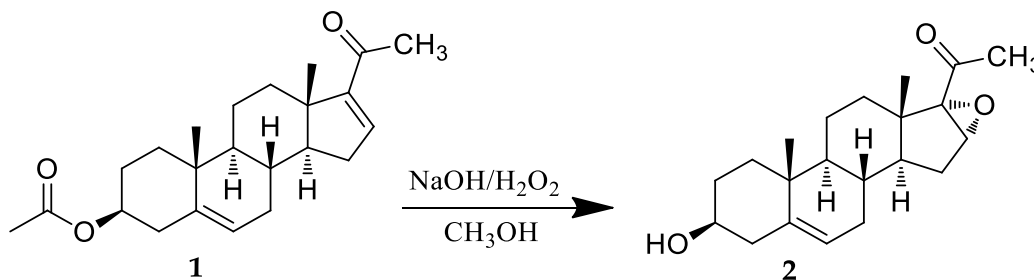
IR (cm⁻¹): 2942.70 (C-H de CH₂ y CH₃), 2865.06 (C-H de CH₂ y CH₃), 1728.30 (C=O de éster en C-3), 1660.22 (C=O de α - β insaturado en C-20), 1583.66 (C=C conjugado en C-16), 1364.87 (CH₃ y CH₂), 1232.47 (C-O-C en C-3), 1035.44 (C-O-C en C-3).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0,92 (s, H-18, 3H), 1.06 (s, H-19, 3H), 2.03 (s, H en CH₃ del éster, 3H), 2.26 (s, H-21, 1H), 4.6 (m, H-3, 1H), 5.38 (d, J = 5.3 Hz, H-6, 1H), 6.71 (d, J =1.2 Hz, H-16, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 15.72 (C-18), 19.23 (C-19), 20.64 (C-11), 21,42 (CH₃ del éster), 27.73 (C-21), 30.16 (C-8), 31,54 (C-7), 34.61 (C-12), 36.87 (C-10), 38.15 (C-1), 46.08 (C-13), 50.39 (C-9), 56.36 (C-14), 73.86 (C-3), 121.98 (C-6), 140.27 (C-5), 144.37 (C-16), 155.35 (C-17), 170.52 (C=O del éster), 196.80 (C-20).

EM-FAB (6eV) m/z [M+H]⁺: 357 pico base.

4.1.3. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (2)



En un matraz bola de 100 mL se disolvió 1,0 g (2.8 mmol) del esteroide **1** en metanol caliente (66 mL), se agregó NaOH 4N (2 mL, 8 mmol) y H₂O₂ al 30 % (4 mL, 135 mmol), la mezcla se dejó en agitación por 4 horas a temperatura ambiente.

Terminada la reacción se secó el metanol a presión reducida en un rotaevaporador, se lavó con agua, se filtró, se dejó secar obteniéndose un sólido blanco cristalino con un rendimiento del 72%. No se separaron isómeros α y β del epóxido, estando en mayor proporción el isómero α . A continuación, se muestran las señales características del compuesto **2**.

Fórmula molecular: C₂₁H₃₀O₃

Peso molecular (u.m.a.): 330.46

Punto de fusión (° C): 197-200

IR (cm⁻¹): 3343 (-OH en C-3), 2936 (C-H de CH₂ y CH₃), 1690 (C=O de C-20), 1634 (C=C en C-5), 1045 (C-O-C del epóxido en C-16), 1054 (C-O de -OH en C-3).

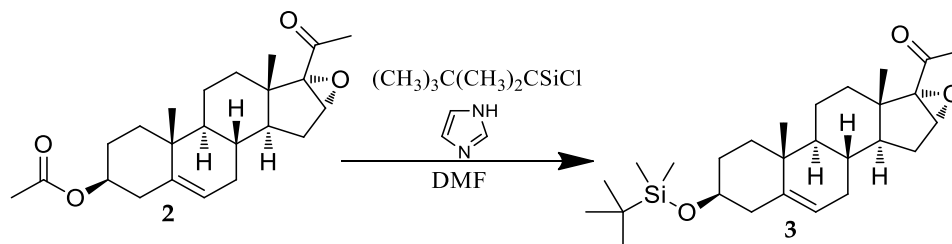
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.00 (s, H-18, 3H), 1.03 (s, H-19, 3H), 2.01 (s, H-21, 1H), 3.47 (m, H-3, 1H), 3.66 (s, H-16, 1H), 3.50 (s, -OH, 1H), 5.30 (d, $J=5.3$ Hz, H-6, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 15.38 (C-18), 19.30 (C-19), 27.51 (C-21), 60.55 (C-16), 71.16 (C-17), 71.75 (C-3), 121.11 (C-6), 141.28 (C-5), 205.07 (C-20).

EM-FAB (6eV) m/z [M+H]⁺: 331 pico base.

A continuación se describe la síntesis y caracterización de los compuestos intermediarios y finales obtenidos por la ruta 1.

4.1.4. Síntesis de 3 β -{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona (3 en ruta 1)



En un matraz bola de 100 mL se disolvió 1,0 g (3.02 mmol) del esteroide **2**, 0.75 g (5.51 mmol) de TBDMS y 0.48 g (7.71 mmol) de imidazol, en DMF seco (15 mL), la solución restante se dejó en agitación por 2 h a temperatura ambiente, terminada la reacción, se evaporó la DMF al vacío y el producto final se lavó con agua obteniendo un sólido blanco con un rendimiento del 87%.

Fórmula molecular: C₂₇H₄₄O₃Si

Peso molecular (u.m.a.): 444.30

Punto de fusión (° C): 118-120

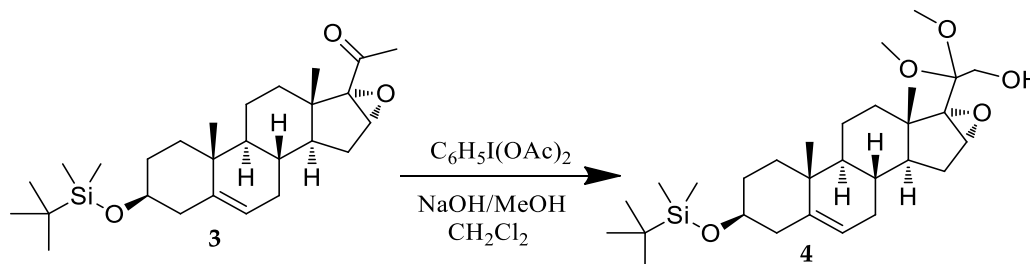
IR (cm⁻¹): 2928 (C-H de CH₂ y CH₃), 1698 (C=O de C-20), 1642 (C=C en C-5), 1083 (C-O-C del epóxido en C-16).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.05 (CH₃ del grupo protector), 0.88 (CH₃ del grupo protector), 1.00 (s, H-18, 3H), 1.03 (s, H-19, 3H), 2.02 (s, H-21, 1H), 3.47 (m, H-3, 1H), 5.29 (d, H-6, *J*=5.3 Hz, 1H), 3.67 (s, H-16, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: -4.33 (CH₃ del grupo protector), 15.40 (C-18), 19.32 (C-19), 26.08 (CH₃ del grupo protector), 27.70 (C-21), 60.57 (C-16), 71.11 (C-17), 72.55 (C-3), 120.43 (C-6), 141.93 (C-5), 205.08 (C-20).

EM-FAB (6eV) *m/z* [M+H]⁺: 445 pico base.

4.1.5. Síntesis de 3β-[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi]-20,20-dimetoxi-16α,17α-epoxipregn-5-en-21-ol (4 en ruta 1)



En un matraz de 500 mL se disolvieron, 1 g (2.25 mmol) del esteroide **3**, 1.2 g (3.72 mmol) de (diacetoxiyodo)benceno y 1 g de hidróxido de sodio (25 mmol), en 10 mL de diclorometano y 20 mL de metanol, la mezcla se dejó en agitación 18 h a temperatura ambiente, terminada la reacción, se evaporó el disolvente al vacío y el sólido obtenido se purificó por columna cromatográfica de gel de sílice utilizando hexano:acetato de etilo (9:1), finalmente se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 84%.

Fórmula molecular: C₂₉H₅₀O₅Si

Peso molecular (u.m.a.): 506.78

Punto de fusión (° C): 215-218

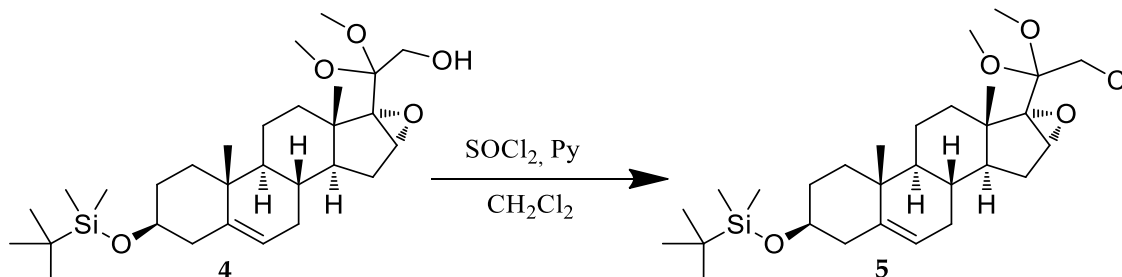
IR (cm⁻¹): 3297 (OH en C-21), 2936 (C-H de CH₂ y CH₃), 1666 (C=C en C-5), 1070 (C-O-C del epóxido en C-16), 1033 (C-O en C-20).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.05 (CH₃ del grupo protector), 0.88 (CH₃ del grupo protector), 1.01 (s, H-18, 3H), 1.25 (s, H-19, 3H), 3.26 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.29 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.69 (s, H-16, 1H), 3.44 (m, H-3, 1H), 5.30 (m, H-6, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: -4.75 (CH₃ del grupo protector), 15.30 (C-18), 19.66 (C-19), 26.08 (CH₃ del grupo protector), 49.51 (OCH₃ en C-20), 49.69 (OCH₃ en C-20), 58.60 (C-21), 62.78 (C-16), 69.78 (C-17), 72.50 (C-3), 101.99 (C-20), 120.74 (C-6), 141.86 (C-5).

EM-FAB (6eV) *m/z* [M+H]⁺: 507 pico base.

4.1.6. Síntesis de 3 β -{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-21-cloro-20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-eno (5 en ruta 1)



En un matraz de 100 mL se pesaron 0.5 g (0.98 mmol) del esteroide **4**, se adicionaron 4 mL de diclorometano seco (previamente se dejó en agitación con hidruro de calcio), 0.5 mL de piridina y 10 gotas de cloruro de tionilo recién destilado, todo en atmosfera de nitrógeno y en baño de hielo, luego la mezcla se dejó en agitación por 20 min a temperatura ambiente. Para detener la reacción se adicionaron 50 mL de cloroformo y se lavó dos veces con acido clorhídrico acuoso al 10%, después con una solución saturada de bicarbonato de sodio acuoso y finalmente con agua. La fase orgánica se seco con sulfato de sodio y el disolvente se evaporó al vacío, el producto crudo fue recrystalizado en metanol obteniendo un sólido blanco con un rendimiento del 80%.

Fórmula molecular: C₂₉H₄₉ClO₄Si

Peso molecular (u.m.a.): 525.23

Punto de fusión (° C): 150-155

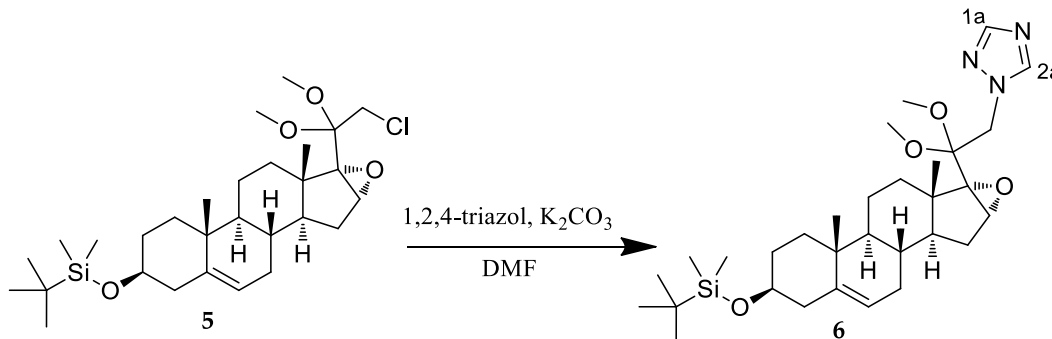
IR (cm⁻¹): 2930 (C-H de CH₂ y CH₃), 1668 (C=C en C-5), 1088 (C-O-C del epóxido en C-16), 1033 (C-O en C-20), 774 (C-Cl en C-21).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.06 (CH₃ del grupo protector), 0.89 (CH₃ del grupo protector), 1.00 (s, H-18, 3H), 1.02 (s, H-19, 3H), 3.25 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.30 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.46 (m, H-3, 1H), 3.68 (s, H-16, 1H), 3.95-4.09 (ABq, H-21, *J*= 14.5 Hz, 2H), 5.29 (d, H-6, *J*=5.3 Hz, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: -4.42 (CH₃ del grupo protector), 15.62 (C-18), 19.50 (C-19), 26.09 (CH₃ del grupo protector), 49.47 (OCH₃ en C-20), 49.51 (OCH₃ en C-20), 59.15 (C-21), 60.23 (C-16), 69.18 (C-17), 72.64 (C-3), 101.64 (C-20), 120.87 (C-6), 141.80 (C-5).

EM-FAB (6eV) *m/z* [M+H]⁺: 526 pico base.

4.1.7. Síntesis de 3 β -{*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-eno (**6** en ruta 1)



En un matraz bola de 25 mL se colocaron 0.5 g (0.95 mmol) del esteroide **5** con 0.035 mg (0.5 mmol) de 1,2,4-triazol y 0.131 mg (0.95 mmol) de carbonato de potasio (K_2CO_3), disueltos en 3 mL dimetilformamida (DMF), la mezcla se calentó a 90 °C bajo atmósfera de nitrógeno por 4 h. cumplido este tiempo la mezcla de reacción se adicionó lentamente sobre una mezcla agua-hielo-sal con agitación vigorosa, hasta formar un precipitado de color amarillo, se filtró y se purificó por columna cromatográfica con fluorisil, obteniendo un sólido de color blanco y con un rendimiento del 71%.

Fórmula molecular: $C_{31}H_{51}N_3O_4Si$

Peso molecular (u.m.a.): 557.84

Punto de fusión (° C): 188-190

UV (nm): 204.85 (Triazol en C-21).

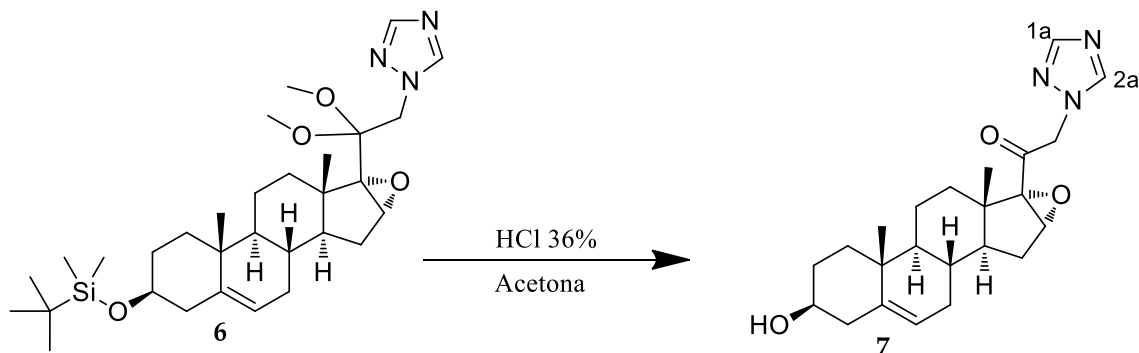
IR (cm⁻¹): 2929 (C-H de CH₂ y CH₃), 1616 (C=C en C-5), 1086 (C-O-C del epóxido en C-16), 1058 (C-O en C-20), 1250 (C-N en C-21).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.05 (CH₃ del grupo protector), 0.88 (CH₃ del grupo protector), 1.00 (s, H-18, 3H), 1.24 (s, H-19, 3H), 3.24 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.29 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.50 (m, H-3, 1H), 3.68 (s, H-16, 1H), 3.69-3.87 (ABq, H-21, $J=17.6$ Hz, 2H), 5.31 (d, H-6, $J=5.3$ Hz, 1H), 7.47 (s, H-Het 1a, 1H), 7.64 (s, H-Het 2a, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: -4.43 (CH₃ del grupo protector), 15.61 (C-18), 19.47 (C-19), 26.08 (CH₃ del grupo protector), 49.77 (OCH₃ en C-20), 49.79 (OCH₃ en C-20), 59.06 (C-21), 60.26 (C-16), 69.18 (C-17), 72.64 (C-3), 101.64 (C-20), 121.08 (C-6), 121.60 (C-Het 2a), 141.44 (C-Het 1a), 142.25 (C-5).

EM-FAB (6eV) m/z [M+H]⁺: 558 pico base.

4.1.8. Síntesis de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-en-20-ona (7 en ruta 1)



En un matraz bola de 25 mL se disolvieron 0.5 g (0.89 mmol) del esteroide **6** en 1.5 mL de acetona con 2 gotas de HCl al 36% y se dejó agitar a temperatura ambiente por 1 h. Terminada la reacción el disolvente fue removido bajo presión reducida y el producto crudo fue recristalizado en metanol para obtener un producto sólido de color blanco, con un rendimiento del 77%.

Fórmula molecular: C₂₃H₃₁N₃O₃

Peso molecular (u.m.a.): 397.51

Punto de fusión (° C): 155-157

UV (nm): 205.03 (Triazol en C-21).

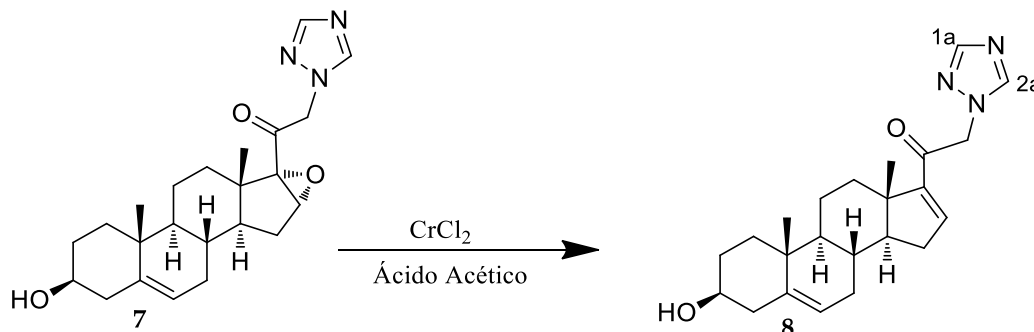
IR (cm⁻¹): 3346 (OH en C-3), 2928 (C-H de CH₂ y CH₃), 1724 (C=O en C-20), 1601 (C=C en C-5), 1090 (C-O-C del epóxido en C-16), 1051 (C-O de -OH en C-3), 1274 (C-N en C-21).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.91 (s, H-18, 3H), 1.22 (s, H-19, 3H), 3.24 (m, H-3, 1H), 3.51 (s, -OH, 1H), 3.68 (s, H-16, 1H), 4.04-4.22 (ABq, H-21, J = 17.6 Hz, 2H), 5.37 (d, H-6, J =5.2 Hz, 1H), 7.50 (s, H-Het 1a, 1H), 7.70 (s, H-Het 2a, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 15.32 (C-18), 19.56 (C-19), 62.62 (C-21), 65.80 (C-16), 71.74 (C-3), 121.04 (C-6), 121.20 (C-Het 2a), 131.20 (C-Het 1a), 141.24 (C-5).

EM-FAB (6eV) m/z [M+H]⁺: 398 pico base.

4.1.9. Síntesis de 3 β -hidroxi-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (8 en ruta 1, T7 en ruta 2)



En un matraz bola de 25 mL se disolvieron 0.5 g (1.25 mmol) del esteroide 7 y 0.4 g de cloruro de cromo II (3.25 mmol) en 20 mL de ácido acético, la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente por 30 min, después de este tiempo la mezcla de reacción se adicionó sobre 150 mL de agua con hielo, el precipitado se filtró y se lavó varias veces con agua fría. El producto crudo fue purificado en columna cromatográfica con fluorisil usando hexano-acetato de etilo (9:1) obteniendo un producto sólido de color blanco, con un rendimiento del 77%.

Este mismo compuesto se obtiene por la ruta 2, con un número menor de pasos de reacción.

Fórmula molecular: C₂₃H₃₁N₃O₂

Peso molecular (u.m.a.): 381.51

Punto de fusión (° C): 120-122

UV (nm): 205.03 (Triazol en C-21), 242.64 (Cetona α,β -insaturada en C-20).

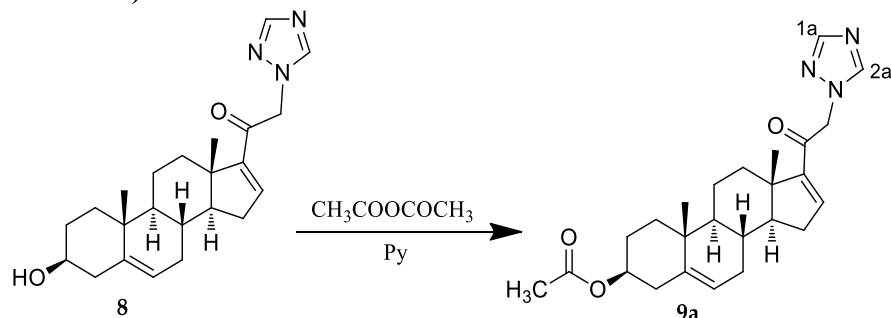
IR (cm⁻¹): **3355** (OH en C-3), **2927** (C-H de CH₂ y CH₃), **1709** (C=O en C-20), **1670** (C=C en C-5), **1051** (C-O de -OH en C-3), **1276** (C-N en C-21).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.90 (s, H-18, 3H), 1.20 (s, H-19, 3H), 3.25 (m, H-3, 1H), 3.52 (s, -OH, 1H), 4.05–4.23 (ABq, H-21, J = 17.6 Hz, 2H), 5.34 (d, H-6, J =5.2 Hz, 1H), 6.74 (s, H-16, 1H), 7.50 (s, H-Het 1a, 1H), 7.70 (s, H-Het 2a, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 15.32 (C-18), 20.01 (C-19), 62.15 (C-21), 71.78 (C-3), 121.04 (C-6), 141.43 (C-5), 141.38 (C-16), 141.47 (C-Het 1a), 144.83 (C-Het 2a), 151.61 (C-17), 196.66 (C-20).

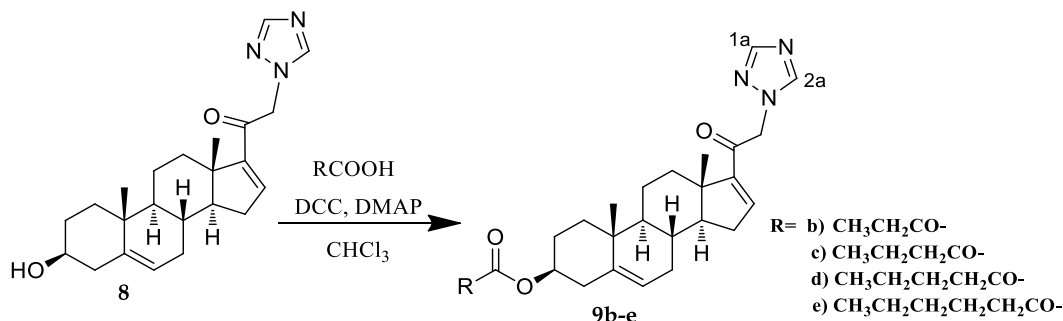
EM-FAB (6eV) m/z [M+H]⁺: 382 pico base.

4.1.10. Síntesis de acetato de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (9a en ruta 1)



En un matraz bola de 25 mL se disolvieron 0.1 g (2.62 mmol) del esteroide 8 en 0.4 mL de piridina y 0.4 mL de anhídrido acético, se dejó agitar a temperatura ambiente por 1 h en atmósfera de nitrógeno. Después una solución de agua sal fue adicionada y el precipitado se filtró y lavó varias veces (3x100 mL) con agua fría, hasta obtener un sólido de color blanco hueso con un rendimiento del 90 %.

4.1.11. Síntesis de los derivados esterificados de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (9b-e en ruta 1)

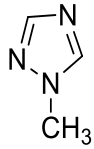


En un matraz bola de 50 mL se disolvieron 0.1 g (2.62 mmol) del esteroide 8, DCC 0.110 g (0.524 mmol) y DMAP 0.064 g (0.524 mmol) en 3 mL de cloroformo con el correspondiente ácido (0.6 mmol), la mezcla resultante se dejó en agitación a temperatura ambiente por 3 h culminada la reacción se adicionaron 150 mL de acetato de etilo para precipitar la diciclohexilurea (DCU), se dejó reposar toda la noche en el refrigerador y posteriormente se filtró. La fase orgánica se lavó tres veces con una solución de HCl (10 %), después con una solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua

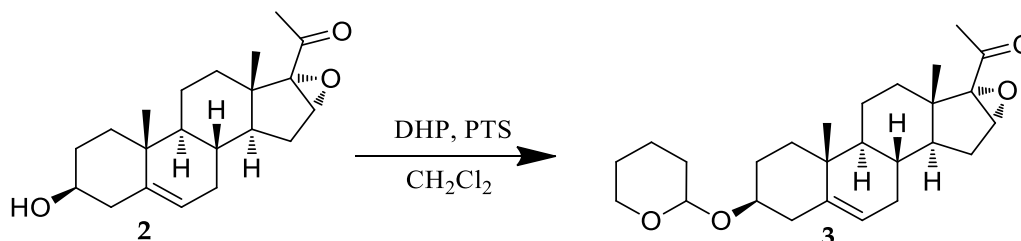
destilada, se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente en un rotaevaporador. El éster crudo fue recrystalizado en cloroformo- metanol (1:1) obteniendo un sólido de color blanco amarillento

Tabla 4.2. Propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas (9b-e en ruta 1)

Propiedades físicas	Valor /Aspecto				
	a	b	c	d	e
Fórmula molecular	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₃	C ₂₆ H ₃₅ N ₃ O ₃	C ₂₇ H ₂₇ N ₃ O ₃	C ₂₈ H ₃₉ N ₃ O ₃	C ₂₉ H ₄₁ N ₃ O ₃
Peso molecular (u.m.a)	423.54	437.57	451.60	465.62	479.65
Punto de fusión (°C)	119-121	185-187	201-205	195-197	197-199
Rendimiento	90%	85%	80%	78%	73%
Aspecto físico	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso
Propiedades espectroscópicas y espectrométricas					
UV (nm)					
Asignación	a	b	c	d	e
Triazol en C-21	206.90	207.71	206.48	205.36	205.81
Cetona α,β -insaturada en C-20	243.32	237.00	241.34	240.01	243.98
IR (cm⁻¹)					
CH de -CH ₃ y CH ₂	2927	2927	2927	2927	2927
C=O ester en C-3	1731	1728	1732	1731	1725
C=O de cetona α,β -insaturada	1624	1624	1624	1625	1625
C=C olefina	1570	1571	1575	1570	1571
C-N en C-21	1270	1270	1270	1275	1270
C-O de éster	1087	1087	1087	1087	1087
RMN ¹H (ppm)					
H-18	1.15 (s, 3H)	0.90 (s, 3H)	1.03 (s, 3H)	1.03 (s, 3H)	1.23 (s, 3H)
H-19	1.30 (s, 3H)	1.30 (s, 3H)	1.20 (s, 3H)	1.20 (s, 3H)	1.30 (s, 3H)
H-3	3.25 (m, 1H)	3.25 (m, 1H)	3.25 (m, 1H)	3.25 (m, 1H)	3.25 (m, 1H)

Asignación	a	b	c	d	e
CH ₃ del éster	2.03 (s, 3H)	1.03 (t, 3H)	0.9 (t, 3H)	0.98 (t, 3H)	1.0 (t, 3H)
H-21	4.05–4.23 (ABq, 2H, <i>J</i> = 17.6 Hz)	4.05–4.23 (ABq, 2H, <i>J</i> = 17.6 Hz)	4.05–4.23 ABq, 2H, <i>J</i> = 17.6 Hz)	4.05–4.23 (ABq, 2H, <i>J</i> = 17.6 Hz)	4.05–4.23 (ABq, 2H, <i>J</i> = 17.6 Hz)
H-6	5.34 (d, 1H, <i>J</i> =5.2 Hz)	5.34 (d, 1H, <i>J</i> =5.2 Hz)	5.34 (d, 1H, <i>J</i> =5.2 Hz)	5.34 (d, 1H, <i>J</i> =5.2 Hz)	5.33 (d, 1H, <i>J</i> =5.2 Hz)
H-16	6.74 (s, 1H)	6.74 (s, 1H)	6.74 (s, 1H)	6.74 (s, 1H)	6.74 (s, 1H)
1a	8.01 (s, 1H)	8.02 (s, 1H)	7.70 (s, 1H)	7.50 (s, 1H)	7.50 (s, 1H)
2a	8.30 (s, 1H)	8.30 (s, 1H)	8.01 (s, 1H)	7.82 (s, 1H)	7.80 (s, 1H)
RMN ¹³C (ppm)					
C-18	15.30	10.3	12.32	10.31	12.30
C-19	19.40	12.03	15.21	15.4	15.4
C-21	65.50	66.30	67.01	67.31	67.30
C-3	73.61	73.61	73.61	73.59	73.62
C-6	121.97	121.97	121.97	121.97	121.97
C-5	141.24	141.24	142.2	142.25	142.3
C-16	129.62	129.62	129.62	129.60	129.62
C-17	156.57	156.57	156.57	156.56	156.57
C-20	201.02	201.02	201.02	200.02	200.02
1a	140.02	140.05	140.02	140.02	140.02
2a	148.32	148.32	148.32	148.32	148.32
C=O éster	173.46	173.48	173.48	173.46	173.46
EM-FAB (<i>m/z</i>)					
[M+H] ⁺ pico base	424	438	452	466	480
pérdida de RCOOH	364	364	364	364	364
[M+H] ⁺ -83, pérdida de	341	355	369	383	397
					

4.1.12. Síntesis de 3β-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)-16α,17α-epoxipregn-5-en-20-ona (3 en ruta 2)



En un matraz bola de 500 mL se disolvieron 1 g (2.42 mmol) del esteroide 2 y 0.1 mg (0.058 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico monohidrato en 30 mL de 3,4-dihidro-2*H*-piran y 40 mL de diclorometano, se dejó agitar a temperatura ambiente por 2 h, culminada la reacción, se removió el disolvente usando rotaevaporador y el producto obtenido se recrystalizó en metanol, obteniéndose un sólido de color blanco, con rendimiento del 71 %.

Fórmula molecular: C₂₆H₃₈O₄

Peso molecular (u.m.a.): 414.57

Punto de fusión (° C): 114-116

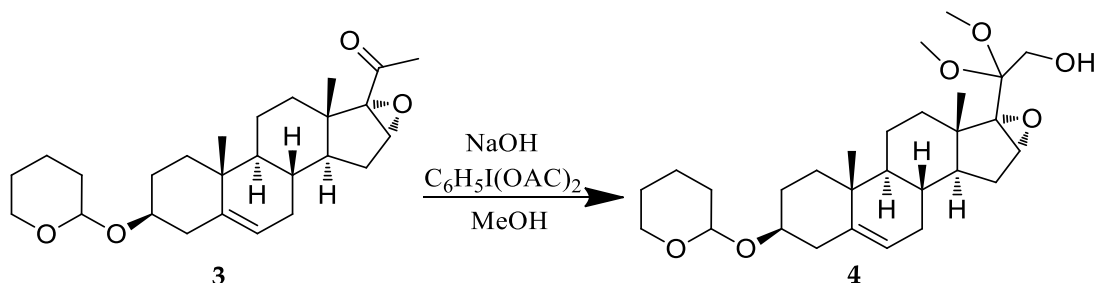
IR (cm⁻¹): 2935 (C-H de CH₂ y CH₃), 1703 (C=O de C-20), 1667 (C=C en C-5), 1075 (C-O-C del epóxido en C-16), 1024 (C-O-C en C-3).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.00 (s, H-18, 3H), 1.02 (s, H-19, 3H), 2.01 (s, H-21, 1H), 3.47 (m, H-3, 1H), 4.69 (t, CH de grupo protector, 1H), 5.31 (d, H-6, *J*=5.3 Hz, 1H), 3.66 (s, H-16, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 15.37 (C-18), 19.28 (C-19), 27.65 (C-21), 62.96 (C-16), 75.99 (C-17), 76.06 (C-3), 97.04 (CH de grupo protector), 120.92 (C-6), 141.38 (C-5), 205.06 (C-20).

EM-FAB (6eV) *m/z* [M+H]⁺: 415 pico base.

4.1.13. Síntesis de 20,20-dimetoxi-3 β -(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-21-ol (4 en ruta 2)



En un matraz de 500 mL se disolvieron, 1 g (2.11 mmol) del esteroide **3**, 1.2 g (3.72 mmol) de (diacetoxiyodo)benceno y 1 g de hidróxido de sodio (25 mmol), en 10 mL de dicloronetano y 21 mL de metanol, la mezcla se dejó en agitación 3 h a temperatura ambiente, terminada la reacción se evaporó el disolvente al vacío y el sólido obtenido se purificó por columna cromatográfica de gel de sílice utilizando hexano:acetona (95:5), finalmente se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 65%.

Fórmula molecular: C₂₈H₄₄O₆

Peso molecular (u.m.a.): 476.64

Punto de fusión (° C): 139-141

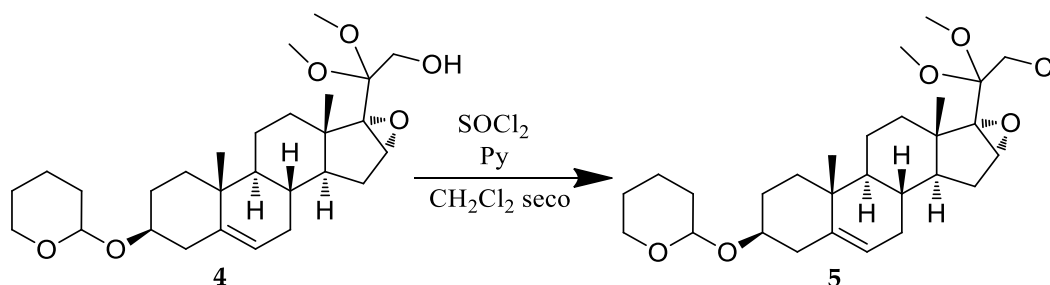
IR (cm⁻¹): 3504 (OH en C-21), 2937 (C-H de CH₂ y CH₃), 1669 (C=C en C-5), 1083 (C-O-C del epóxido en C-16), 1030 (C-O-C en C-3).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.00 (s, H-18, 3H), 1.24 (s, H-19, 3H), 3.25 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.28 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.43 (m, H-3, 1H), 3.48 (d, H-21, *J*=3.1 Hz, 2H), 4.69 (t, CH de grupo protector, 1H), 5.32 (d, H-6, *J*=5.3 Hz, 1H), 3.67 (s, H-16, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 15.27 (C-18), 19.41 (C-19), 50.45 (OCH₃ en C-20), 50.41(OCH₃ en C-20), 53.02 (C-21), 62.69 (C-16), 76.02 (C-17), 76.08 (C-3), 97.13 (CH de grupo protector), 101.95 (C-20), 121.22 (C-6), 141.29 (C-5), 205.06 (C-20).

EM-FAB (6eV) *m/z* [M+H]⁺: 477 pico base.

4.1.14. Síntesis de 21-cloro-20,20-dimetoxi-3 β -(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-5-eno (5 en ruta 2)



En un matraz de 25 mL se pesaron 500 mg (1.01 mmol) del esteroide 4 y se dejaron secar en la estufa por 1 h, se disolvieron en 4 mL de diclorometano seco (se dejó en agitación con hidruro de calcio), la mezcla se colocó en baño de hielo y se adicionaron 0.5 mL de piridina y 5 gotas de cloruro de tionilo (recién destilado), todo el procedimiento se realizó en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se dejó en agitación por 20 min a temperatura ambiente. Para terminar la reacción, se vertió la mezcla en 50 mL de cloroformo, el cual se retiró después por vacío, obteniéndose un producto de color amarillo, el cual fue recrystalizado en metanol hasta obtener un producto de color blanco amarillento y con un rendimiento del 80%.

Fórmula molecular: C₂₈H₄₃ClO₅

Peso molecular (u.m.a.): 495.09

Punto de fusión (° C): 101-103

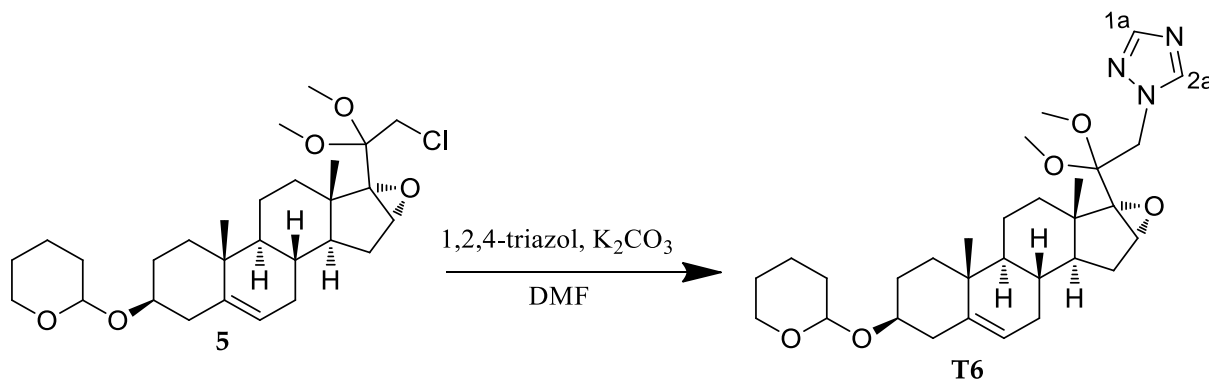
IR (cm⁻¹): 2932 (C-H de CH₂ y CH₃), 1670 (C=C en C-5), 1065 (C-O-C del epóxido en C-16), 1039 (C-O en C-20), 755 (C-Cl en C-21).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.01 (s, H-18, 3H), 1.23 (s, H-19, 3H), 3.25 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.28 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.43 (m, H-3, 1H), 4.03-4.18 (ABq, H-21, J =14.5 Hz, 2H), 5.32 (d, H-6, J =5.3 Hz, 1H), 3.67 (s, H-16, 1H), 4.69 (t, CH de grupo protector, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 15.26 (C-18), 19.50 (C-19), 50.45 (OCH₃ en C-20), 50.41 (OCH₃ en C-20), 59.51 (C-21), 68.30 (C-16), 76.02 (C-17), 76.08 (C-3), 101.95 (C-20), 121.22 (C-6), 141.29 (C-5).

EM-FAB (6eV) m/z [M+H]⁺: 496 pico base.

4.1.15. Síntesis de 20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-eno (T6 en ruta 2)



El procedimiento es el mismo reportado en la **Sección 3.1.7**. Se obtuvo un sólido de color blanco con un rendimiento de 73%.

Fórmula molecular: C₃₀H₄₅N₃O₅

Peso molecular (u.m.a.): 527.69

Punto de fusión (° C): 124-125

UV (nm): 205.20 (Triazol en C-21)

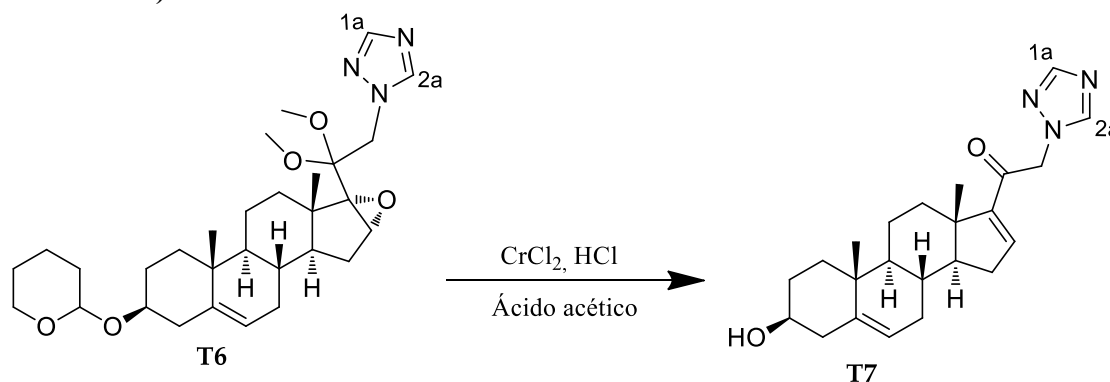
IR (cm⁻¹): 2934 (C-H de CH₂ y CH₃), 1666 (C=C en C-5), 1075 (C-O-C del epóxido en C-16), 1028 (C-O en C-20), 1275 (C-N en C-21).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.87 (s, H-18, 3H), 0.98 (s, H-19, 3H), 3.26 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.28 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.46 (m, H-3, 1H), 3.85-4.00 (ABq, H-21, J =17.6 Hz, 2H), 5.32 (d, H-6, J =5.3 Hz, 1H), 3.68 (s, H-16, 1H), 4.70 (t, CH de grupo protector, 1H), 7.90 (s, H-Het 1a, 1H), 8.27 (s, H-Het, 2a, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 15.20 (C-18), 19.43 (C-19), 49.66 (C-16), 58.52 (C-21), 50.45 (OCH₃ en C-20), 50.41 (OCH₃ en C-20), 76.04 (C-3), 101.93 (C-20), 121.16 (C-6), 121.23 (C-Het 2a), 141.31 (C-5), 141.48 (C-Het 1a).

EM-FAB (6eV) m/z [M+H]⁺: 528 pico base.

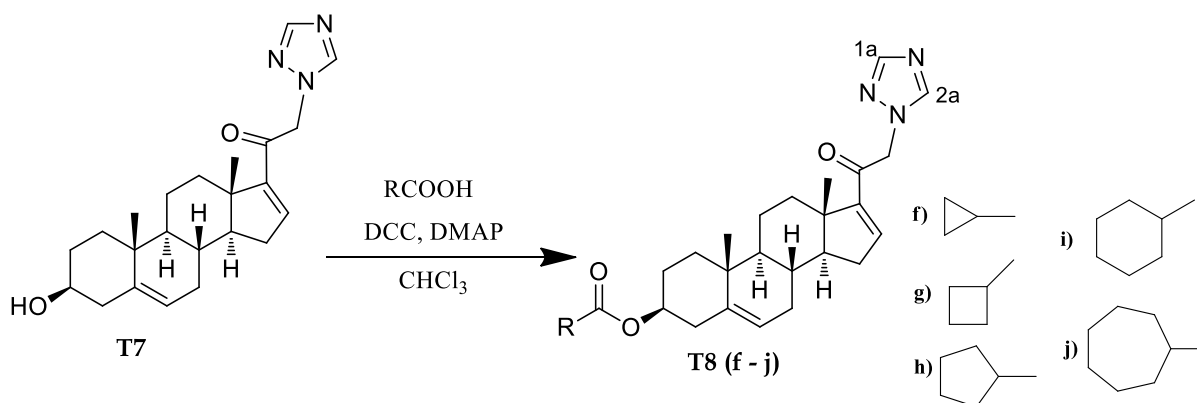
4.1.16. Síntesis de 3 β -hidroxi-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (T7 en ruta 2)



En un matraz bola de 25 mL se pesaron 0.1 g (0.19 mmol) del esteroide T-6, 0.08 g de cloruro de cromo II (0.65 mmol), 4 mL de ácido acético y dos gotas de HCl al 36 %, se dejó agitar a temperatura ambiente por 20 min, la mezcla de reacción fue vertida sobre 150 mL de agua con hielo, el precipitado obtenido se lavó varias veces con agua fría. Finalmente el producto obtenido se purificó por columna cromatografía de gel de sílice usando hexano: acetona (9:1), obteniendo un sólido de color blanco con un rendimiento del 77%.

Los datos de caracterización para el compuesto **T7** se encuentran en la **Sección 4.1.9**, ya que es el mismo compuesto obtenido por dos rutas diferentes.

4.1.17. Síntesis de los derivados esterificados de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3 β -ilo (T8f-j en ruta 2)

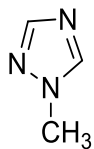


Se repitió el mismo procedimiento utilizado en la metodología descrita en la **Sección 4.1.11**.

Tabla 4.3. Propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas (T8f-j en ruta 2)

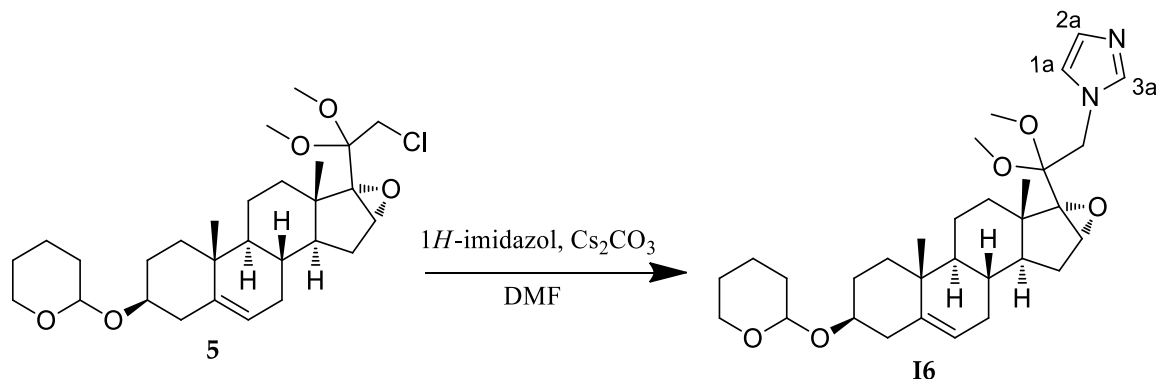
Propiedades físicas	Valor /Aspecto				
	f	g	h	i	j
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₃	C ₂₈ H ₃₇ N ₃ O ₃	C ₂₉ H ₂₉ N ₃ O ₃	C ₃₀ H ₄₁ N ₃ O ₃	C ₃₁ H ₄₃ N ₃ O ₃
Peso molecular (u.m.a)	449.58	463.61	477.63	491.66	505.69
Punto de fusión (°C)	131-134	136-138	118-120	95-98	122-124
Rendimiento	50%	56%	58%	55%	51%
Aspecto físico	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso
Propiedades espectroscópicas y espectrométricas					
UV (nm)					
Triazol en C-21	204.19	204.60	204.27	204.50	204.51
Cetona α,β -insaturada en C-20	238.90	239.14	239.66	239.65	239.00
Asignación	f	g	h	i	j
IR (cm⁻¹)					
CH de -CH ₃ y CH ₂	2928	2930	2928	2930	2927
C=O ester en C-3	1722	1723	1724	1724	1726
C=O de cetona α,β -insaturada	1625	1625	1625	1683	1625
C=C olefina	1575	1575	1574	1585	1578
C-N en C-21	1270	1270	1270	1275	1270
C-O de éster	1088	1087	1087	1076	1087
RMN ¹H (ppm)					
H-18	0.90 (s, 3H)	0.98 (s, 3H)	0.96 (s, 3H)	0.96 (s, 3H)	0.90 (s, 3H)
H-19	1.30 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)	1.20 (s, 3H)	1.30 (s, 3H)	1.30 (s, 3H)
H-3	3.45 (m, 1H)	3.45 (m, 1H)	3.48 (m, 1H)	3.78 (m, 1H)	3.43(m, 1H)
CH ₃ del éster	1.83 (m, 1H)	2.30 (m, 1H)	2.30 (m, 1H)	2.30 (m, 1H)	3.30 (m, 1H)
H-21	4.82–5.00 (ABq, 2H, J=17.6 Hz)	4.84–5.02 (ABq, 2H, J=17.6 Hz)	4.86–5.04 (ABq, 2H, J=17.6 Hz)	4.86–5.04 (ABq, 2H, J=17.6 Hz)	4.86–5.04 (ABq, 2H, J=17.6 Hz)

Asignación	f	g	h	i	j
H-6	5.35 (d, 1H, $J=5.3$ Hz)	5.35 (d, 1H, $J=5.3$ Hz)	5.35 (d, 1H, $J=5.9$ Hz)	5.35 (d, 1H, $J=5.9$ Hz)	5.35 (d, 1H, $J=5.8$ Hz)
H-16	6.74 (s, 1H)	6.74 (s, 1H)	6.74 (s, 1H)	6.74 (s, 1H)	6.74 (s, 1H)
1a	7.70 (s, 1H)	7.80 (s, 1H)	7.70 (s, 1H)	7.70 (s, 1H)	7.70 (s, 1H)
2a	8.01 (s, 1H)	8.20 (s, 1H)	8.01 (s, 1H)	8.01 (s, 1H)	7.98 (s, 1H)
RMN ^{13}C (ppm)					
C-18	14.01	12.18	15.0	15.80	15.87
C-19	15.31	15.86	19.25	19.25	19.31
CH del éster	13.6	30.10	30.10	30.10	30.11
C-21	63.2	65.5	65.10	65.50	65.50
C-3	73.55	73.55	74.45	73.52	72.05
C-6	121.03	121.93	121.92	121.92	121.07
C-5	141.52	141.53	141.23	141.50	141.50
C-16	121.10	121.96	---	140.1	140.3
C-17	157.13	157.21	157.29	---	157.36
C-20	190.89	190.92	190.96	199.37	191.05
1a	144.04	143.98	144.0	143.92	143.94
2a	152.15	152.15	152.17	152.20	152.20
C=O éster	174.44	174.96	176.37	175.57	176.58
EM-FAB (m/z)					
[M+H] ⁺ pico base	450	464	478	492	506
pérdida de RCOOH	364	364	364	364	364
[M+H] ⁺ -83, pérdida de	367	381	395	409	523


CN1C=NC=N1

A continuación se describe la síntesis y caracterización de los compuestos intermediarios y finales que contienen un grupo imidazol en el carbono 21, todos estos compuestos fueron obtenidos por la ruta 2.

4.1.18. Síntesis de 20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)-21-(1*H*-imidazol-1-il)pregn-5-eno (I6 en ruta 2)



El procedimiento es el mismo reportado en la **Sección 3.1.7.** usando 0.04 g (0.61mmol) de 1*H*-imidazol y 0.40 g (1.21 mmol) de carbonato de cesio.

Se obtuvo un sólido de color blanco con un rendimiento de 78%.

Fórmula molecular: C₃₁H₄₆N₂O₅

Peso molecular (u.m.a.): 526.70

Punto de fusión (° C): 90-92

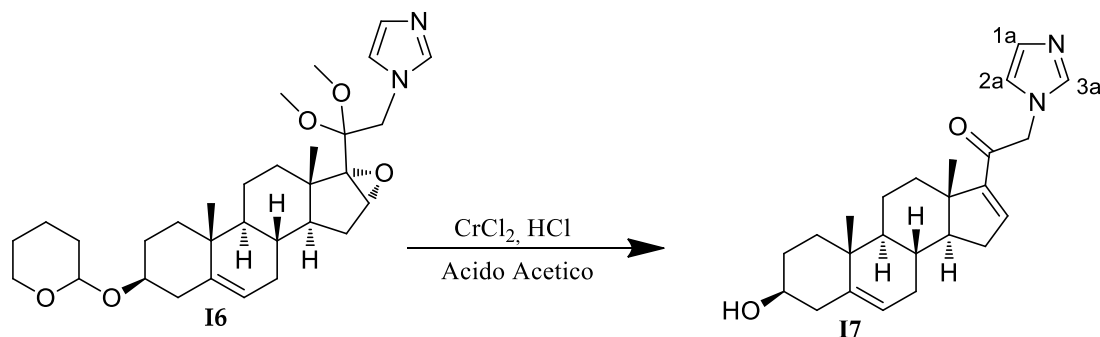
UV (nm): 205.20 (Imidazol en C-21).

IR (cm⁻¹): 2935 (C-H de CH₂ y CH₃), 1667 (C=C en C-5), 1075 (C-O-C del epóxido en C-16), 1028 (C-O en C-20), 1285 (C-N en C-21).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.00 (s, H-18, 3H), 1.28 (s, H-19, 3H), 3.23 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.28 (s, OCH₃ en C-20, 3H), 3.44 (m, H-3, 1H), 3.90–4.07 (ABq, H-21, *J*=16.8 Hz, 2H), 5.35 (d, H-6, *J*=5.4 Hz, 1H), 3.67 (s, H-16, 1H), 4.71 (t, CH de grupo protector, 1H), 7.12 (s, H-Het, 2a, 1H), 7.71 (s, H-Het 1a, 1H), 8.09 (s, H-Het 3a, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 15.30 (C-18), 19.90 (C-19), 50.01 (C-16), 55.55 (C-21), 50.45 (OCH₃ en C-20), 50.41 (OCH₃ en C-20), 76.10 (C-3), 97.09 (CH de grupo protector), 101.97 (C-20), 121.23 (C-6), 141.29 (C-Het 2a), 141.31 (C-5), 144.89 (C-Het 1a), 151.55 (C-Het 3a).

EM-FAB (6eV) *m/z* [M+H]⁺: 525 pico base.

4.1.19. Síntesis de 3 β -hidroxi-21-(1*H*-imidazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (I7 ruta 2)


El procedimiento es el mismo reportado en la **Sección 4.1.16**. Obteniendo un producto sólido de color blanco, con un rendimiento del 73%.

Fórmula molecular: C₂₄H₃₂N₂O₂

Peso molecular (u.m.a.): 380.52

Punto de fusión (° C): 179-181

UV (nm): 205.05 (Imidazol en C-21), 238.94 (Cetona α,β -insaturada en C-20).

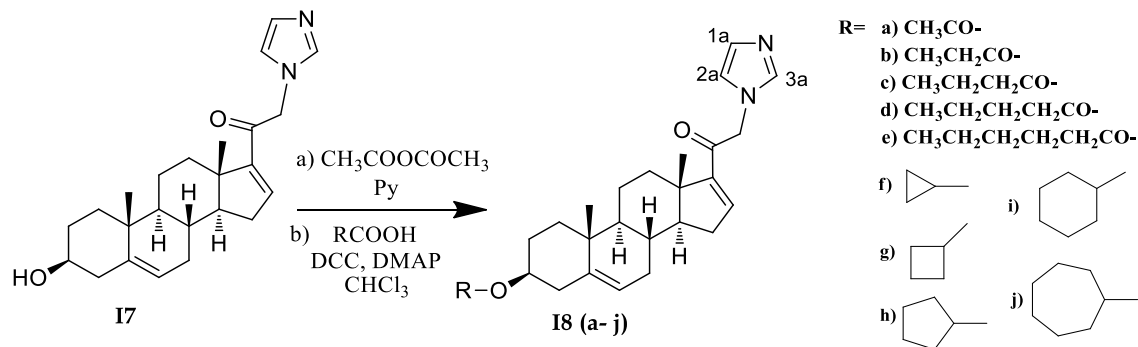
IR (cm⁻¹): 3439 (OH en C-3), 2930 (C-H de CH₂ y CH₃), 1707 (C=O en C-20), 1668 (C=C en C-5), 1051 (C-O de OH en C-3), 1277 (C-N en C-21).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.95 (s, H-18, 3H), 1.30 (s, H-19, 3H), 3.52 (m, H-3, 1H), 3.66 (s, OH, 1H), 4.05–4.22 (ABq, H-21, J = 16.8 Hz, 2H), 5.32 (d, H-6, J =5.2 Hz, 1H), 6.74 (s, H-16, 1H), 7.04 (s, H-Het 2a, 1H), 7.35 (s, H-Het 1a, 1H), 7.78 (s, H-Het, 3a, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 15.30 (C-18), 19.90 (C-19), 61.30 (C-21), 71.69 (C-3), 121.01 (C-6), 141.21 (C-6), 141.24 (C-Het 2a), 144.30 (C-16), 144.89 (C-Het 1a), 151.55 (C-Het 3a), 206.09 (C-20).

EM-FAB (6eV) m/z [M+H]⁺: 381 pico base.

4.1.20. Síntesis de los derivados esterificados de 20-oxo-21-(1*H*-imidazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (**18a-j** en ruta 2)



Se repitió el mismo procedimiento utilizado en la metodología descrita en la **Sección 3.1.10**, para la obtención del derivado **18a** y la descrita en la **Sección 3.1.11**, para los demás derivados.

Tabla 4.4. Propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas (**18a–8e** en ruta 2)

Propiedades físicas	Valor /Aspecto				
	a	b	c	d	e
Fórmula molecular	C ₂₆ H ₃₄ N ₂ O ₃	C ₂₇ H ₃₆ N ₂ O ₃	C ₂₈ H ₃₈ N ₂ O ₃	C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₃	C ₃₀ H ₄₂ N ₂ O ₃
Peso molecular (u.m.a)	422.55	436.58	450.61	464.63	478.66
Punto de fusión (°C)	105-108	180-182	184-187	172-175	169-11
Rendimiento	90%	68%	60%	55%	53%
Aspecto físico	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso
Propiedades espectroscópicas y espectrométricas					
UV (nm)					
Asignación	a	b	c	d	e
Imidazol en C-21	205.20	204.64	204.91	205.08	204.43
Cetona α,β-insaturada en C-20	239.50	240.01	239.87	243.09	239.32

Asignación	a	b	c	d	e
IR (cm⁻¹)					
CH de -CH ₃ y CH ₂	2937	2927	2929	2929	2931
C=O ester en C-3	1729	1731	1729	1729	1730
C=O de cetona α,β-insaturada	1688	1623	1624	1625	1625
C=C olefina	1593	1568	1574	1574	1575
C-N en C-21	1236	1270	1270	1270	1270
C-O de éster	1031	1087	1088	1087	1087
RMN ¹H (ppm)					
H-18	1.10 (s, 3H)	0.90 (s, 3H)	1.10 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)	0.90 (s, 3H)
H-19	1.30 (s, 3H)	1.20 (s, 3H)	1.30 (s, 3H)	1.29 (s, 3H)	1.02 (s, 3H)
H-3	3.90 (m, 1H)	3.90 (m, 1H)	3.90 (m, 1H)	3.90 (m, 1H)	3.90 (m, 1H)
CH ₃ del éster	2.03 (m, 1H)	1.10 (m, 1H)	1.00 (m, 1H)	0.90 (m, 1H)	0.67 (m, 1H)
H-21	4.63–4.80 (ABq, 2H, <i>J</i> <i>J</i> =16.8 Hz)	4.63–4.80 (ABq, 2H, <i>J</i> =16.8 Hz)	4.63–4.80 (ABq, 2H, <i>J</i> =16.8 Hz)	4.63–4.80 (ABq, 2H, <i>J</i> =16.8 Hz)	4.63–4.80 (ABq, 2H, <i>J</i> =16.8 Hz)
Asignación	a	b	c	d	e
H-6	5.35 (d, 1H, <i>J</i> =5.2 Hz)	5.35 (d, 1H, <i>J</i> =5.2 Hz)	5.35 (d, 1H, <i>J</i> =5.2 Hz)	5.35 (d, 1H, <i>J</i> =5.2 Hz)	5.36 (d, 1H, <i>J</i> =5.2 Hz)
H-16	6.73 (s, 1H)	6.73 (s, 1H)	6.73 (s, 1H)	6.73 (s, 1H)	6.73 (s, 1H)
1a	7.32 (s, 1H)	7.32 (s, 1H)	7.32 (s, 1H)	7.32 (s, 1H)	7.32 (s, 1H)
2a	7.04 (s, 1H)	7.04 (s, 1H)	7.04 (s, 1H)	7.04 (s, 1H)	7.04 (s, 1H)
3a	7.69 (s, 1H)	7.69 (s, 1H)	7.69 (s, 1H)	7.69 (s, 1H)	7.69 (s, 1H)
RMN ¹³C (ppm)					
C-18	15.40	15.30	15.01	15.30	15.30
C-19	20.30	21.30	23.40	24.50	22.13
CH del éster	21.0	11.30	12.30	12.01	11.36
C-21	65.60	65.35	65.30	63.40	62.31
C-3	74.07	71.54	71.54	71.54	71.54
C-6	121.96	121.01	121.01	121.01	121.01
C-5	140.10	141.21	141.21	141.21	141.21
C-16	147.20	147.80	148.44	148.45	148.19
C-17	156.00	157.09	157.12	155.12	155.71

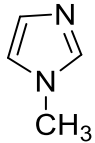
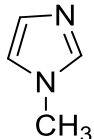
Asignación	a	b	c	d	e
C-20	199.27	206.09	206.09	206.09	206.08
1a	144.21	144.21	144.89	144.89	144.89
2a	140.03	141.30	141.26	141.22	141.22
3a	152.04	151.55	151.55	151.55	151.55
C=O éster	170.67	196.64	196.64	196.64	196.64
EM-FAB (<i>m/z</i>)					
[M+H] ⁺ pico base	423	437	451	465	479
pérdida de RCOOH	363	363	363	363	363
[M+H] ⁺ -82, pérdida de	341	355	369	397	341
					

Tabla 4.5. Propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas (I8f-j en ruta 2)

Propiedades físicas	Valor /Aspecto				
	f	g	h	i	j
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₃₆ N ₂ O ₃	C ₂₉ H ₃₈ N ₂ O ₃	C ₃₀ H ₄₀ N ₂ O ₃	C ₃₁ H ₄₂ N ₂ O ₃	C ₃₂ H ₄₄ N ₂ O ₃
Peso molecular (u.m.a)	448.59	462.62	476.65	490.67	504.70
Punto de fusión (°C)	187-189	101-103	91-93	193-195	180-182
Rendimiento	55%	57%	45%	55%	53%
Aspecto físico	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso	Sólido blanco hueso
Propiedades espectroscópicas y espectrométricas					
UV (nm)					
Asignación	f	g	h	i	j
Imidazol en C-21	204.89	204.67	204.27	204.80	204.22
Cetona α,β -insaturada en C-20	240.01	240.05	239.66	240.02	240.05
IR (cm⁻¹)					
CH de -CH ₃ y CH ₂	2926	2928	2928	2929	2917
C=O ester en C-3	1726	1723	1724	1726	1725
C=O de cetona α,β -insaturada	1624	1624	1625	1624	1626
C=C olefina	1570	1572	1574	1591	1564
C-N en C-21	1270	1270	1270	1270	1260
C-O de éster	1086	1087	1087	1080	1115
RMN ¹H (ppm)					
H-18	1.25 (s, 3H)	0.80 (s, 3H)	1.10 (s, 3H)	1.24 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)
H-19	1.30 (s, 3H)	0.90 (s, 3H)	1.30 (s, 3H)	1.40 (s, 3H)	1.20 (s, 3H)
H-3	3.47 (m, 1H)	3.90 (m, 1H)	3.47 (m, 1H)	3.45 (m, 1H)	3.49 (m, 1H)
CH del éster	1.65 (m, 1H)	2.29 (m, 1H)	2.31 (m, 1H)	2.30 (m, 1H)	2.30 (m, 1H)
H-21	4.62-4.80 (ABq, 2H, J=16.8 Hz)	4.63-4.80 (ABq, 2H, J=16.8 Hz)	4.63-4.80 (ABq, 2H, J=16.8 Hz)	4.63-4.80 (ABq, 2H, J=16.8 Hz)	4.63-4.80 (ABq, 2H, J=16.8 Hz)

Asignación	f	g	h	i	j
H-6	5.35 (d, 1H, $J=5.2$ Hz)	5.35 (d, 1H, $J=5.2$ Hz)	5.35 (d, 1H, $J=5.2$ Hz)	5.35 (d, 1H, $J=5.2$ Hz)	5.35 (d, 1H, $J=5.2$ Hz)
H-16	6.72 (s, 1H)	6.73 (s, 1H)	6.73 (s, 1H)	6.73 (s, 1H)	6.75 (s, 1H)
1a	7.35 (s, 1H)	7.34 (s, 1H)	7.32 (s, 1H)	7.35 (s, 1H)	7.35 (s, 1H)
2a	7.11 (s, 1H)	7.04 (s, 1H)	7.04 (s, 1H)	7.10 (s, 1H)	7.10 (s, 1H)
3a	7.51 (s, 1H)	7.69 (s, 1H)	7.69 (s, 1H)	7.51 (s, 1H)	7.51 (s, 1H)
RMN ^{13}C (ppm)					
C-18	13.25	13.40	13.01	20.01	19.40
C-19	15.00	19.01	19.00	21.00	20.00
CH del éster	10.1	30.21	30.10	30.10	30.11
C-21	62.45	62.32	62.30	62.21	62.10
C-3	73.82	73.54	73.54	73.91	73.91
C-6	119.23	121.91	121.91	121.02	121.02
C-5	140.60	140.25	140.15	141.27	141.27
C-16	147.21	144.00	144.00	141.45	144.50
C-17	---	---	---	157.09	154.51
C-20	204.08	199.36	199.36	200.87	200.87
1a	147.22	128.83	128.83	144.89	144.52
2a	139.99	124.60	124.60	141.21	121.12
3a	157.00	156.99	156.99	154.41	157.09
C=O éster	174.44	175.09	175.09	170.66	170.66
EM-FAB (m/z)					
$[\text{M}+\text{H}]^+$ pico base	449	463	477	491	505
pérdida de RCOOH	363	363	363	363	363
$[\text{M}+\text{H}]^+ - 82$, pérdida de	367	381	395	409	423
					

4.2. Desarrollo parte biológica

4.2.1. Material biológico

- 75 hámsteres machos de la cepa *Syrian Golden* con peso promedio entre 200-250 g.
- Tejido de próstata humana conservado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ proporcionado por el Departamento de patología del Hospital General de la ciudad de México.

4.2.2. Equipos

- Ultracentrífuga marca Beckman modelo Optima L-70K.
- Centrifuga marca Beckman modelo Allegra 6R.
- Analizador de centelleo Packard modelo Tri-Carb 2100 TR.
- Placas cromatográficas de gel sílice 60 GF254 en soporte de aluminio (20x20 cm, Merck).
- Incubadora marca Julabo modelo SW22.

4.2.3. Sustancias

- Testosterona [^3H] ($\text{T}[\text{H}^3]$) actividad específica 85-105 Ci/mmol suministrado por NEM Life Science Products, Inc. (Boston, MA).
- Mibolerona [^3H] actividad específica 70-87 Ci/mmol suministrado por NEN Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA).
- Androstenediona [^3H] ($\Delta^4\text{A}$ [^3H]) actividad específica 24,9 Ci/mmol suministrado por NEN Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA).

4.2.4. Ensayo *in vitro* (inhibición de la enzima 5α -reductasa)

El ensayo para la determinación del porcentaje de inhibición de la enzima 5α -reductasa se dividió en 2 partes; La primera parte consistió en la extracción de la enzima 5α -reductasa y

la segunda en las pruebas para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de los compuestos evaluados.

4.2.4.1. Extracción y asilamiento de la enzima 5 α -reductasa (Tipo 1)

Dos ratas adultas (8 meses de edad), obtenidas en la Universidad Autónoma Metropolitana en Xochimilco, fueron pesadas y dejadas en abstinencia de comida toda la noche para disminuir los niveles de glucógeno antes de que se extirparan sus hígados para utilizarlos como fuente de la 5 α -R1. Los hígados (30 g) se cortaron y homogeneizaron en un volumen de la solución tampón A (20 mM de fosfato de sodio, 0.32 M de sacarosa, 0.1 mM ditiotritol, pH=6.5), este procedimiento se llevó a cabo a 4 °C según lo establecido por el protocolo.

Después, la suspensión del tejido homogeneizado fue centrifugada (13.200 rpm, 20 min, 0°C), el sobrenadante se filtró a través de un filtro de malla de nylon y se centrifugó nuevamente (10.000 rpm, 60 min, 4 °C); el pellet microsomal fue resuspendido en 5 volúmenes de la solución buffer A con un homogeneizador. Finalmente se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford.

La suspensión fue re-centrifugada (13.200 rpm, 20 min, 4 °C) y el pellet fue resuspendido en la solución buffer A para dar una concentración final de 20 mg de proteína/mL. El pellet microsomal se almacenó a -70 °C mientras se prepararon las muestras esteroidales para su posterior evaluación.

4.2.4.2. Extracción y aislamiento de la enzima 5 α -reductasa (Tipo 2)

La próstata de cadáver humano se cortó y homogeneizó utilizando una solución A (20 mM de fosfato de sodio, 0.32 M de sacarosa, 0.1 mM ditiotritol, pH=6.5). Este homogeneizado se centrifugó a 1500 rpm durante 20 minutos. El pellet formado se separó y se lavó 3 veces con el medio A, nuevamente se centrifugó a 4400 rpm durante 10 min. Finalmente el pellet se resuspendió en el medio A y se almacenó a -70 °C. Se determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford utilizando como referencia albumina sérica bovina.

Para hacer el análisis sobre la próstata de hámsteres se sacrificaron 50 machos con aproximadamente 72 horas de castración. Se separaron la próstata y las vesículas seminales. Se limpiaron los tejidos perfectamente de grasa y se pesaron por separado. Los tejidos se homogeneizaron con una mezcla que contenía: 20 mM de HCl-tris, 1.5 mM EDTA, 20 mM de molibdato de sodio y 10% de glicerol, con relación al peso del tejido (v/p 3:1). La

homogenización se centrifugó a 14000 rpm, durante 1 hora a 2 °C. Posteriormente se separó el precipitado, se suspendió en tres volúmenes del medio A en relación con el peso del tejido obtenido inicialmente y se determinó el contenido de proteínas tanto en la fracción microsomal como en la citosólica, por el método de Bradford, y fue usada como fuente de la 5 α -R2

4.2.4.3. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de la enzima 5 α -reductasa

Para cada uno de los compuestos sintetizados, se prepararon una serie de tubos en los cuales se utilizaron 6 series de tubos de ensayo con concentraciones desde 10⁻¹ – 10⁻⁴ disueltos en metanol y conteniendo T [³H] a una concentración final de 2 nM, así mismo se incluyeron los tubos controles a los que se adicionó T [³H] a la misma concentración de 2 nM. Los tubos se colocaron en baño agua y atmósfera de nitrógeno hasta evaporar totalmente el disolvente; enseguida se añadió 720 μ L de búfer de fosfatos (40 mM), pH=6.5, 80 μ L de fracción microsomal (de hígado de rata para la 5 α -R1 y de próstata de cadáver humano para la 5 α -R2), que contenía 360 μ g/mL de proteína. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de DTT (1mM) y 100 μ L de NADPH (2mM) con los que se dio inicio a la reacción.

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

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

Los resultados obtenidos para este ensayo mostraron que la actividad de la T+Finasterida dio como IC_{50} de 63×10^{-9} M para la enzima extraída del hígado de las ratas (5α -R1) y para la enzima prostática humana un valor de 8.5×10^{-9} M (5α -R2).

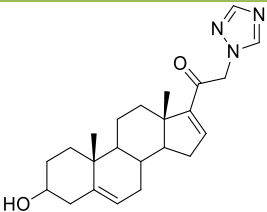
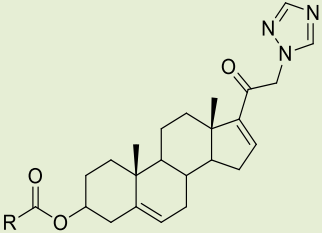





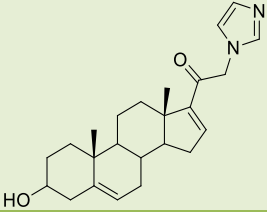
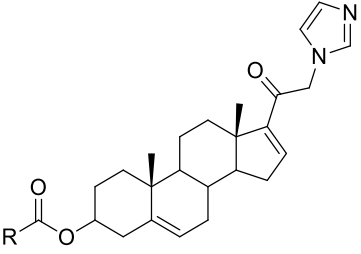





4.2.4.4. Determinación de la unión al receptor de andrógenos en próstata de rata

Con el fin de determinar la unión de los compuestos sintetizados frente al receptor de andrógenos las próstatas de 50 ratas adultas (8 meses de edad, 500 g de peso aprox.) fueron removidas, pesadas y empapadas de TEMD (40 mM de tris-HCl, 3 mM de EDTA y 20 nM de molibdato de sodio, 0.5 mM de ditioneitol, 10 % de glicerol, pH= 8) antes de su uso. Todos los procedimientos se realizaron a 0 °C.

Los tejidos se homogeneizaron en un volumen de solución buffer TEMD mas inhibidores de proteasas (2 mM PMSF, 10 μ g/mL antipaina, 5 mM leupeptina) en un baño de hielo con un homogeneizador. Los homogeneizados se centrifugaron (14.000 rpm, 60 min) y se obtuvo la fracción citosólica a partir del líquido sobrenadante de la próstata de las ratas. El homogenizado descrito anteriormente se almacenó a -70 °C y la proteína (6 mg de proteína en 200 μ L) fue determinada por el método de Bradford.

Este estudio se realizó a partir de la próstata de las ratas debido a que la glándula prostática es más grande que en los hámsteres y no se ha encontrado una diferencia entre el RA de rata y del hámster.

Tabla 4.6. Valores de IC_{50} para las isoenzimas 5α -R y el porcentaje de unión al receptor de andrógenos (I7a–I7e en ruta 2)

ESTRUCTURA	Compuesto	R	5α -R 1 IC_{50} [nM]	5α -R 2 IC_{50} [μ M]	Unión al RA (%)
T+Finasterida	-	-	630	0.0085	NA
	T7	-	NA	NA	NA
	T8a	-CH ₃	NA	100	NA
	T8b	-C ₂ H ₅	88	NA	NA
	T8c	-C ₃ H ₇	NA	NA	NA
	T8d	-C ₄ H ₉	320	NA	NA
	T8e	-C ₅ H ₁₁	100x10 ³	NA	NA
	T8f		NA	118	NA
	T8g		NA	NA	NA
	T8h		NA	NA	NA
	T8i		NA	NA	NA
	T8j		NA	98.4	NA
	I7	-	NA	118.8	NA
	I8a	-CH ₃	NA	122	NA
	I8b	-C ₂ H ₅	NA	NA	NA
	I8c	-C ₃ H ₇	NA	NA	NA
	I8d	-C ₄ H ₉	NA	NA	NA
	I8e	-C ₅ H ₁₁	NA	NA	NA
	I8f		NA	0.711	NA
	I8g		NA	0.0764	NA
	I8h		NA	0.035	NA
	I8i		NA	0.0293	NA
	I8j		NA	NA	NA

NA: No activo

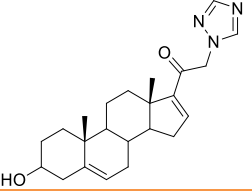
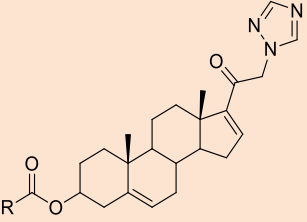





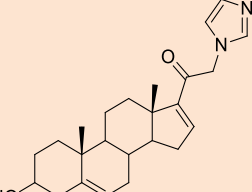
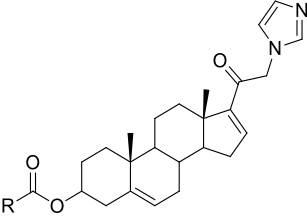





4.2.5. Ensayo *in vivo* (determinación de actividad antiandrogénica)

El efecto antiandrogénico se determinó empleando hámsteres de la cepa *Syrian Golden* (100-200g de peso) castrados, para esto se utilizaron 25 grupos de 3 animales por experimento, estos fueron gonadectomizados 30 días antes del experimento, manteniéndolos a una temperatura controlada de 22 °C y periodos de luz-oscuridad por 12 h, con suministro de agua y comida *ad libitum*. Posteriormente, se administraron subcutáneamente las muestras por 6 días como se explica a continuación:

- Grupo control 1: 200 μ L de aceite de sésamo (vehículo).
- Grupo control 2: 200 μ g de testosterona en 200 μ L de aceite de sésamo.
- Grupo control 3: 200 μ g de testosterona mas 200 μ g de Finasterida en 200 μ L de aceite de sésamo.
- Grupos experimentales (4-22): 200 μ g de testosterona en 200 μ L de aceite de sésamo mas 400 μ g de los compuestos **T7**, **T8a-j**, **I7**, **I8a-j**.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para el peso de la próstata, peso de las vesículas seminales y el diámetro de los nódulos pigmentados.

Tabla 4.7. Resultados de pruebas *in vivo*.

ESTRUCTURA	Compuesto	R	Diámetro de la mancha pigmentada (mm)	Peso de la próstata (mg)	Peso de las vesículas seminales (mg)
Control	-	-	2.03 ± 0.63	50.4 ± 9.9	96.11 ± 12.5
Testosterona	-	-	5.65 ± 1.12	98 ± 32.6	200.6 ± 55
T+Finasterida	-	-	3.57 ± 0.89	69.6 ± 21.2	161.4 ± 44.5
	T7	-	3.05 ± 1.53	89 ± 16	163.33 ± 41.36
	T8a	-CH ₃	2.9 ± 0.85	87.65 ± 21.78	216.075 ± 67.23
	T8b	-C ₂ H ₅	2.79 ± 1.42	89.55 ± 21.07	157.08 ± 32.61
	T8c	-C ₃ H ₇	2.71 ± 0.68	81.3 ± 57	138.9 ± 45
	T8d	-C ₄ H ₉	3.71 ± 0.98	82.30 ± 21.85	180.03 ± 39.47
	T8e	-C ₅ H ₁₁	2.8 ± 0.35	86.9 ± 19.5	200 ± 56.7
	T8f		2.88 ± 0.77	107.48 ± 22.8	180.03 ± 39.47
	T8g		2.14 ± 2.5	100 ± 40	130 ± 58
	T8h		2.8 ± 1.0	97 ± 30	120 ± 25
	T8i		3 ± 0.3	88 ± 10	150 ± 15
	T8j		4.45 ± 0.41	78.2 ± 18.55	203.98 ± 47.8
	I7	-	3.08 ± 0.21	111.08 ± 13.16	213.75 ± 16.05
	I8a	-CH ₃	3.06 ± 0.08	85.80 ± 19.41	200.50 ± 32.79
	I8b	-C ₂ H ₅	1.80 ± 0.38	88.40 ± 16.10	231.70 ± 25.08
	I8c	-C ₃ H ₇	1.98 ± 0.8	83.43 ± 8.46	217.45 ± 59.28
	I8d	-C ₄ H ₉	2.94 ± 0.99	80.93 ± 6.06	198.33 ± 22.20
	I8e	-C ₅ H ₁₁	3.36 ± 0.40	71.85 ± 6.06	198.33 ± 22.20
	I8f		3.4 ± 0.47	77.1 ± 17	160.9 ± 15.8
	I8g		3.0 ± 0.45	74.3 ± 18	145.2 ± 32.1
	I8h		4.0 ± 0.4	65.1 ± 15.8	143.7 ± 50.66
	I8i		2.4 ± 0.3	54.3 ± 4.9*	143.68 ± 50.7
	I8j		2.8 ± 0.5	78.8 ± 10.3	143.6 ± 29.89

4.2.6. Ensayo *in vitro*, citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas

Para analizar los compuestos **T7**, **T8a-f**, **I7** y **I8a-f** se utilizaron 3 líneas celulares cancerosas humanas:

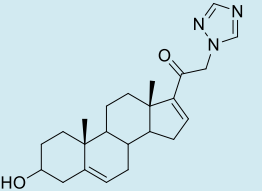
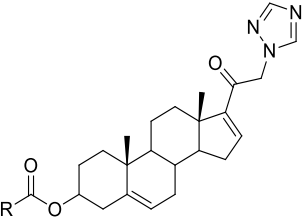





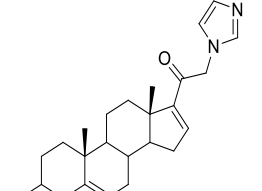
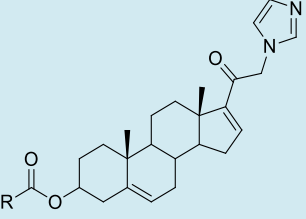





- PC-3: Próstata
- MCF7: Mama
- SK-LU-1: Pulmón

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

Posteriormente se tomó 100 µL de la línea celular correspondiente, el contenido de células por pozo varía entre 5000 y 10000 dependiendo de la línea celular, se incubó por 24 h. se preparó una solución stock en dimetilsulfóxido (DMSO) de cada compuesto a evaluar, dicha solución se adicionó a cada pozo de las líneas celulares en 100 µL de medio de cultivo siendo la concentración final de cada compuesto de 50 µM y se incubó por 48 h. (plato experimental). Adicionalmente se preparó otro pozo al cual se adicionó únicamente medio de cultivo este, último se incubó por 1 hora (plato basal); ambas incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa.

Finalizado el tiempo correspondiente se realizó la fijación de los cultivos celulares *in situ* por la adición de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v) frío, se incubó por 60 m. a 4°C, se desechó el sobrenadante y se hicieron 5 lavados con agua desionizada y se dejó secar por 24 h. Posteriormente se realizó el tñido adicionando 100 µL de sulforodamida B (SRB) (0.4% p/v en 1% ácido acético) a cada pozo, se incubó por 30 m. a temperatura ambiente, posteriormente se hicieron lavados con una solución de ácido acético al 1% y se dejó secar por 24 h. las células fijadas se resuspendieron utilizando 10 mM de buffer Tris, pH=10 en agitación por 5 min. Finalmente se determinó la densidad óptica a 515 nm utilizando un lector de ELISA.

Tabla 4.8. Porcentaje de inhibición de la proliferación sobre diferentes líneas celulares de cáncer

ESTRUCTURA	Compuesto	R	PC-3	MCF7	SK-LU-1
Ketoconazol	-	-	88.48 ± 3.9	95.16 ± 4.8	73.39 ± 1.6
16-DHP	-	-	21.4±11.5	25.5±1.2	12.8±3.5
	T7	-	61.3 ± 0.3	89 ± 16	88.9 ± 5.5
	T8a	-CH ₃	56.2 ± 1.3	59.4 ± 2.3	74.8 ± 1.5
	T8b	-C ₂ H ₅	NA	5.9 ± 2.2	8.8 ± 0.7
	T8c	-C ₃ H ₇	9.2 ± 1.6	25.6 ± 2.7	15.6 ± 1.8
	T8d	-C ₄ H ₉	38.2 ± 2.2	38.5 ± 0.9	20.2 ± 2.8
	T8e	-C ₅ H ₁₁	16.9 ± 1.8	14.4 ± 0.2	6.4 ± 1.7
	T8f		NA	NA	NA
	T8g		NA	NA	NA
	T8h		NA	NA	NA
	T8i		NA	NA	NA
	T8j		NA	NA	NA
	I7	-	96.2 ± 1.3	89.4 ± 2.3	74.8 ± 1.5
	I8a	-CH ₃	79.6 ± 8.7	77.9 ± 0.8	96.7 ± 1.3
	I8b	-C ₂ H ₅	22.6 ± 5.2	0	16.8 ± 1.0
	I8c	-C ₃ H ₇	0	0	25.2 ± 0.1
	I8d	-C ₄ H ₉	23.7 ± 2.9	51.3 ± 8.3	39.2 ± 8.2
	I8e	-C ₅ H ₁₁	17.2 ± 3.6	28.1 ± 4.9	28.5 ± 7.4
	I8f		ND	ND	ND
	I8g		ND	ND	ND
	I8h		ND	ND	ND
	I8i		ND	ND	ND
	I8j		ND	ND	ND

NA: No activo ND: no determinado

4.2.7. Determinación de la CI_{20} y la CI_{50} en líneas celulares de cáncer de los compuestos T8 e I7

Se determinó la CI_{50} de los dos compuestos cabeza de serie (T7, I7) sobre las tres líneas celulares utilizando el método de proliferación con el Kit XTT (Roche®). Las células PC-3 fueron incubadas en medio RPMI 1640, las MCF7 en DMEM-HG y las SK-LU-1 en DMEM-F12, todos los medio suplementados y sin rojo fenol. El efecto antiproliferativo de los compuestos fue evaluado a diferentes concentraciones. Para esto se cultivaron 1000 células por pozo, en placas de 96 pozos, cada muestra se realizó por sextuplicado. Después de 24 h. el medio de cultivo fue removido y se adicionaron los compuestos a diferentes concentraciones (1×10^{-10} - 1×10^{-4} M), se utilizó etanol (0.1 % v/v) como vehículo (V). Las células se dejaron incubar a 37 °C por 4 días (el plato control solo fue incubado por 4 h.) después de este tiempo se realizó la adición del XTT según lo recomendado por el fabricante y se realizó la lectura de los platos a 492 nm en un lector de microplatos. Cada uno de los experimentos se realizo por triplicado, los datos obtenidos fueron normalizados utilizando el vehículo como el 100% de proliferación. Los resultados fueron analizados utilizando el software para graficar Origin 5, usando un análisis de regresión no-lineal con una curva sigmoideal basado en la curva de dosis-respuesta. El análisis estadístico se llevo a cabo por medio del software Sigma Plot 12.0 utilizando un Análisis de Varianza con un solo factor (Anova) considerando las diferencias significativas con $*P \leq 0.01$ vs. V.

4.2.8. Determinación de la expresión génica del compuesto I7

Debido a que el compuesto I7 presentó mejores resultados de inhibición sobre las tres líneas celulares, se realizó un estudio sobre diferentes genes implicados en el proceso de la proliferación y la apoptosis celular, para determinar un posible mecanismo de acción.

Tabla 4.9. Genes estudiados relacionados con la proliferación y la apoptosis

Proliferación	Apoptosis
<ul style="list-style-type: none"> • Ciclina D1 (CCND1) • Ciclina E1 (CCNE1) • Ki-67 • Canal de potasio Éter-á-go-go (EAG1) 	<ul style="list-style-type: none"> • BIM • Survivina

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Las células de cáncer fueron cultivadas e incubadas en presencia de diferentes concentraciones del compuesto **I7** (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M) utilizando etanol como vehículo (V), en cajas de 25 cm² por 24 horas. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue aspirado y el RNA total fue extraído utilizando 500 µL del reactivo de Trizol, el cual fue colectado en tubos de 1.5 mL y centrifugado (13200 rpm, 4 °C, 20 min) con 200 µL de cloroformo, generando una fase acuosa que contenía el RNA y una fase orgánica, obtenida la fase acuosa se adicionaron 500 µL de isopropanol para precipitar el RNA, se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y al precipitado obtenido se le añadió 1 mL de etanol al 75 % y se dejó centrifugar, se desechó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar y finalmente se añadió 25 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para disolver el RNA. La cantidad y la pureza del RNA obtenido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro calibrado entre 260-280 nm de absorbancia.

Cuantificada la proteína se realizó la transcripción inversa (obtención del ADN complementario) usando 1 µg de ARN total y un sistema transcriptor RT (Roche®), el cual consistía en la transcriptasa reversa (RT) y el oligo-dT, utilizando un termociclador Perkin-Elmer 9600 programado de la siguiente manera: 65 °C por 10 min, 55 °C por 30 min y 85 °C por 5 min.

Obtenido el ADNc se realizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando el estuche comercial Light Cycler Taqman Master (Roche®) y un termociclador LightCycler® 2.0, el protocolo utilizado fue el siguiente: Taq ADN activación de polimerasa y desnaturalización inicial del ADNc a 95 °C por 10 min, 45 ciclos de amplificación, cada ciclo consistió en 10 s. a 95 °C, 30 s a 60 °C y 1 s. a 72 °C. Finalmente 10 s. de enfriamiento

Las expresiones génicas fueron normalizadas utilizando el gen β-actina como control interno, los iniciadores y las sondas para cada gen se fueron diseñados con Universal Probe Library Assay Design Center de Roche.

Tabla 4.10. Sondas y cebadores utilizados para la qPCR.

Gen	Sentido	Antisentido	No. de Sonda
CCND1/NM_053056.2	gaagatcgtegccactg	Gacctcctcctcgscettct	67
CCNE1/NM_001238.1	ggccaaaatgcagaggac	Gggtctgcacagactgcat	36
Ki-67/X65550.1	ggtgtgcagaaaatccaaaga	Actgtccctatgacttctggtg	73
EAG1/AF078741.1	cctggagggtgatccaagatg	ccaacacgtctcctttcc	49
BIM/ AY305716.1	gctgtggaggctgaatcc	tcggctgcttgtaattattc	63
Survivin/AB154416.1	gcccagtgtttctctgctt	aaccggacgaatgctttta	11
CYP24A1/NM_000782.3	catcatggccatcaaaaca	gcagctcgactggagtgc	88
β -actin/NM_001101.3	ccaaccgcgagaagatga	ccagaggcgtacagggatag	64
GAPDH/AF261085.1	agccacatcgctgagacac	gccaatacgaacaaatcc	60

Como trabajo complementario se decidió determinar si el compuesto **I7** presentaba interacción con el receptor de vitamina D (VDR), evaluando su capacidad para inducir el gen CYP24A1 el cual está directamente relacionado con este receptor.

Las células de PC-3 fueron utilizadas para realizar este ensayo, las cuales fueron incubadas a diferentes concentraciones del compuesto (1×10^{-9} – 1×10^{-6} M) y en presencia y ausencia de Calcitriol (1×10^{-8} M). Se utilizó el gen GAPDH como control interno.

Todos los resultados obtenidos fueron analizados en el programa Sigma Plot 12.0, determinando los resultados representativos ($P \leq 0.01$) basados en una curva dosis-respuesta determinada por un ANOVA de un solo factor.

4.2.9. Evaluación del compuesto I7 sobre los receptores de andrógeno y progesterona en células HeLa

Con la intención de determinar si el compuesto **I7** presenta una interacción con los receptores de andrógenos o progesterona, se realizó un estudio de transfección

sobre la línea celular HeLa (cáncer cérvico-uterino), la cual carece de receptores, facilitando la inducción de un vector (receptor) a la célula para su estudio.

Las células HeLa fueron sembradas un día antes de la transfección en platos de 6 pozos en medio DMEM-HG libre de rojo fenol suplementado con SFB al 5%, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin y se incubaron a 37 °C en atm 5 % CO₂. Al día siguiente las células fueron visualizadas al microscopio para verificar que la confluencia fuera de 30-50%. Las transfecciones se realizaron por triplicado usando el Kit de (QIAGEN®), 1.0 µg del vector de expresión pLEN-hPRB para el receptor de progesterona y pSVhAR.BHEXE para el receptor de andrógenos y 0.5 µg de PRE-E1b-CAT el cual funciona como plásmido reportero, este contiene un oligonucleótido con un elemento de respuesta y un adenovirus E1bTATA fusionado con el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). 24 h. después, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto **I7** solo o en combinación con progesterona o 5α-DHT, o sus respectivos antagonistas RU486 y Flutamida. Los platos fueron incubados por 24 h. utilizando etanol como vehículo (V). Finalmente la actividad CAT fue determinada usando 5 µg de proteína, 10 µg de butiril coenzima-A, 2x10⁵ cpm de extracto de xileno [³H]cloranfenicol en tris-HCl 0.25 M, pH=8.

El plásmido reportero y los vectores de expresión génica fueron amablemente donados por el Dr A.J. Cooney (Baylor College of Medicine).

4.3. Estudios Docking para los compuestos **T7** e **I7** sobre **RP**, **RA** y **RVD**

Con el fin de determinar las posibles interacciones moleculares entre los compuestos **T7** e **I7** y los receptores estudiados *in vitro* (RP, RA, RVD) se realizó un estudio de acoplamiento molecular. Teniendo en cuenta el origen estructural de estos compuestos, se utilizaron el receptor de progesterona (PR: NR3C3), el receptor de andrógenos (AR: NR3C4) y el receptor de vitamina D (VDR, NR1H1).

La estructura cristalina de rayos x de los tres receptores fueron obtenidos de la Data Bank Protein (DBP) con los siguientes códigos: 3D90 para PR, 1XQ3 para AR y 1S19 para VDR, cada uno cocrystalizado en su sitio activo con 13-β-etil-17-alfa-etinil-17β-hydroxygon-4-en-3-ona⁶³, (17β)-17-hidroxi-17-metilestra-4,9,11-trien-3-ona⁶⁴ y Cacipotriol⁶⁵, respectivamente.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Las optimizaciones de las geometrías de cada uno de los compuestos fueron realizadas por el método de mecánica molecular utilizando el campo de fuerza MMFF94x con el programa Spartan 10, filtrando los conformeros con menor energía de cada uno de los compuestos. Los sustituyentes de los ligandos fueron seleccionados utilizando MGL Tools 1.5.4 y el estudio de acoplamiento se realizó utilizando AutoDock 4.2 y Glide 5.7.⁶⁶⁻⁶⁷

Para realizar el docking usando Glide, los ligandos y sus receptores fueron preparados utilizando el programa computacional Maestro v9.8.⁶⁸

Se realizó una caja tridimensional de $70\text{\AA} \times 70\text{\AA} \times 70\text{\AA}$, espaciada con 0.375\AA , conteniendo en el centro el aminoácido GLN725 en PR, GLN711 en AR y SER278 en VDR, Los parámetros usados fueron: número de GA (25), población (150), energía de las evaluaciones (2,500,000) y un número máximo de individuos de evaluación (27,000). El mejor modelo de acoplamiento fue seleccionado basado en la menor energía de enlace.

Todas las figuras fueron preparadas con el programa PyMOL.⁶⁹

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1. Parte química

De acuerdo a las rutas sintéticas planteadas en este trabajo se utilizó como materia prima el 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (**1**), ya que es comercial, de costo accesible y además es tomado como punto de partida en muchas síntesis de compuestos esteroidales con aplicación en los tratamientos hormonales.

Gracias a estudios realizados previamente en nuestro grupo de investigación, se obtuvieron los datos de la caracterización de esta materia prima por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

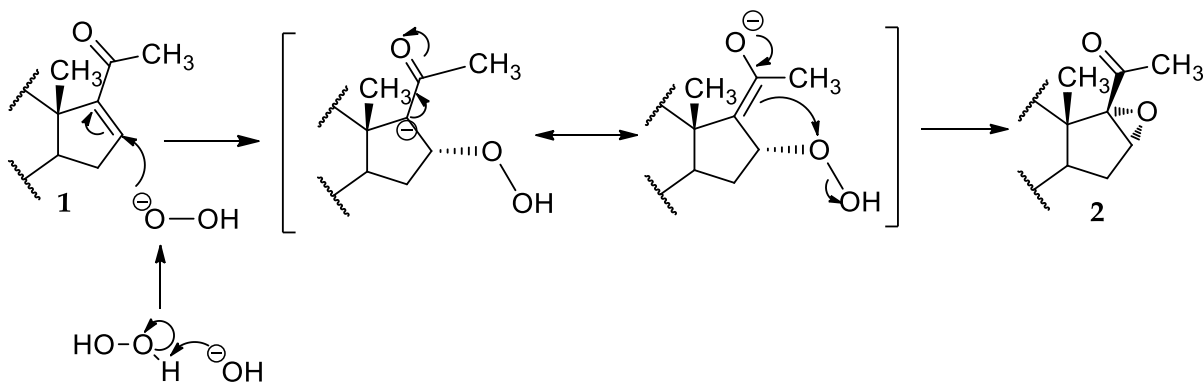
16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregna-16-en-20-ona (**2**)

El compuesto epoxidado se obtuvo empleando NaOH, metanol y peróxido de hidrogeno, se empleo esta reacción debido a su quimioselectividad, ya que a pesar de que el esteroide presenta dos enlaces dobles ambos presentan diferentes propiedades electrónicas. La estructura de este compuesto se confirmo de la siguiente manera:

La espectroscopia de IR presento dos bandas importantes, una ancha e intensa en 3343 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento de O-H en C-3 y otra banda a los 1045 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento de C-O-C del epóxido en C-16. En el espectro de RMN de ¹H se observaron tres señales simples correspondientes a los metilos en C-18 (1.00), C-19 (1.03) y C-21 (2.03), además una señal simple a 3.66 ppm correspondiente al protón que se encuentra en C-16, debido a que este protón se encuentra en un ángulo de 90° con respecto a sus vecinos, las señales no se desdoblan y se ve como un singulete confirmando la presencia del epóxido entre C-16 y C-17. Otra señal a 3.50 ppm confirmó la presencia del O-H en C-3. La espectroscopia de RMN de ¹³C exhibió las señales de C-16 (60.55) y C-17 (71.16) corroborando la presencia del epóxido, también se observó la señal del carbono unido al grupo OH en C-3 (71.75). Mediante el método de FAB se confirmó el ion molecular [M+H]⁺ a 331 *m/z*.

El mecanismo propuesto para la obtención del compuesto **2** consiste en la formación del anión hidroperóxido (HOO⁻), el cual realiza una adición 1,4 tipo Michael sobre la cetona α,β -insaturada, deslocalizando los electrones entre el oxígeno del carbonilo (enolato) y el carbono α (carbanión). Posteriormente, se lleva a cabo un ataque nucleofílico (S_N2) del enolato sobre el oxígeno del peróxido generando la formación del anillo de oxirano. Es importante destacar que el ataque nucleofílico se lleva a cabo por la

cara α del anillo D del esteroide, ya que la cara β se encuentra impedida estéricamente por el metilo angular de C-18, dando como producto mayoritario el epóxido α .



Esquema 5.1. Mecanismo de reacción para la epoxidación y obtención del compuesto 2.

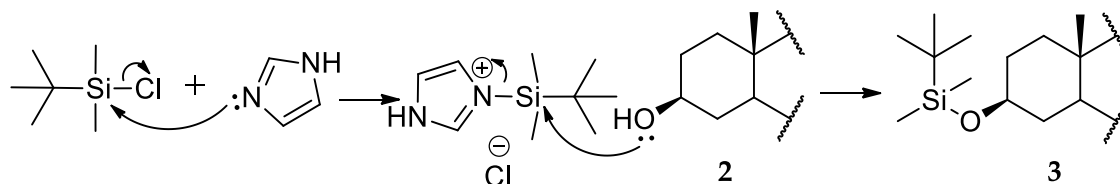
La obtención de los siguientes intermediarios y compuestos finales se realizó implementado la Ruta 1 (Esquema 4.2.).

3 β -{*tert*-butil(dimetil)silil}oxi}-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona (3 en ruta 1)

El compuesto **3** se obtuvo protegiendo el grupo hidroxilo en C-3 del compuesto **2** con cloruro de *tert*-butil(dimetil)sililo y usando como base imidazol (catalizador nucleofílico). En este mecanismo Corey⁷⁰ asumió que la reacción se lleva a cabo formando un agente reactivo (*N-tert*-butildimetilsilimidazol), mientras que el disolvente DMF actúa como catalizador de la reacción.⁷¹ La estructura de **3** se confirmó así:

En el espectro de IR se observó la desaparición de la banda correspondiente al alcohol en C-3. La espectroscopia de RMN de ¹H exhibió las señales correspondientes a los protones de los metilos del grupo protector (0.05 y 0.88 ppm), además los carbonos este grupo se observaron en el espectro de ¹³C a -4.33 y 26.08 ppm. La espectrometría de masas por el método de FAB comprobó la identidad de este compuesto al observarse su ion molecular [M+H]⁺ en 445 *m/z*.

El mecanismo propuesto para esta reacción es el siguiente:



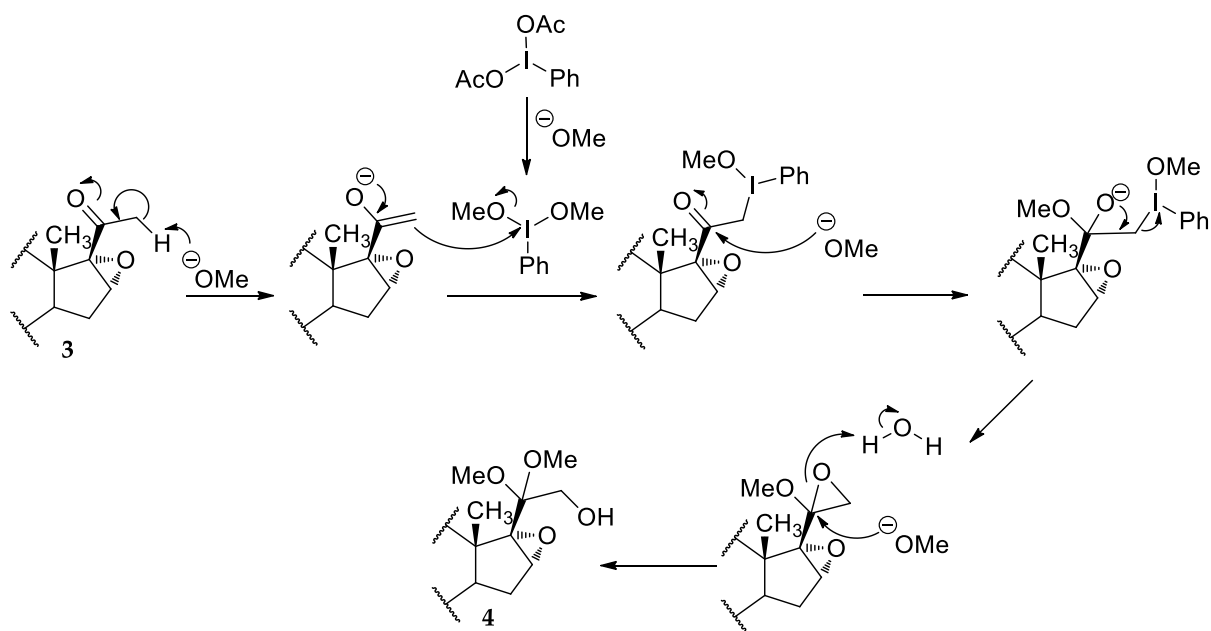
Esquema 5.2. Mecanismo de reacción para la protección en C-3 y obtención del compuesto 3.

3 β -{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-20,20-dimethoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-21-ol (4 en ruta 1)

La síntesis para la obtención del compuesto 4 se realizó mediante la oxidación en C-21 utilizando un derivado de yodo (III) hipervalente conocido como diacetoxiyodobenceno (DIB) como agente oxidante, hidróxido de sodio y metanol como disolvente. La obtención del compuesto 4 se comprobó:

Observado la ausencia de la banda correspondiente a la cetona en C-20 y la aparición de dos bandas a 3297 y 1033 cm^{-1} correspondientes los estiramientos del grupo O-H y C-O de un alcohol. En RMN de ^1H se observó la aparición de dos señales simples a 3.26 y 3.29 ppm correspondientes a los protones de los metoxilos del α -hidroxicetal en C-20. Además se observó una señal doble a 3.68 ppm ($J=3.6$ Hz, 2H) correspondiente a los protones en C-21. La espectroscopia de RMN ^{13}C confirmó la formación del cetal mediante la aparición de dos señales a 49.52 y 49.69 ppm correspondientes a los carbonos de los metoxilos en C-20, además se observó el desplazamiento de la señal de C-20 (205.08 ppm) de campo bajo a campo alto (101.99 ppm). Se observó el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ en 507 m/z .

El mecanismo de reacción propuesto empieza con la formación del enolato de la α,β -epoxicetona en C-20 debido a la basicidad del medio, seguido por un ataque nucleofílico ($\text{S}_{\text{N}}2$) sobre el yodo, debido a la fuerte electrofilia que posee este elemento. Posteriormente un grupo metoxilo ataca el carbonilo de C-20 generando un anión hemiacetal; seguido por un ataque nucleofílico ($\text{S}_{\text{N}}2$) del oxígeno cargado negativamente sobre el carbono electrofilico de C-21 formando un anillo de oxirano y el grupo yodobenceno (PhI) como grupo saliente. Finalmente, la apertura del anillo se lleva a cabo por el ataque nucleofílico ($\text{S}_{\text{N}}2$) de un grupo metoxilo al C-20 produciendo el α -hidroxicetal.⁷²



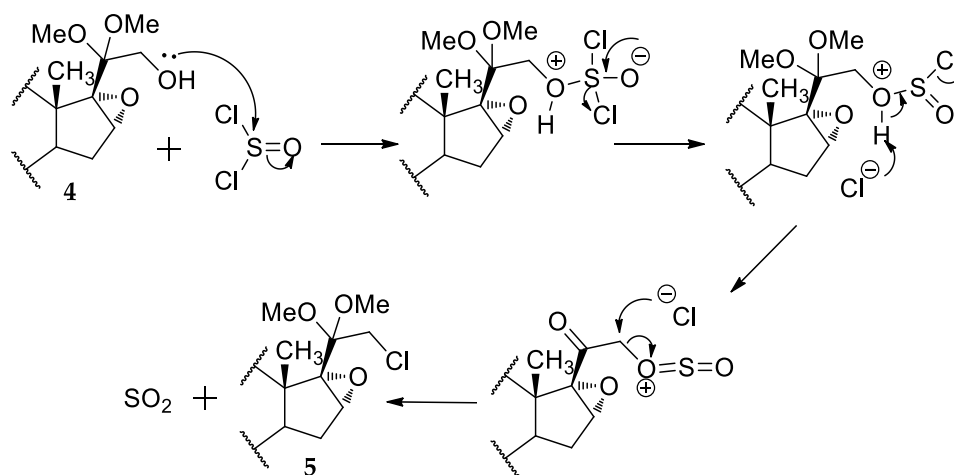
Esquema 5.3. Mecanismo de reacción para la oxidación en C-21 y obtención de 4.

3 β -{*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-21-cloro-20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-eno (5 en ruta 1)

El compuesto **5** se obtuvo mediante la cloración en C-21 utilizando cloruro de tionilo y piridina como base. La obtención del compuesto **5** se comprobó:

Observando la ausencia de la banda correspondiente al hidroxilo en C-21 y la aparición de una banda a 774 cm^{-1} correspondiente al grupo C-Cl. La espectroscopia de RMN ^1H mostro el desdoblamiento de las señales asignadas a los protones en C-21 como un sistema ABq que abarca de 3.95 a 4.09 ($J=14.5$ Hz) sugiriendo un acoplamiento geminal de dos protones no equivalentes (diasterotópicos) debido al cambio químico en el ambiente. Por medio de la RMN de ^{13}C se observó el desdoblamiento de la señal correspondiente a C-21 unido al cloro en 59.20 y 59.15 ppm. La espectrometría de masas confirmó la estructura del compuesto **5** al observarse el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ en 526 m/z .

En el mecanismo propuesto la reacción empieza cuando los electrones del oxígeno atacan al azufre del cloruro de tionilo generando el correspondiente clorosulfito de alquilo, un compuesto que posee un buen grupo saliente. El ataque nucleofílico ($\text{S}_{\text{N}}2$) de ion cloruro al C-21 origina el respectivo alquil cloruro. Esta reacción requiere de base suave como piridina en el medio para neutralizar el cloruro de hidrogeno generado:



Esquema 5.4. Mecanismo de reacción para la cloración en C-21 y obtención de 5.

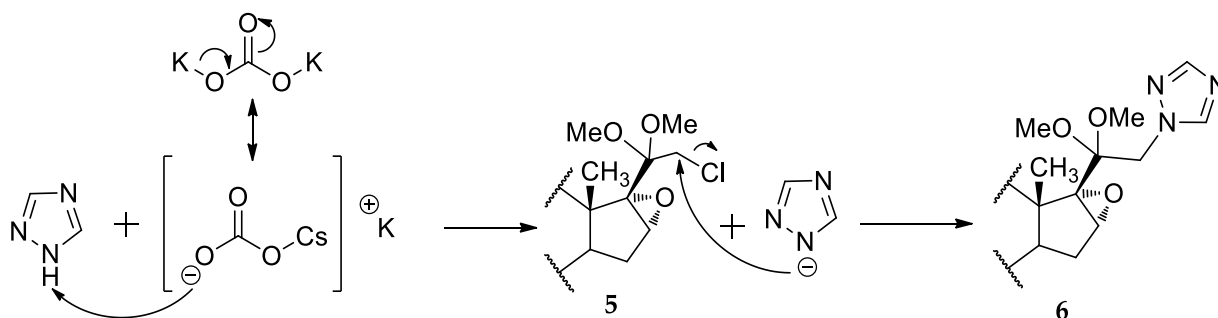
3 β -{*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-eno (6 en ruta 1)

La obtención del compuesto 6, se realizó utilizando 1,2,4-triazol, carbonato de cesio y DMF. La estructura fue corroborada de la siguiente manera:

Se observó una banda en el UV a 204.8 nm confirmando la presencia del triazol en C-21. En el espectro IR se observó la aparición de una banda a 1250 cm⁻¹ correspondiente al grupo C-N. La espectroscopia de RMN ¹H mostro dos nuevas señales simples a campo bajo (7.47 y 7.64 ppm) correspondientes los protones del triazol, también se observaron los protones de C-21 en 3.69-3.87 (ABq, H-21, *J* = 17.6 Hz, 2H), confirmando nuevamente que los protones en este carbono son de tipo diasterotópicos. En RMN de ¹³C se observaron dos señales a 141.44 y 121.60 ppm correspondientes a los carbonos del triazol.

La espectrometría de masas confirmó la estructura del compuesto 6 al observarse el ion molecular [M+H]⁺ en 558 *m/z*.

Este mecanismo de reacción involucra una reacción de tipo (S_N2):



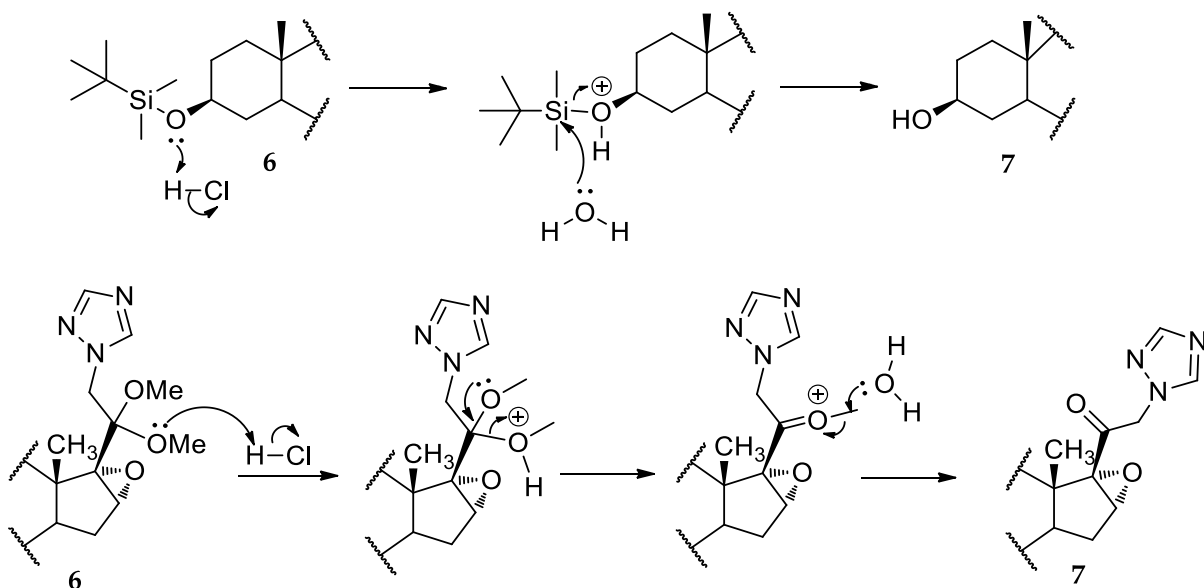
Esquema 5.5. Mecanismo de reacción para la adición del triazol en C-21 y obtención de 6.

16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregn-5-en-20-ona (7 en ruta 1)

La obtención del compuesto 7 se llevó a cabo por medio de una hidrólisis ácida con HCl concentrado a temperatura ambiente. La estructura de este compuesto se corroboró de la siguiente manera:

Mediante el espectro de UV se observó la banda correspondiente al triazol (205.0 nm). En el espectro de IR se observó una banda a 1274 cm^{-1} correspondiente al grupo C-N, también se observó la aparición de una banda ancha y fuerte a 3346 cm^{-1} confirmando la presencia del grupo O-H en C-3, además a 1724 cm^{-1} se encontró una banda muy intensa correspondiente a la regeneración de la cetona en C-20. En RMN de ^1H se observó la desaparición de las señales correspondientes al grupo protector y a los protones de los metoxilos en C-20; la aparición de una señal simple a 3.51 ppm (O-H) confirmó la desprotección exitosa en C-3. La espectroscopia de RMN ^{13}C confirmó regeneración del carbonilo en C-20 con el desplazamiento de esta señal de campo alto (101.64 ppm) a campo bajo (206.08 ppm). La espectrometría de masas confirmó el compuesto 7 con su ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ en 398 m/z .

El mecanismo propuesto para la obtención de 7 es el siguiente:



Esquema 5.6. Mecanismo de reacción para la desprotección en C-3 y eliminación del cetal en C-20 para la obtención del compuesto 7.

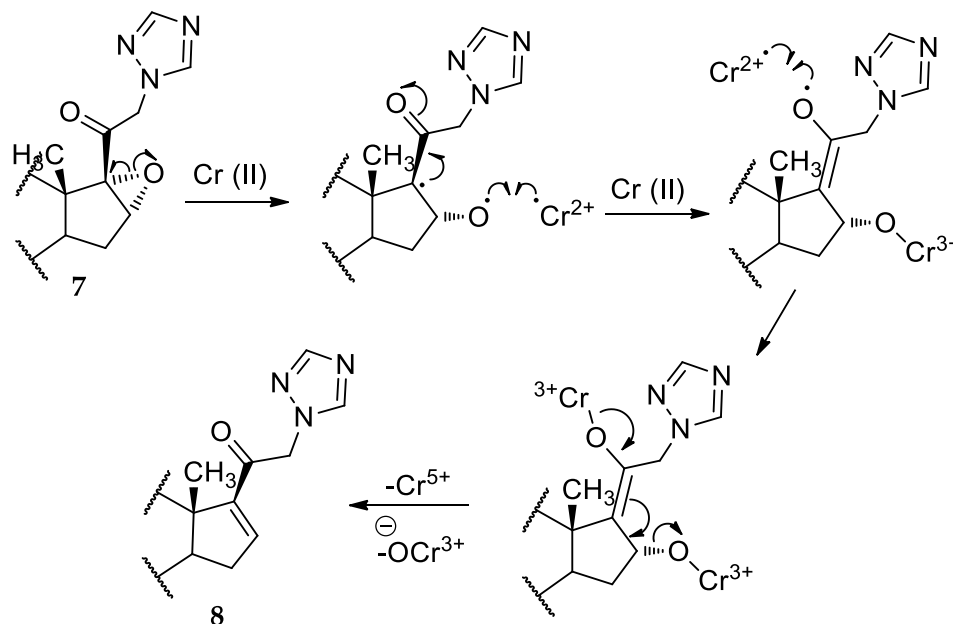
3 β -hidroxi-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (8 ruta 1, T7 ruta 2)

El primer compuesto final se obtuvo realizando la eliminación del epóxido en C-16 utilizando sales de cromo (CrCl_2 , $\text{Cr}(\text{AcO})_2$), las cuales son bastante útiles en la transformación de una β -epoxicetonas a cetonas α,β -insaturadas esteroideas, a través de la formación de una β -hidroxicetona (con estereoquímica α). Esta reacción fue publicada por Cole en 1954.⁷³

La obtención del compuesto T7 se corroboró mediante la aparición de una banda en el espectro de UV a 242.64 nm correspondiente a la regeneración de la cetona α,β -insaturada en C-20, además en el espectro de IR se observó una banda a 1709 cm^{-1} correspondiente al carbonilo conjugado en C-20. La espectroscopia de RMN ^1H mostró el desplazamiento de la señal del protón en C-16 de campo alto (3.68 ppm) a campo bajo (6.74 ppm), confirmando la formación del enlace vinílico. En el espectro de RMN ^{13}C se observó la ausencia de las señales correspondientes a los carbonos del epóxido (65.80 y 69.18 ppm) y la aparición de dos nuevas señales de carbonos vinílicos: C-17 (151.61 ppm) y C-16 (141.38 ppm). La espectrometría de masas confirmó la obtención del compuesto T7 con su ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ en 382 m/z .

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El mecanismo de reacción propuesto para la eliminación del epóxido fue propuesto por Kochi⁷¹ en 1968 vía radicales libres. Sin embargo el mecanismo propuesto para esta reacción es vía radicales libres de tipo organometálica.



Esquema 5.7. Mecanismo de eliminación del epóxido en C-16 y obtención de T8.

Para la obtención de los demás derivados esteroidales implementando la ruta 2, las reacciones son similares, sin embargo, los mecanismos para la protección del hidroxilo en C-3 y la eliminación del epóxido en C-16 son diferentes.

A continuación se presentan los resultados para los compuestos obtenidos por la ruta 2.

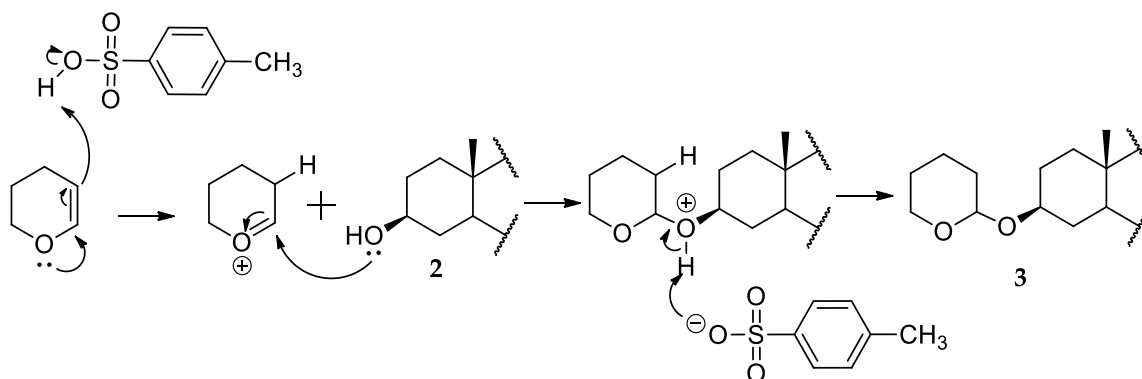
3 β -(Tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona (3 en ruta 2)

El compuesto **3** se obtuvo realizando una protección del hidroxilo en C-3 utilizando 3,4-dihidro-2H-pyran como grupo protector. La estructura del compuesto **3** se verificó de la siguiente manera:

En el espectro de IR se observó una banda a 1024 cm⁻¹ correspondiente al éter en C-3. En la espectroscopia de RMN ¹H la aparición una señal triple correspondiente al grupo CH del grupo protector en C-3 a 4.69 ppm y la pérdida de la señal simple a 3.50 ppm confirmó la protección del grupo hidroxilo en C-3. En RMN ¹³C se observó una señal 97.04

correspondiente al CH del grupo protector. Finalmente, la espectrometría de masas confirmó la obtención del compuesto **3**, ion molecular $[MH]^+$ a 415 m/z .

El mecanismo de reacción propuesto inicia con la protonación regioselectiva del doble enlace del anillo de dihidropirano generando un carbocatión que deslocaliza la carga positiva sobre el oxígeno del grupo protector, seguido del ataque nucleofílico por parte de los electrones del oxígeno del esteroide, esta reacción entre ambos finalmente conduce a la obtención del alcohol protegido y la regeneración del ácido catalizador (PTS).



Esquema 5.8. Mecanismo de protección en C-3 y obtención del compuesto **3** en ruta 2.

20,20-dimetoxi-3 β -(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-21-ol (4** en ruta 2)**

El compuesto **4** se obtuvo utilizando el mismo método descrito en la **sección 4.1.5.**, con la ventaja de que al cambiar el grupo protector, se mejoró la solubilidad del compuesto y por consiguiente la reacción se completó en menor tiempo. Este compuesto se caracterizó de la siguiente manera:

En el espectro de IR se observó una banda a 3504 cm^{-1} correspondiente al grupo OH en C-21 y la desaparición de la banda a 1703 cm^{-1} confirmando la formación del cetal en C-20. En RMN ^1H una señal triple a 4.69 ppm confirmó la presencia del grupo protector, dos señales en 3.25 y 3.28 ppm, correspondientes confirmaron la formación del cetal en C-20. En RMN de ^{13}C se observó una señal en 97.13 ppm correspondiente al CH del grupo protector. También se observaron las señales correspondientes a los metoxilos de los cetales en C-20 (3.25 y 3.28 ppm). La espectrometría de masas por el método del FAB confirmó la estructura de **4** con un ion molecular $[MH]^+$ a 477 m/z .

21-cloro-20,20-dimetoxi-3 β -(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-5-eno (5 en ruta 2)

El compuesto **5** se obtuvo implementando el mismo procedimiento descrito en la **sección 4.1.6**. La estructura de este compuesto se confirmó mediante la aparición de una banda en el espectro de IR a 755 cm^{-1} correspondiente al enlace Cl-C en C-21. En la espectroscopia de RMN ^1H se observó la señal triple del grupo protector (4.69 ppm) y las señales correspondiente a los metilos del cetil en C-20 (3.25 y 3.28 ppm). Además se observó el desdoblamiento de las señales asignadas a los protones en C-21 como un sistema ABq desde 3.89 hasta 4.18 ($J=14.5\text{ Hz}$). En RMN de ^{13}C se observó la señal correspondiente a C-21 en 59.51 ppm. La espectrometría de masas confirmó la estructura del compuesto **5** con su ion molecular $[\text{MH}]^+$ a 496 m/z .

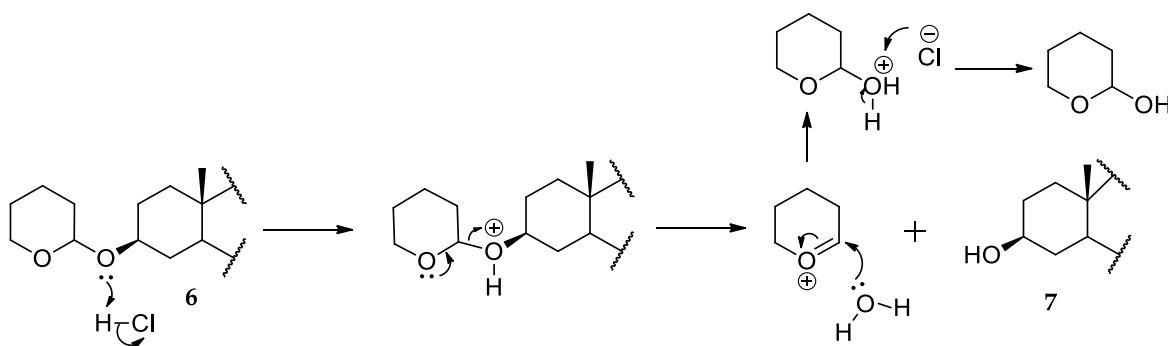
20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-eno (T6 en ruta 2)

El compuesto **T6** se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito en la **sección 4.1.9**. La obtención de este compuesto se confirmó observando una banda en el UV a 205.20 nm confirmando la adición del triazol en C-21. En el espectro de IR una banda a 1275 cm^{-1} correspondiente al grupo C-N confirmó la adición del triazol. En RMN de ^1H la aparición de dos señales simples a campo bajo (7.90 y 8.27 ppm) nuevamente confirmó la adición del triazol en C-21. En la espectroscopia de RMN ^{13}C se observó la aparición de dos señales a 141.48 y 121.23 ppm correspondientes a los carbonos del triazol en C21. La espectrometría de masas confirmó la estructura del compuesto **T6**, ion molecular $[\text{MH}]^+$ en 528 m/z .

3 β -hidroxi-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (T7 en ruta 2)

La obtención del **T7** compuesto se llevó a cabo realizando la desprotección, eliminación del epóxido y del cetil en C-20, las tres reacciones en un solo paso. La caracterización de este compuesto se encuentra previamente descrita.

El mecanismo de reacción propuesto para la desprotección en C-3 se muestra a continuación:



Esquema 5.9. Mecanismo de desprotección en C-3 y obtención del compuesto T7 en ruta 2.

20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)-21-(1*H*-imidazol-1-il)pregn-5-eno (**16** en ruta 2)

Los compuestos esteroidales con imidazol en C-21 se obtuvieron a partir del 21-cloro-20,20-dimetoxi-3 β -(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-5-eno (**5** en ruta 2), el primer derivado (**16**), el se obtuvo implementando el mismo procedimiento descrito en la **sección 3.1.7**. La caracterización de este compuesto se realizó de la siguiente manera: Se observó una banda en el espectro UV a 205.20 nm correspondiente al imidazol en C-21. La aparición de una banda a 1285 cm⁻¹ en el IR confirmó la presencia del grupo C-N del imidazol. La espectroscopia de RMN ¹H mostró la aparición de tres señales simples en 7.71, 7.12 y 8.09 ppm correspondientes a los tres protones del imidazol en C-21. De igual forma el espectro de RMN ¹³C presentó tres señales a 144.89, 141.29 y 151.55 ppm de los carbonos del imidazol. Finalmente la estructura del compuesto **16** se confirmó por medio de su ion molecular [MH]⁺ en 525 *m/z*.

3 β -hidroxi-21-(1*H*-imidazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (**17** ruta 2)

La obtención del primer compuesto derivado con imidazol se llevó de la misma forma que los derivados con triazol en C-21. La estructura del compuesto **17** se verificó al observar una banda en UV a 328.94 nm correspondiente a la cetona α,β -insaturada en C-20. La espectroscopia de IR confirmó la estructura por la aparición de tres bandas importantes, una banda a 3439 cm⁻¹ (OH), una banda a 1277 cm⁻¹ (C-N) y otra en 1707 cm⁻¹ (C=O). En RMN de ¹H se observó una señal simple a 3.66 ppm del hidroxilo en C-3, en 7.35, 7.04 y 7.78 ppm se observaron las señales correspondientes a los tres protones del imidazol en C-

ANÁLISIS DE RESULTADOS

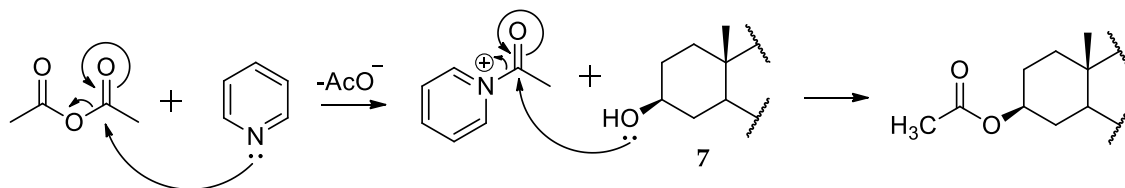
1, además se observó el desplazamiento de la señal del protón en C-16 de campo alto (3.68 ppm) a campo bajo (6.74 ppm) confirmando la eliminación del epóxido y posterior formación del doble enlace. En RMN ^{13}C se observaron las señales de los carbonos del imidazol a 144.89, 141.24 y 151.55 ppm, en 206.09 ppm se observó la señal del carbonilo en C-20. La espectrometría de masas por el método de FAB confirmó la estructura del compuesto **I7**, ion molecular $[\text{MH}]^+$ en 381 m/z .

Finalmente los derivados con triazol (**T8a-j**) e imidazol (**I8a-j**) en C-21 con diferentes esteres de tipo lineal o alicíclico se obtuvieron mediante la reacción de acetilación en C-3 (**T9a e I8a**) y una reacción de esterificación de Steglich.⁷⁵

La reacción de Steglich se llevo a cabo empleando DCC y DMAP como agente acoplante y catalizador, respectivamente. La obtención de los compuestos se determinó observando las señales más representativas de cada éster sintetizado:

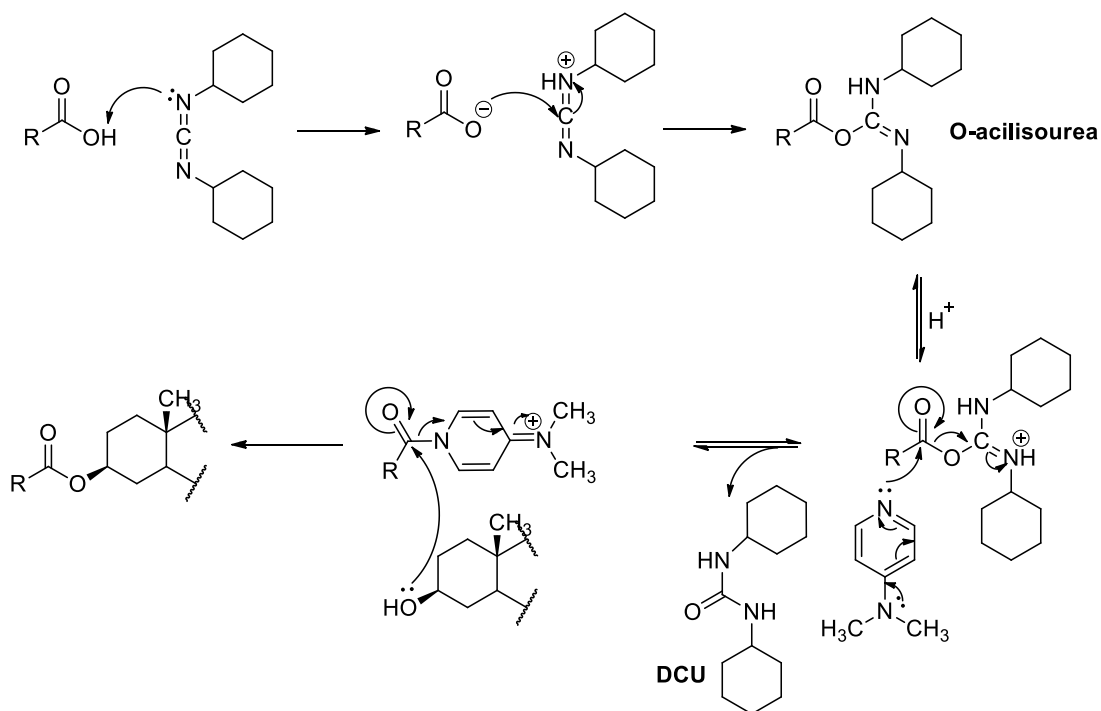
En UV se observaron las bandas características de los azoles en C-21 y una banda aproximada a 240.0 nm correspondiente a la cetona α,β -insaturada en C-20. La espectroscopia de IR mostro una banda a 1730 cm^{-1} aproximadamente, correspondiente al éster en C-3. En RMN de ^1H se observó la aparición de las señales correspondientes a los grupos CH_2 - y CH_3 - de los ésteres, de igual forma en RMN de ^{13}C se observó la señal característica del carbonilo correspondiente al éster en C-3 a 173.0 ppm aproximadamente. La espectrometría de masas se confirmó las estructuras de cada uno de los compuestos sintetizados por medio de sus iones moleculares $[\text{MH}]^+$ en el m/z correspondientes.

El mecanismo propuesto para la reacción de esterificación consiste en la activación del acido carboxílico a través de la conversión de una O-acilisourea, a partir de DCC, después la DMAP al ser más nucleofílica que el alcohol reacciona con esta O-acilisourea generando una amida reactiva, la cual es fuertemente electrofílica, debido a esto el alcohol realiza un ataque nucleofílico en el acilo dando como resultado la formación de un éster, se elimina el agente acoplante como DCU (diciclohexilurea) y la DMAP como grupo saliente.



Esquema 5.10. Mecanismo de acetilación en C-3.

El mecanismo propuesto para la obtención de los ésteres por el método de Steglich es el siguiente:



Esquema 5.11. Mecanismo de para la esterificación en C-3 por el método de Steglich.

5.2. Parte biológica

Se determinó la actividad *in vitro* de los compuestos sintetizados por medio de la determinación de la CI_{50} de las isoenzimas 5α -reductasa tipo 1 y 2 (Tabla 4.15).

Los resultados obtenidos mostraron que el compuesto **T8b** presentó una actividad inhibitoria 7 veces mejor sobre la enzima 5α -R1 que la Finasterida, siendo selectivo para esta enzima. De igual forma el compuesto **T8d** presentó una mejor inhibición (320 nm) sobre esta misma enzima. Los demás compuestos con triazol en C-21 no presentaron actividad representativa sobre ambas isoenzimas. Los compuestos con imidazol en C-21 no tuvieron ningún efecto sobre la enzima 5α -R1, sin embargo, los que contienen un éster alicíclico en C-3 (**I7f**, **I7g**, **I7h** e **I7i**) mostraron una clara tendencia a inhibir únicamente a la 5α -R2, aunque ningún compuesto logró mejorar la CI_{50} de la Finasterida sobre esta enzima. Ninguno de los compuestos evaluados presentó actividad sobre el receptor de andrógenos proveniente de próstata de rata.

Con el fin de determinar la actividad antiandrogénica de los compuestos finales se realizaron pruebas *in vivo* sobre hámsteres castrados de la cepa *Syrian Golden*. Estas pruebas se llevaron a cabo en el Instituto de pruebas biológicas en el Laboratorio de Hormonas del Departamento de Sistemas Biológicos en la Universidad Autónoma Metropolitana sede Xochimilco (UAM-Xochimilco). Se realizó la evaluación del diámetro de los nódulos pigmentado o manchas pigmentadas, las cuales permiten determinar la actividad androgénica de los derivados obtenidos, estos órganos flancos que se encuentran ubicados en la piel del dorso de los hámsteres, aumentan su tamaño al tratar al roedor castrado con testosterona ya que son andrógeno-dependientes. La 5α R1 se encuentra expresada en estos órganos.

Otro de los ensayos realizados fue la determinación del peso de las vesículas seminales y la próstata, en ambos órganos se encuentra más comúnmente expresada la 5α R2, pero en las vesículas es un 30% menor que en la próstata. Al igual que en los nódulos pigmentados, en las vesículas seminales y en la próstata el tamaño aumenta al administrar testosterona, pero se reduce notablemente al ser co-administrada con la Finasterida, el fármaco de preferencia en el mercado.

A continuación se muestran las gráficas de los resultados obtenidos en este ensayo (Tabla 4.16), en estos se observa que algunos de los compuestos logran reducir el tamaño de la próstata, las vesículas seminales y las manchas pigmentadas al ser co-administrados con testosterona, pero desafortunadamente ninguno logró reducir el peso o el diámetro como la Finasterida.

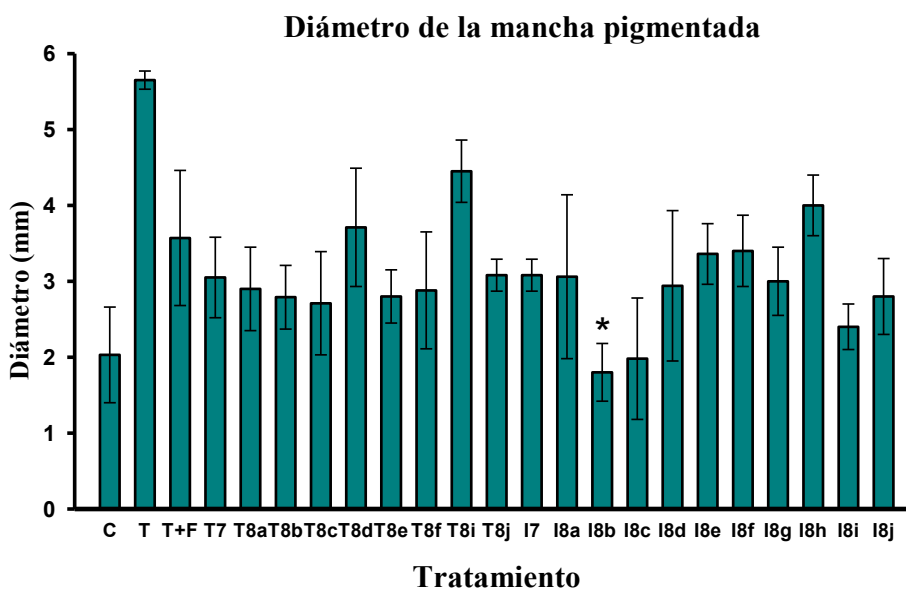


Figura 5.1. Actividad de los compuestos sobre diámetro de la mancha pigmentada

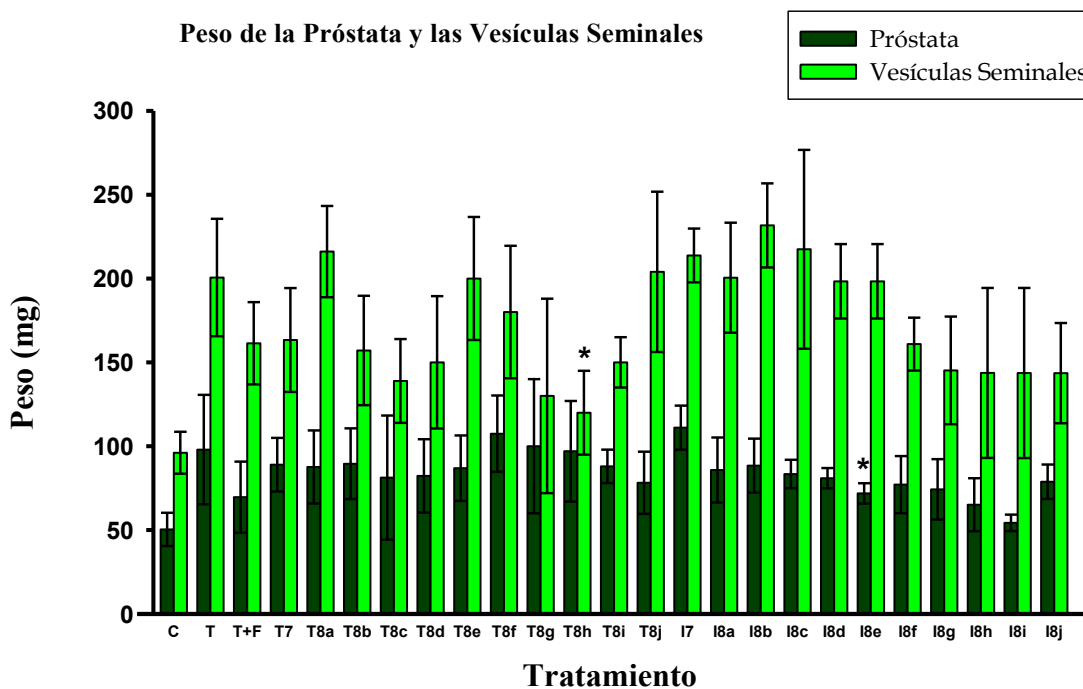


Figura 5.2. Actividad de los compuestos (T7, T8a-8j) sobre el peso de la próstata y las vesículas seminales

Por otra parte se determinó el porcentaje de la inhibición del crecimiento sobre diferentes líneas celulares de cáncer (PC-3: carcinoma prostático de células pequeñas, MCF7: adenocarcinoma mamario, SK-LU-1: cáncer de pulmón de células no pequeñas) a una sola concentración (50 μm) de los compuestos (T7, T8a-j, I7 e I8a-e). Este ensayo se llevó a cabo en la unidad de pruebas biológicas en el Instituto de Química, UNAM, implementando el método de coloración de la Sulforrodamida B, utilizando Ketoconazol (K) como control positivo y 16-DHP para comparar la actividad de los nuevos derivados con su materia prima (Tabla 4.17).

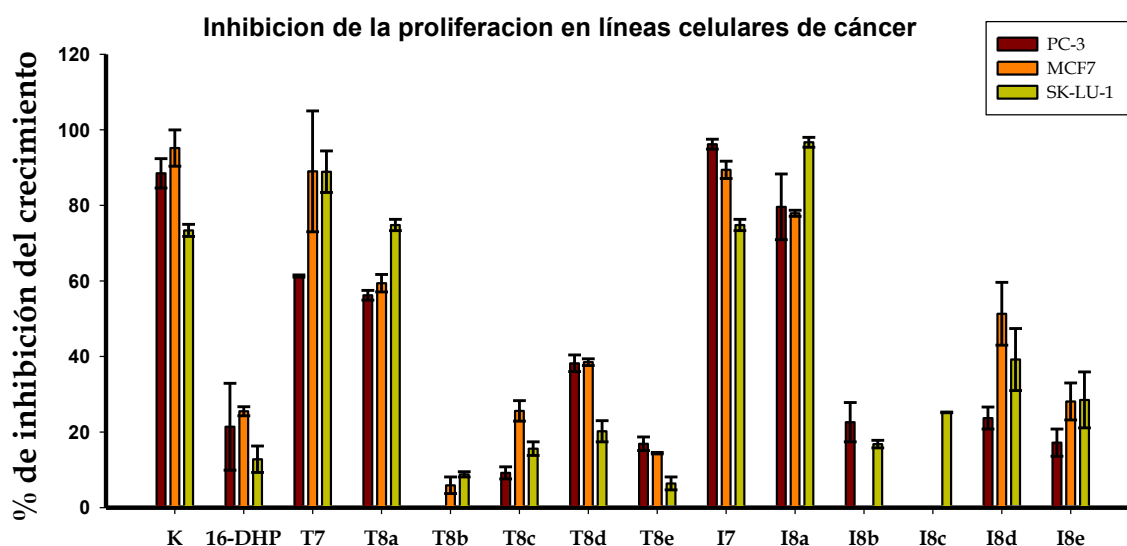


Figura 5.3. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular de algunos compuestos sobre líneas celulares de cáncer

Los compuestos T7, T8a, I7 e I8c presentaron los mejores resultados comparados con el control positivo. Cabe aclarar que los compuestos que contienen triazol en C-21 y un éster alicíclico en C-3 no presentaron ningún tipo de actividad (T8f-j) y que solo los compuestos que contienen ésteres lineales pequeños presentaron una actividad por encima del 60%, dejando claro que el tamaño del éster es de suma importancia para inhibir la proliferación de estas líneas celulares. Se cree que la forma en la que se acomodan los compuestos en los sitios activos de las células es la principal causa de esta actividad.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Respecto a los derivados que contienen imidazol en C-21 se observó una tendencia similar al de los derivados con triazol, solo los ésteres pequeños presentaron un alta inhibición de la proliferación, corroborando la importancia de que el éster en C-3 sea pequeño.

Hasta este momento no se ha encontrado una diferencia significativa al usar triazol (3 nitrógenos) o imidazol (2 nitrógenos) en C-21.

Desafortunadamente por razones de fuerza mayor los derivados con ésteres alicíclicos en C-3 e imidazol en C-21 no pudieron ser evaluados sobre estas líneas celulares. Debido a esto y con el fin de complementar el trabajo sobre líneas celulares se realizaron las curvas de proliferación a diferentes concentraciones de los compuestos T7 e I7, logrando determinar las CI₂₀ y CI₅₀ de cada uno sobre las tres líneas celulares de cáncer.

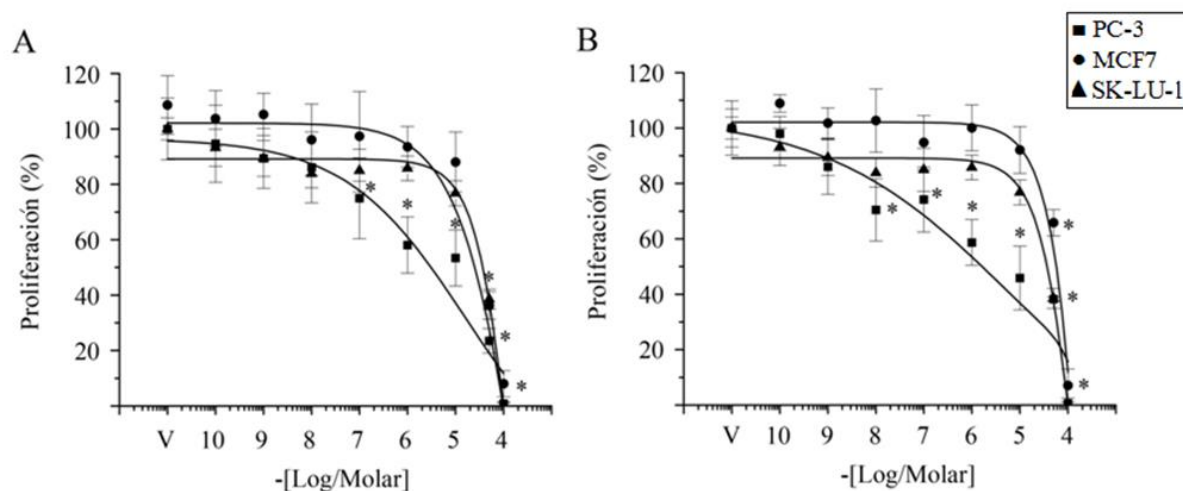


Figura 5.4. Curvas de proliferación celular de los compuestos T7 (A) y I7 (B)

Tabla 5.1. CI₂₀ y CI₅₀ para los compuestos T8 y I7 sobre líneas celulares de cáncer

Compuesto	CI	PC-3 (mol/L)	MCF7 (mol/L)	SK-LU-1 (mol/L)
T7	20	3.1×10^{-7}	4.1×10^{-5}	1.1×10^{-4}
	50	1.7×10^{-5}	3.6×10^{-4}	2.3×10^{-4}
I7	20	4.3×10^{-9}	4.1×10^{-5}	1.3×10^{-4}
	50	2.0×10^{-6}	1.9×10^{-5}	1.8×10^{-4}

Ambos derivados presentaron curvas de inhibición similares, a una mayor concentración de los compuestos la proliferación disminuye, es decir que ambos compuestos inhiben el crecimiento celular de forma dependiente a la concentración. Esta tendencia se notó con

ANÁLISIS DE RESULTADOS

mejor claridad sobre la línea celular PC-3; sin embargo, ésta presentó una mayor sensibilidad frente al compuesto **I7**, viéndose reflejado al tener un menor CI_{50} (2.0×10^{-6} M), de igual manera, a pesar de que las líneas celulares MCF7 y SK-LU-1 fueron más resistentes frente al estímulo con ambos compuestos, ambas presentaron una mejor respuesta a la inhibición a la proliferación con el compuesto **I7**. Quedando claro que los compuestos **T7** e **I7** son capaces de inhibir la proliferación de estas líneas celulares de cáncer exitosamente y mostrando una respuesta de la siguiente manera: PC-3 > MCF7 > SKLU-1.

Considerando que el compuesto **I7** presentó la mejor dosis-respuesta sobre las 3 líneas celulares de cáncer estudiadas, se determinó el efecto de este compuesto sobre diferentes genes de proliferación y apoptosis (CCND1, CCNE1, Ki-67, EAG1, BIM y Survivina) con el fin de proponer un posible mecanismo por el cual se estuviera inhibiendo la proliferación de las células cancerígenas. Para esto se evaluó cada uno de los genes posteriormente mencionados sobre cada una de las líneas de cáncer utilizando el método de la transcripción inversa por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). La respuesta positiva frente al estímulo con el compuesto **I7** para la expresión de cada gen se debe ver de la siguiente manera.

Proliferación	Apoptosis
- Ki-67 (↓)	- BCl ₂ (↓)
- EAG-1 (↓)	- Bax (↑)
- CCND1 (↓)	- Survivina (↑)
- CCNE1 (↓)	

Los resultados obtenidos mostraron que el compuesto **I7** tuvo un fuerte estímulo sobre los genes de proliferación correspondientes a las ciclinas (CCND1 y CCNE1) sobre las líneas PC-3 y MCF7.

concentración a lo largo de este ciclo. Las ciclinas forman complejos con enzimas quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) y así, forman el factor promotor de la maduración (MPF). Los MPF activan otras proteínas a través del proceso de fosforilación, a su vez estas proteínas fosforiladas son responsables de eventos específicos durante las diferentes etapas del ciclo celular, tales como la formación de microtúbulos y la remodelación de la cromatina.

La ciclina D1 es una proteína codificada en humanos por el gen CCND1 un regulador positivo en la transición de la fase G1-S, la CCND1 aumenta su concentración al final de fase G1 promueve la entrada a la fase S, su sobreexpresión está implicada en la progresión de algunos tumores. Igualmente se ha informado que la regulación a la alta de CCND1 podría estar relacionado con la evolución de las enfermedades andrógeno-independiente, como el cáncer de próstata.⁷⁶⁻⁷⁸

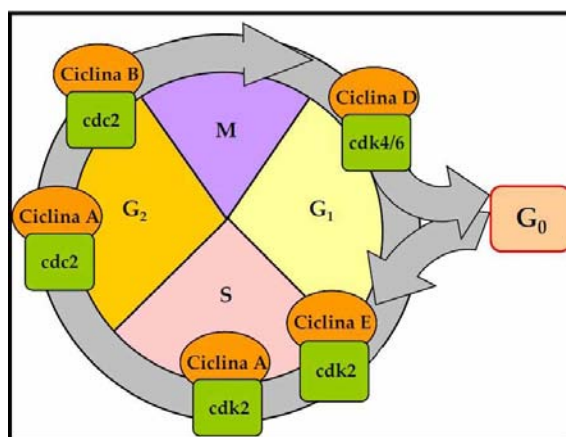


Figura 5.6. Expresión de las ciclinas en las diferentes fases del ciclo celular.

De igual forma, la proteína Ciclina E1 codificada por el gen CCNE1, está estrechamente relacionada con varias vías de regulación las cuales son de gran importancia para el control del crecimiento celular y con frecuencia se encuentran alteradas en las células cancerosas. La CCNE1 en conjunto con su subunidad de quinasas (Cdk2) regula los procesos esenciales entre el límite de la fase S y la fase G1 del ciclo celular, su concentración es indetectable en las fases G₀ y G₁, pero se eleva bruscamente durante el tiempo que precede a la fase S.⁷⁹⁻⁸⁰ Sobre la base de estos resultados se sugiere que el compuesto **I7** evita la acumulación y la actividad de la quinasas dependientes de ciclinas 4 (Cdk4) /CCND1 y la hiperfosforilación de la proteína retinoblastoma.

También se observó una respuesta positiva sobre el gen Survivina implicado en la apoptosis celular, sin embargo esta respuesta solo se observó sobre la línea de cáncer PC-3 y a muy altas concentraciones.

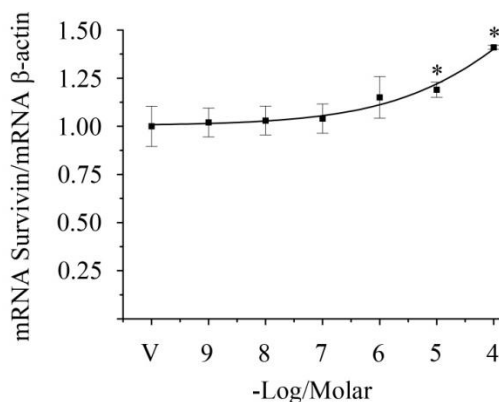


Figura 5.7. Respuesta del gen Survivina a diferentes concentraciones del compuesto I7

Sobre la línea celular SK-LU-1 no se observó expresión de ninguno de los genes evaluados.

Finalmente, como trabajo complementario de las pruebas *in vitro* y con el fin de responder la duda de si el compuesto **I7** presenta actividad como agonista o antagonista sobre el receptor de andrógenos o de progesterona, se realizó un estudio de transactivación sobre las células HeLa, las cuales carecen de receptores nucleares, permitiendo una evaluación libre de posibles falsos positivos.

Para el estudio de agonismo sobre el receptor de andrógenos se utilizó la 5α -DHT, ya que presenta una afinidad 3 veces mayor que la T. También se utilizó Flutamida (FLUT) ya que es el antiandrógeno más conocido e implementado en el mercado. En la figura A, se observó la unión exitosa de la 5α -DHT al receptor y la no unión del compuesto **I7** y la FLUT.

Mientras que en el estudio de antagonismo (B), la mezcla de la 5α -DHT+FLUT mostró una pequeña disminución de la respuesta CAT, dejando claro que la FLUT es capaz de bloquear la unión de la 5α -DHT a él RA. La mezcla de la 5α -DHT+**I7** no presentó ningún efecto representativo, permitiendo concluir que la ruta de acción de este compuesto no es por medio del RA.

En el estudio del agonismo del compuesto **I7** sobre el RP, se utilizó la progesterona (P_4), ya que es la encargada de activar al RP de manera natural. También se utilizó la mifeprestona, también conocida como RU486 por sus propiedades como antiprogéstágeno. En la figura C

ANÁLISIS DE RESULTADOS

se observó la unión exitosa de la P₄ al RP, mientras que ninguno de los otros dos compuestos evaluados presentó una respuesta, mostrando su no efecto como agonistas de este receptor. Sin embargo, al observar la figura D, se logró determinar que el compuesto **I7** logra competir parcialmente con el RU486 a altas concentraciones, bloqueando la respuesta de la P₄ sobre el RP, indicando un efecto antiprogestagenico y por consiguiente una idea clara de su posible mecanismo de acción esteroidal, clasificando estos derivados de la 16-DHP como antagonistas del RP, descartando así el RA.

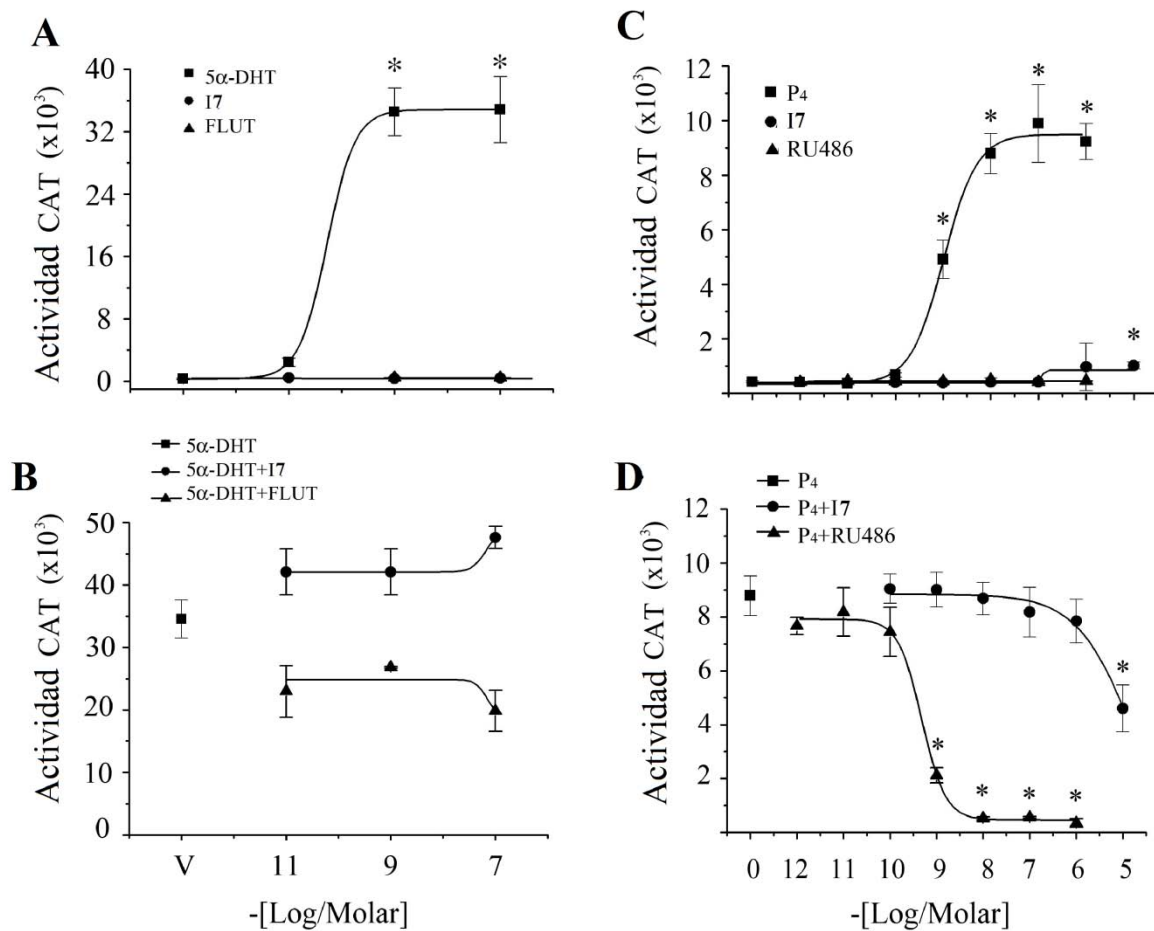


Figura 5.8. Estudio de agonismo o antagonismo del compuesto I7 sobre el receptor de andrógenos y/o progesterona

Debido a que desafortunadamente no se contaba con el plásmido del RVD para realizar la transactivación sobre las células HeLa, con el fin de determinar si el compuesto **I7** tenía algún tipo de efecto sobre este receptor se evaluó el gen CYP24A1 sobre la línea celular de cáncer PC-3. Este gen está directamente relacionado con la actividad del RVD. Sin embargo, no se observó ninguna respuesta, descartando el RVD como posible mecanismo de acción.

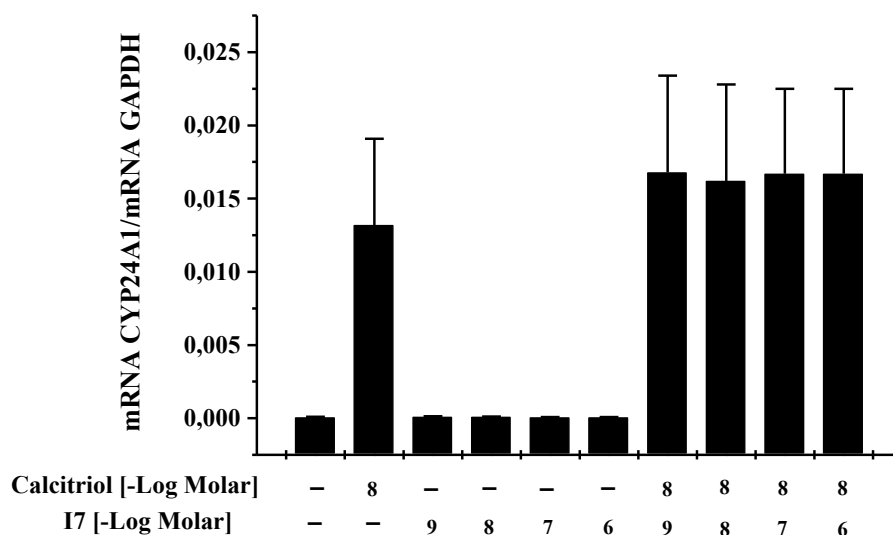


Figura 5.9. Expresión del gen CYP24A1 a diferentes concentraciones de I7 sobre la línea celular PC-3

Debido a la importancia biológica que presentaron los derivados **T7** e **I7** en los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* se realizó un docking, con el fin de racionalizar y visualizar a nivel molecular la importancia de sus características estructurales similares la progesterona y al mismo tiempo a algunos derivados androgénicos. Para esto se realizaron los acoplamientos moleculares de los compuestos sobre los receptores de progesterona, andrógenos y vitamina D, comparados con las energías de unión de los sustratos naturales de cada receptor. Los resultados obtenidos mostraron que la P₄, 5 α -DHT y el calcitriol (forma activa de la vitamina D), como era de esperar, tuvieron una alta afinidad por sus receptores presentado los clúster size mas altos, así como el programa Glide fue una mejor herramienta para determinar las energías de unión de estos ligandos naturales. Los compuestos **T7** e **I7** presentaron energías similares con los receptores; sin embargo, sus clúster size fueron más bajos en comparación con la P₄, 5 α -DHT y el calcitriol.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación se muestran las energías de enlace obtenidas y los cluster size utilizando dos herramientas diferentes para corroborar las energías obtenidas.

Tabla 5.2. Energías de unión y cluster size de los compuestos T7 e I7 sobre RP, RA y RVD

Compuesto	RP			RA			RVD		
	Glide Score ΔG_{bind} (Kcal/mol)	AutoDock ΔG_{bind} (Kcal/mol)	Cluster size	Glide Score ΔG_{bind} (Kcal/mol)	AutoDock ΔG_{bind} (Kcal/mol)	Cluster Size	Glide Score ΔG_{bind} (Kcal/mol)	AutoDock ΔG_{bind} (Kcal/mol)	Cluster size
P ₄	-12.2	-9.42 ^a	17	-5.8	-6.94 ^a	5	-8.1	-9.28 ^a	11
5 α -DHT	-5.8	-6.86 ^a	4	-10.8	-8.99 ^a	21	-7.5	-8.68 ^a	11
Calcitriol	-5.2	-6.25 ^a	3	-5.1	-6.21 ^a	3	-13.3	-9.91 ^a	17
T7	-7.3	-8.45	7	-5.4	-6.37 ^a	9	-9.8	-10.63 ^a	8
I7	-7.4	-7.47	6	-7.4	-8.23 ^a	8	-8.5	-9.61 ^a	7

^a Menor energía conformacional para cada compuesto.

A continuación se muestran las figuras obtenidas por medio del programa PyMol, en estas se puede observar que los compuestos inducen cambios conformacionales sobre el RP (Figuras C y D) bloqueando las interacciones de la P₄ con el ácido GLN725 en la cadena B (Figura A). Por otra parte ningún compuesto logró unirse de forma adecuada al RA (Figuras F y G), mientras que curiosamente los análisis implementando el RVD demostraron que ambos compuestos se acoplan en el dominio de unión (Figuras I y J) con interacciones muy similares que el calcitriol (Figura H).

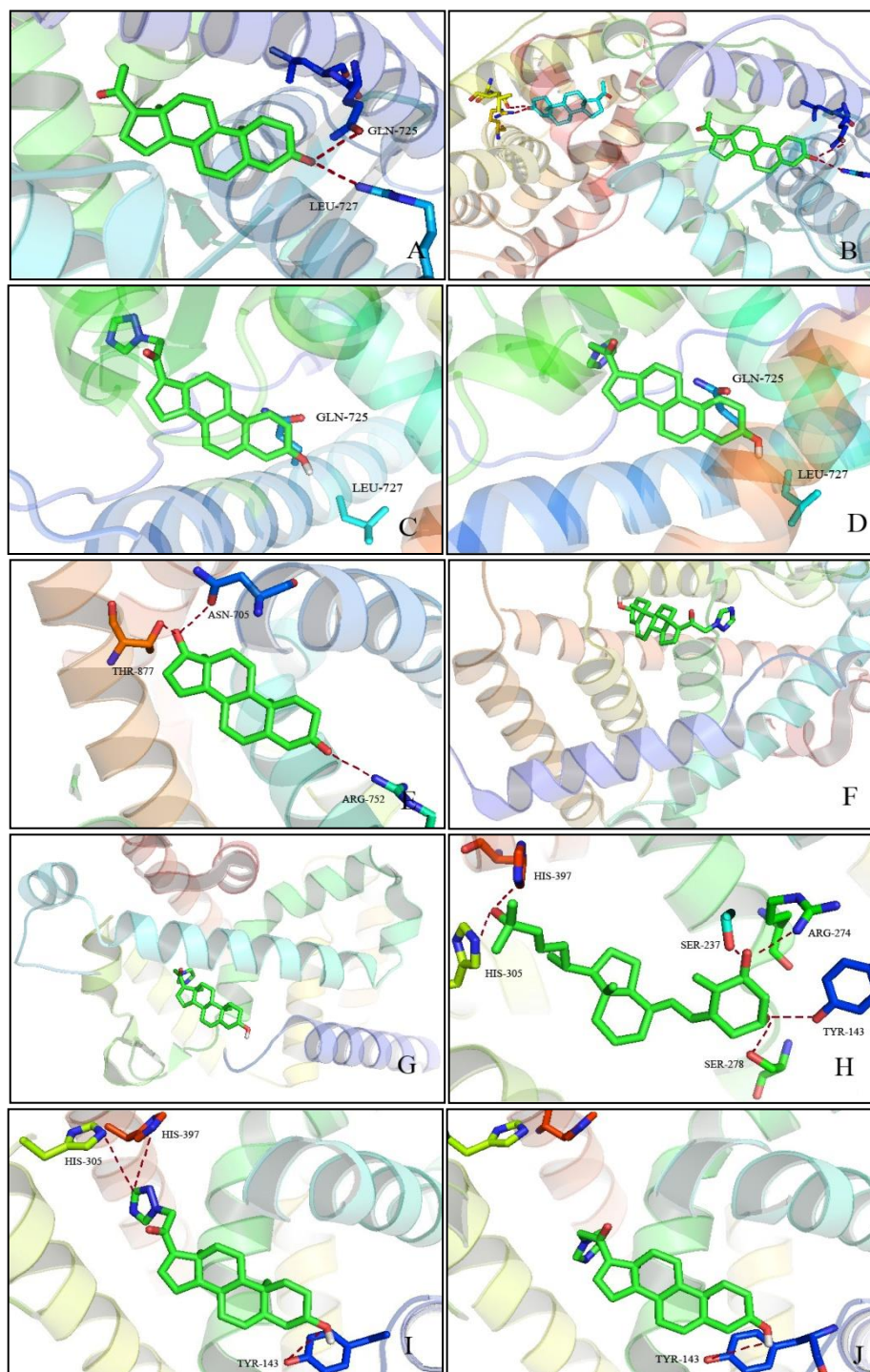
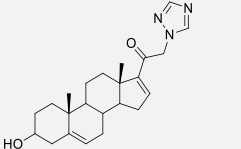
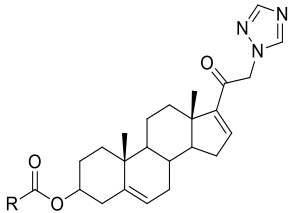





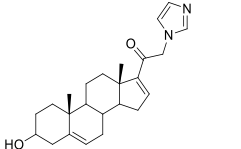
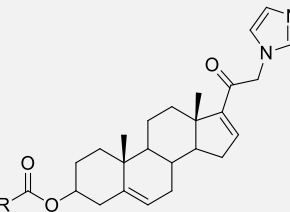







Figura 5.10. Interacciones moleculares de los compuestos T7 e I7 con los receptores hormonales. RP: A) Progesterona, B) progesterona en ambas caras del RP, C) T7 y D) I7 en la cara B del RP; RA: E) 5 α -DHT, F) T7 y G) I7; RVD: H) Calcitriol, I) T7 y J) I7. En A, B, D y G se observan los ligandos naturales.

Finalmente se calcularon los coeficientes de partición teóricos expresados como Log P de los compuestos finales para compararlos con la Finasterida y la 16-DHP, debido a que parte de la hipótesis de este trabajo se basó en la idea de que los ésteres en C-3 y los azoles en C-21 le brindarían liposolubilidad a los compuestos sintetizados.

Tabla 5.3. Valores teóricos de Log P para los derivados esteroidales sintetizados

ESTRUCTURA	Compuesto	R	Log P
Finasterida	-	-	3.15
16-DHP	-	-	3.32
	T7	-	2.58
	T8a	-CH ₃	2.81
	T8b	-C ₂ H ₅	3.47
	T8c	-C ₃ H ₇	3.88
	T8d	-C ₄ H ₉	4.3
	T8e	-C ₅ H ₁₁	4.72
	T8f		3.53
	T8g		3.95
	T8h		4.37
	T8i		4.79
	T8j		5.2
	I7	-	2.23
	I8a	-CH ₃	2.46
	I8b	-C ₂ H ₅	3.11
	I8c	-C ₃ H ₇	3.53
	I8d	-C ₄ H ₉	3.95
	I8e	-C ₅ H ₁₁	4.37
	I8f		3.18
	I8g		3.6
	I8h		4.02
	I8i		4.43
	I8j		4.85

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Estos resultados muestran que los compuestos **T7**, **T8a**, **I7** e **I8a** presentan valores de Log P menores que la Finasterida pudiendo explicar su alta actividad en líneas celulares ya que al ser menos liposolubles permiten una mejor solubilidad en el vehículo utilizado para estas pruebas y por consiguiente una mayor concentración para las evaluaciones. También se observó que al aumentar el tamaño del éster el Log P aumento; sin embargo, la actividad disminuyó notablemente, esto se puede deber que al aumentar su tamaño, su capacidad para penetrar membranas biológicas disminuye a pesar de su alto coeficiente de partición, otra explicación es que al aumentar su tamaño no logran acomodarse de manera correcta en el sitio activo de los receptores.

CONCLUSIONES

- Se realizó la síntesis de 22 nuevos derivados del acetato de 16-dehidropregnenolona, con un grupo triazol o imidazol en C-21 y ésteres lineales o alicíclicos en C-3 con rendimientos regulares y bajos para ambas rutas de síntesis implementadas.
- En la segunda ruta la purificación del compuesto clorado solo fue posible por métodos de recristalización, con rendimientos muy bajos por lo cual se decidió realizar la siguiente reacción *in situ* obteniendo mejores rendimientos.
- Se evaluaron los 12 derivados que contienen ésteres lineales en líneas celulares cancerosas, donde se observó que 4 de estos compuestos (**T7**, **T8a**, **I7**, **I8a**) presentan una alta actividad antiproliferativa de las 3 líneas estudiadas, los demás compuestos tuvieron una actividad despreciable, permitiéndonos demostrar que la presencia de ésteres pequeños en C-3 es esencial para la inhibición de la proliferación sobre líneas celulares de cáncer.
- Los derivados **T8b** y **T8d** presentaron una actividad mejor (88 nm y 320 nm) que el fármaco del mercado Finasterida (630 nm) en la inhibición sobre la enzima 5 α -reductasa de tipo 1.
- Todos los compuestos sintetizados fueron sometidos a pruebas *in vivo* para determinar su posible actividad antiandrogénica. En base a los resultados obtenidos se determinó que ninguno presentó actividad como potenciales agentes antiandrogénicos.
- El compuesto **I7** presentó actividad antagonista a la progesterona sobre su receptor, además de una alta actividad sobre los genes CCND1 y CCNE1, ambos directamente relacionados con los procesos proliferativos sobre las líneas celulares de cáncer PC-3 y MCF7, presentando una mejor tendencia a la inhibición sobre la línea PC-3, convirtiendo a este compuesto como un candidato ideal para futuros estudios en tratamientos de cánceres hormono-independiente.

BIBLIOGRAFIA

- 1- <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es> pagina consultada el día 18 de enero 2016.
- 2- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, *CA: Cancer J. Clin.*, 66, **2016**, p. 7-30.
- 3- Newschanffer C.J., Otani K., Mc Donald M.K., Penberthy L.T., Causes of death in elderly prostate cancer patients and comparison nonprostate cancer cohort, *J. Natl. Cáncer Inst.*, 92, **2000**, p. 613-621.
- 4- Martinez A., Esteroles, Facultad de química farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellin, 2002.
- 5- Moss G.P., Nomenclature of steroids, *Eur. J. Biochem.*, 186, **1989**, p. 429-458.
- 6- Payne A.H., Hales D.B., Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones, *Endocr. Rev.*, 25, **2004**, p. 947-970.
- 7- Brandan N., Llanos I.C., Miño C.A., Cátedra de Bioquímica, Universidad Nacional del Nordeste, **2008**, p. 3-4.
- 8- Medina G., Bioquímica humana (curso básico), Editorial Reverte, España, **1984**, p. 435.
- 9- Matsuo H., Baba Y., Nair R.M.G., Arimura A., Schally A.V., Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, **1971**, p. 1334-1339.
- 10- Rudinger J., "Characteristics of the amino acids as components of a peptide hormone sequence", *Peptide Hormones.*, Macmillan Education UK, **1976**, p. 1-7.
- 11- Marieb E.N., Human Anatomy & physiology, Pearson Education, Inc. U.S.A. 2014
- 12- Boron W.F., Boulpaep E.L., Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach, Elsevier, **2003**, p. 1300
- 13- Novac N., Heinzl T., Nuclear Receptors: Overview and Classification, *Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy.*, **2004**, p. 335-346
- 14- Krishnan A.V., Feldman D., Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 51, **2011**, p. 311-336.
- 15- Solari J. A., Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina, Ed. Medica Panamericana, Argentina, **2004**.

BIBLIOGRAFIA

- 16- Yen P.M., Classical nuclear hormone receptor activity as a mediator of complex biological responses: A look at health and disease, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29, **2015**, p. 517-528.
- 17- Adaptado de: <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/the-endocrine-system-37/how-hormones-work-211/> página consultada el 19 de mayo del **2016**.
- 18- Craig M.A., Beppler G.A., Santos C., Raffa R.B., A second (non-genomic) steroid mechanism of action: possible opportunity for novel pharmacotherapy?, *J. Clin. Pharm. Ther.*, 30, **2005**, p. 305-312.
- 19- Gronemeyer H., Gustafsson J., Laudet V., Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2004**, p. 950-964.
- 20- Adaptado de: Page C.P., Curtis M.J., Sutter M.C., Walker M.J.A., Hoffman B., *Farmacología integrada*, Harcourt, **1998**, p. 19
- 21- <http://www.who.int/topics/cancer/en/> pagina consultada el 27 de mayo del **2016**.
- 22- <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer/> página consultada el día 28 de mayo del **2016**.
- 23- Randall V.A., Role of 5 α -reductase in health and disease. *Baillieres Clin. Endocrinol Metab.*, 28, **1994**, p. 405-431.
- 24- Siegel R., Naishadham D., Jemal A, Cancer Facts & Figures 2016, American cancer society. **2016**.
- 25- Rojas F.D., Manzo J.D., Soto-Cid A.H., Aranda-Abreu G.E., Aguilar E.J., Coria-Avila G.A., Toledo-Cardenas R., Espinosa J. L., Hernandez M. E., El receptor de andrógenos en la fisiopatología de la próstata. *eNeurobiologia*, **2011**, 2, 230-511.
- 26- Schmidt, L.J., Tindall D.J., Steroid 5 α -reductase inhibitors targeting BPH and prostate cancer, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 125, **2011**, p. 32-38.
- 27- Russell D.W., Wilson J.D., Steroid 5 α -Reductase: Two genes/Two enzymes, *Annu. Rev. Biochem.*, 64, **1994**, p. 25-61.
- 28- Thigpen, A.E., Silver, T.I., Guileyardo, J.M., Casey, M.L., McConnell, J.D., Russell, D.W., Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression, *J. Clin. Invest.*, 92, **1993**, p. 903-910.
- 29- Kenny, B., Ballard, S. Blagg, J., Fox, D., Pharmacological options in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J. Med. Chem*, 40(9), **1997**, p. 1293-1315.

- 30- Bull, H.G., et.al. Mechanism-based inhibition of human steroid 5 α -reductase by finasteride: enzyme-catalyzed formation of NADP-dihydrofinasteride, a potent bisubstrate analog inhibitor, *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (10), **1996**, p. 2359-2365
- 31- Leitzmann M F., Rohrmann S., Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates, *J. Clin. Epidemiol.*, 4, **2012**, p. 1-11.
- 32- Carter H.B., Epstein J.I., Partin A.W., Influence of age and prostate-specific antigen on the chance of curable prostate cancer among men with nonparticle disease. *Urology*, 53 (1), **1999**, p. 126-130.
- 33- Pietzak E.J., Arsdalen K.V., Patel K., Malkowicz S.B., Wein A.J., Guzzo T.J., Impact of race on selecting appropriate patients for active surveillance with seemingly low-risk prostate cancer., *Urology*, 85 (1), **2015**, p. 436-441.
- 34- Elshafei A., Moussa A.S., Hatem A., Ethan V., Panumatrassamee K., Hernandez A.V., Jones J.S., Positive family history of prostate cancer increase the risk of prostate cancer on initial prostate biopsy?. *Urology*, 81 (4), **2013**, p. 826-830.
- 35- Rubin M.A., De Marzo A.M., Molecular genetics of human prostate cancer, *Mod. Pathol.*, 17, **2004**, p. 380-388.
- 36- Vlajinac H., Ilic M., Marinkovic J., Sipetic S., Nutrition and prostate cancer, *J. BUON*. 15, **2010**, p. 698-703.
- 37- Kenfield S.A., Stampfer M.J., Chan J.M., Giovannucci E., Smoking and prostate cancer survival and recurrence., *JAMA: the journal of the American Medical Association.*, 305, **2011**, p. 2548-2555.
- 38- Arkes H.R., Gaissmaier W., Psychological research and the prostate-cancer screening controversy. *Psychol. Sci.*, 23 (6), **2012**, p. 547-553.
- 39- Wright J., Izard J.P., Lin, D.W., Surgical Management of Prostate Cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 27, **2013**, p. 1111-1135.
- 40- Antolak J.A., Rosen I.I., Childress C.H., Zagars G.K., Pollack A., Prostate target volume variations during a course of radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 42, **1998**, p. 661-672.
- 41- Green, N.A. Cryosurgery of the prostate gland. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, 59, **1977**, 288-297.
- 42- Cassinello J., Arcediano A., Mohedano N., The role of chemotherapy in advanced prostate cancer. *Cancer and Chemotherapy Reviews*, 4, **2009**, p. 69-78.
- 43- Gerritsen W.R., The evolving role of immunotherapy in prostate cancer. *Ann. Oncol.*, 23, 2012, viii22-viii27

- 44- Mottet, N., et al. "Guía de la EAU sobre el cáncer de próstata. Parte II: tratamiento del cáncer de próstata avanzado, recidivante y resistente a la castración." *Actas Urol. Esp.*, 35 (10) 2011, p. 565-579.
- 45- Barrie S.E., Inhibition of 17α -hydroxylase/C17-C20 lyase by bifluranol and its analogues. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 33, **1986**, p. 1191-1195.
- 46- Kumar V.L., Wahane V.D. Indian Current status of 5α -reductase inhibitors in the treatment of benign hyperplasia of prostate., *Indian J. Med. Sci.*, **2008**, 62, 167-175.
- 47- Vasaitis T.S., Brunce R.D., Njar V.C., *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 12, **2011**, p. 23-31.
- 48- Denmeade S.R., Isaacs J.T., A history of prostate cancer treatment, *Nat. Rev. Cancer.*, 2, 2002, p. 389-396.
- 49- Frank E., Schneider G., Synthesis of sex hormone-derived modified steroids possessing antiproliferative activity, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 137, 2013, p. 301-315.
- 50- Li D.Q., Wang Z.B., Bai J., Zhao J., Wang Y., Hu K., Du Y.H., Effects of mifepristone on proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 in vitro, *World J. Gastroenterol*, 10, **2004**, p. 2628-2631.
- 51- Minorics R., Bozsity N., Wolfling J., Mernyak E., Schneider G., Marki A., Falkay G., Ocsosvzki I., Zupko I., Antiproliferative effect of normal and 13-epi-D-homoestrone and their 3-methyl ethers on human reproductive cancer cell lines, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 132, **2012**, p. 168-175.
- 52- Nishiyama T., Androgen deprivation therapy in combination with radiotherapy for high-risk clinically localized prostate cancer, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 129, **2012**, p. 179-190.
- 53- Pearce S.T., Jordan V.C., The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 50, **2004**, p. 3-22.
- 54- Arellano G., Nuevos Derivados de la Deshidroepiandrosterona como Inhibidores de la Enzima 5α -Reductasa y/o Antagonistas del receptor Androgenico, Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM **2013**.
- 55- Posada A., Síntesis de Antiandrógenos Esteroidales Basados en el Esqueleto de Deshidroepiandrosterona con un Heteroatomo en C-17, Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM **2011**.

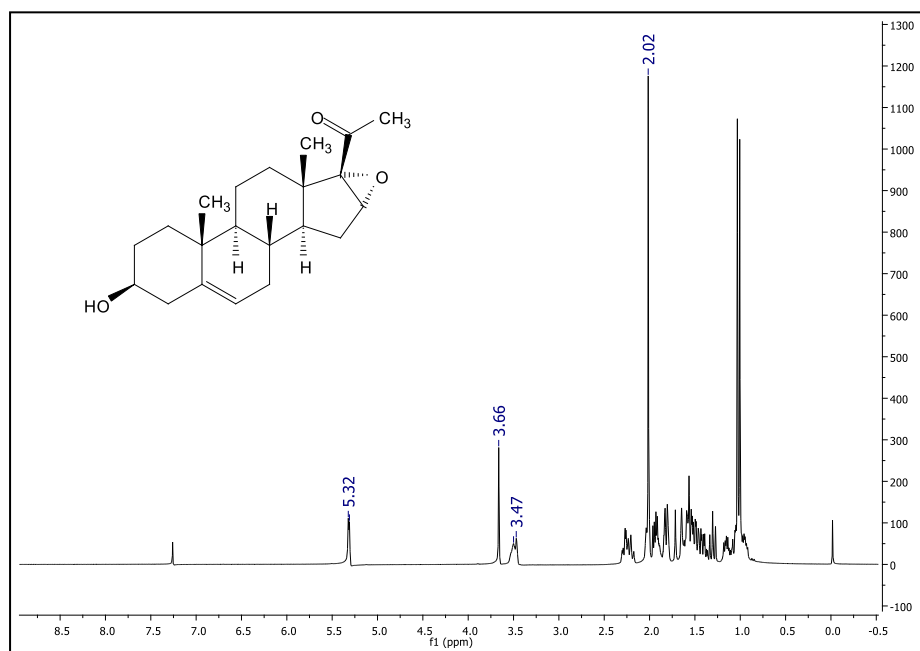
BIBLIOGRAFIA

- 56- Cortes F., Síntesis y Evaluación biológica de derivados de la deshidroepiandrosterona con un grupo azol en C-17 como antiandrógenos. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM **2013**.
- 57- Mendoza M.E., Síntesis y evaluación biológica de derivados deshidroepiandrosterona con un grupo azol en C-17 y esteres de cinamoilo en C-3. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM **2015**
- 58- Silva A.V., Síntesis y evaluación biológica de derivados de deshidroepiandrosterona con un carbazol y un triazol en C-17 como posibles antiandrógenos. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM **2013**.
- 59- Chavez A., Síntesis y evaluación biológica de nuevos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa basados en la estructura del esqueleto del pregnano con un grupo éster en C-3. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM **2012**.
- 60- Sanabria E.E., Síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados del pregnano con una función éster en C-3 como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM **2014**.
- 61- Reyes A. síntesis y evaluación antiproliferativa de compuestos híbridos del pregnano con aines en C-21. Tesis de Maestría, Facultad de Química, **2015**.
- 62- Acevedo L.I., Síntesis nuevos derivados del pregnano con un grupo ester en el C-21 y evaluación antiproliferativa. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM **2015**.
- 63- I. Petit-Topin N., Turque J., Fagart M., Fay A., Ulmann E., Gainer, M.E. Rafestin-Oblin, Met909 plays a key role in the activation of the progesterone receptor and also in the high potency of 13-ethyl progestins, *Mol. Pharmacol.*, **75**, **2009**, p. 1317-1324.
- 64- He B., Gampe R.T., Kole A.J., Hnat A.T., Stanley T.B., An G., Stewart E.L., Kalman R.I., Minges J.T., Wilson E.M., Structural basis for androgen receptor interdomain and coactivator interactions suggests a transition in nuclear receptor activation function dominance, *Mol. Cell.*, **16**, **2004**, p. 425-438.
- 65- Tocchini-Valentini G., Rochel N., Wurtz J.M., Moras D., Crystal structures of the vitamin D nuclear receptor liganded with the vitamin D side chain analogues calcipotriol and seocalcitol, receptor agonists of clinical importance. Insights into a structural basis for the switching of calcipotriol to a receptor antagonist by further side chain modification, *J. Med. Chem.*, **47**, **2004**, p. 1956-1961.

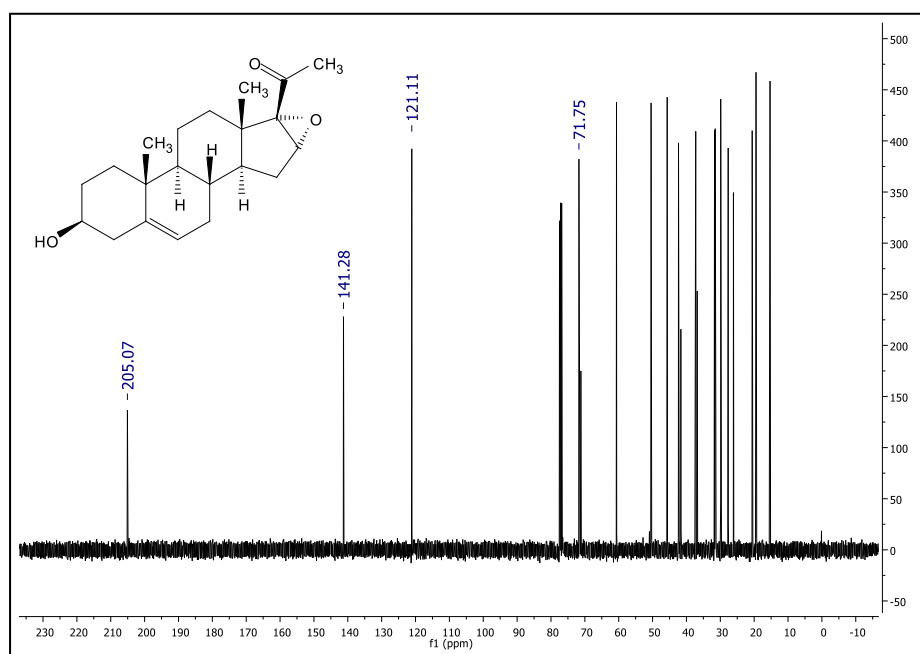
BIBLIOGRAFIA

- 66- Sanner M.F., Python: a programming language for software integration and development, *J. Mol. Graph. Model.*, 17, **1999**, 57-61.
- 67- Glide, version 5.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2011**.
- 68- Maestro, version 9.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2014**.
- 69- The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.3, Schrödinger, LLC.
<http://www.pymol.org>.
- 70- Corey E.J., Venkateswarlu A., Protection of hydroxyl groups as tert-butyltrimethylsilyl derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 94 (17), **1972**, p.6190-6191.
- 71- Patschinski P., Zhang C., Zipse H., The lewis Base-Catalyzed Silylation of Alcohols-A Mechanistic Analysis. *J. Org. Chem.* 79, 2014, p.8348-8357.
- 72- Prakash O., Singh S., Iodobenzene diacetate and related hypervalent iodine reagents in the synthesis of heterocyclic compounds. *Aldrichimia Acta.* 27 (1), 1994, p. 15-23.
- 73- Cole W., Julian P., Reductions of epoxy ketones by chromous salts. *J. Org. Chem.*, 19, **1954**, p. 131-138.
- 74- Kochi J.K., Singleton D.M., Andrews I.J., Alkenes from halides and epoxides by reductive eliminations with Cr^{II} complexes. *Tetrahedron*, 24, **1968**, 3503-3515.
- 75- Neises B., Steglich W., Simple method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 17, **1978**, p. 522-524.
- 76- Baldin V., Lukas J., Marcote M.J., Pagano M., Draetta G., Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1, *Genes Dev.*, 7, **1993**, p. 812-821.
- 77- Drobnjak M., Osman I., Scher H.I., Fazzari M., Cordon-Cardo C., Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone, *Clin. Cancer Res.*, 6, **2000**, p. 1891-1895.
- 78- Kaukonen K.M., Rauhaluoma H.E., Scaravilli M., Latonen L., Annala M., Vessella R.L., Nykter M., Tammela T.L., Visakorpi T., Epigenetically altered miR-193b targets cyclin D1 in prostate cancer, *Cancer Med.*, 4, **2015**, 1417-1425
- 79- Gudas J.M., Payton M., Thukral S., Chen E., Bass M., Robinson M.O., Coats S., Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers, *Mol. Cell. Biol.*, 19, **1999**, p. 612-622.
- 80- Moroy T., Geisen C., Cyclin E, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36, **2004**, p. 1424-1439.

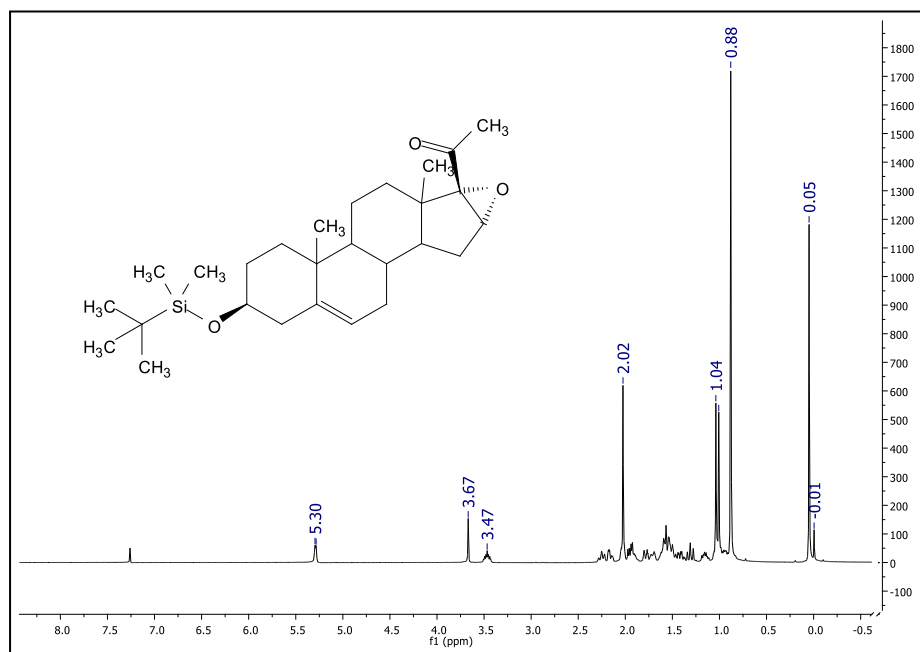
ANEXOS



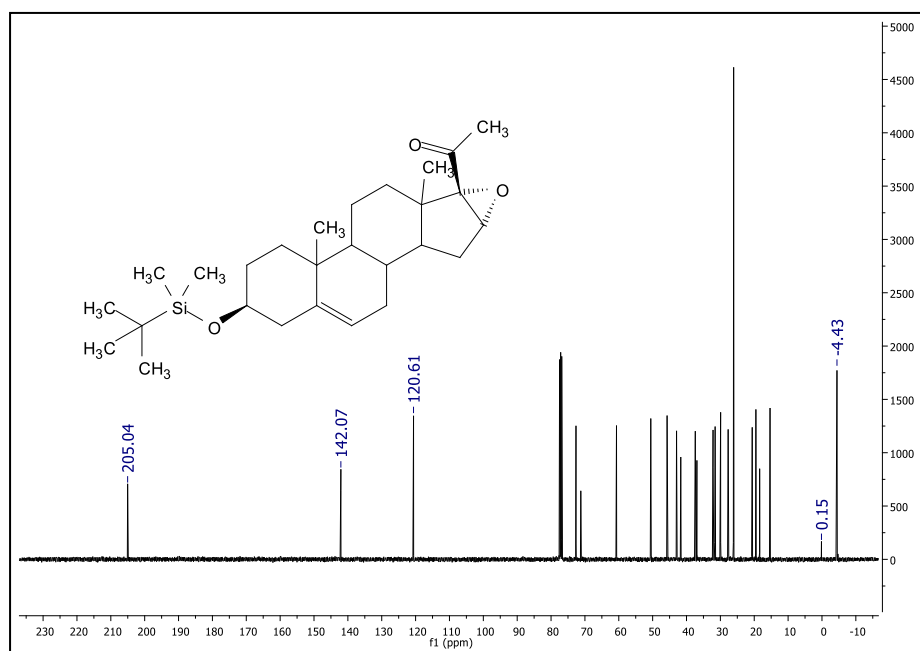
Espectro A.1. Espectro de RMN ¹H de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-pregna-16-en-20-ona
(2)



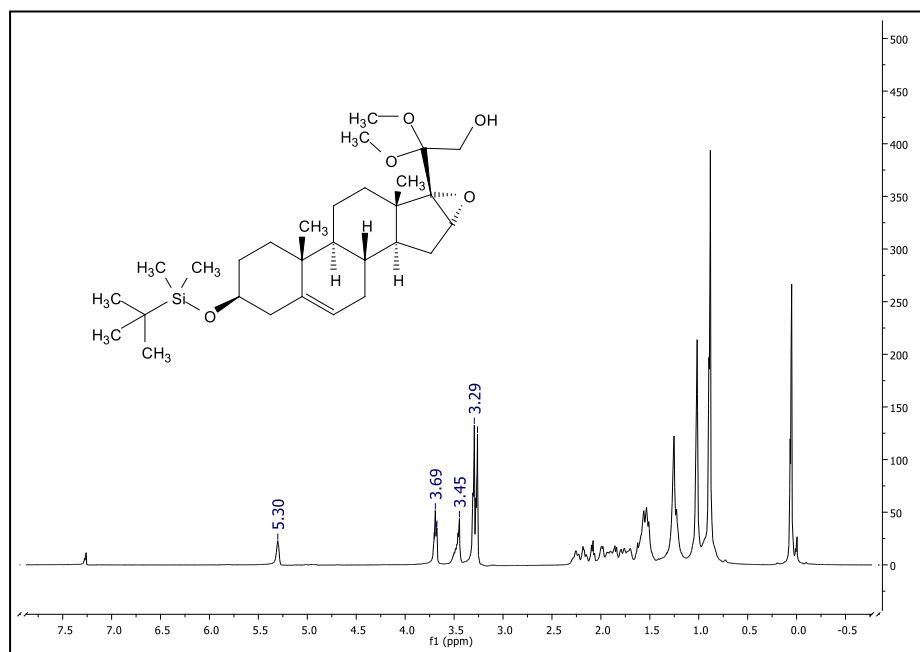
Espectro A.2. Espectro de RMN ¹³C de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-pregna-16-en-20-ona (2)



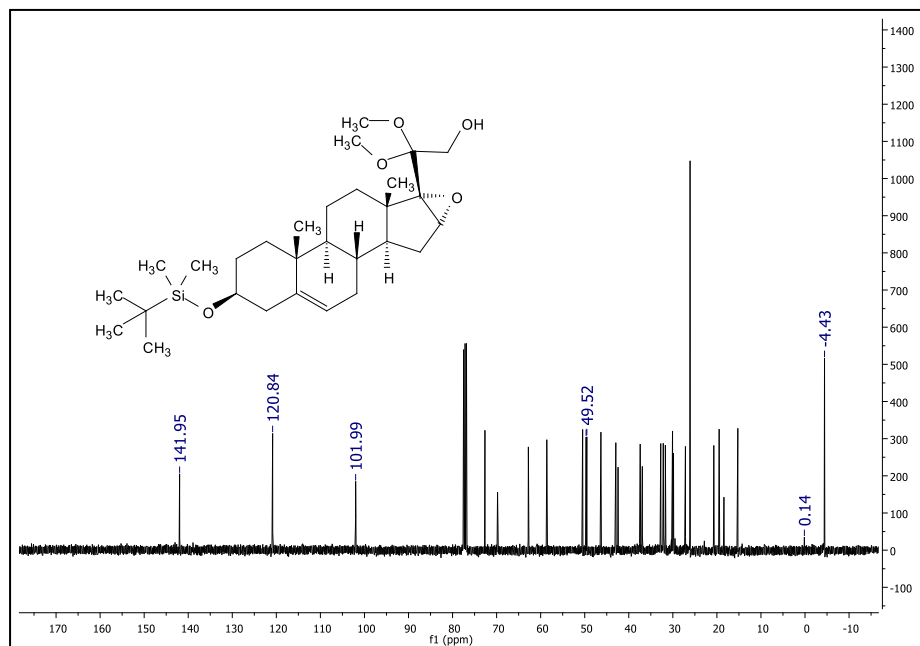
Espectro A.3. Espectro de RMN ^1H de 3β -{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}- $16\alpha,17\alpha$ -epoxipregn-5-en-20-ona (3 en ruta 1)



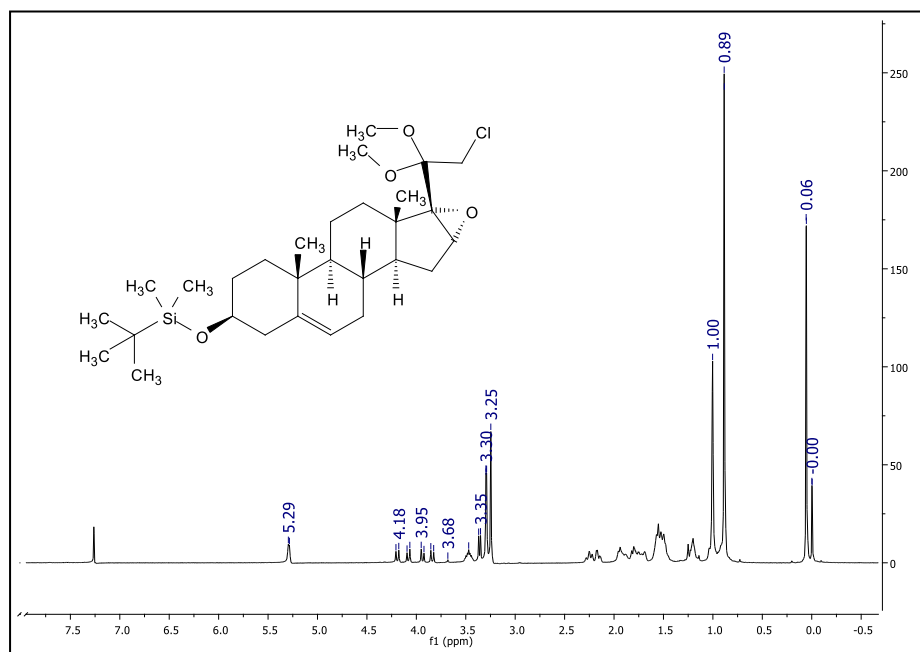
Espectro A.4. Espectro de RMN ^{13}C de 3β -{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}- $16\alpha,17\alpha$ -epoxipregn-5-en-20-ona (3 en ruta 1)



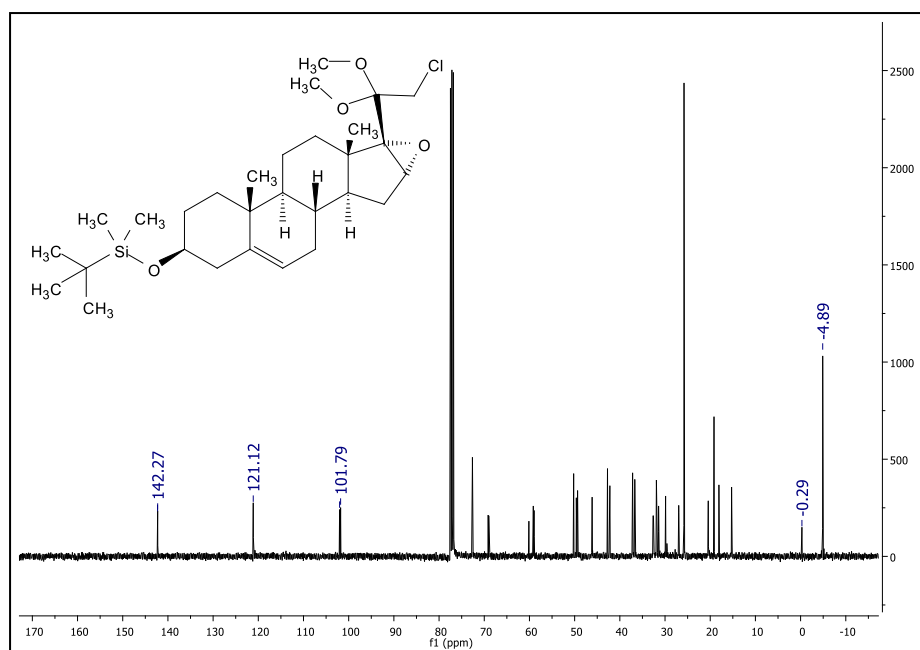
Espectro A.5. Espectro de RMN ¹H de 3β-[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi]-20,20-dimetoxi-16α,17α-epoxipregn-5-en-21-ol (4 en ruta 1)



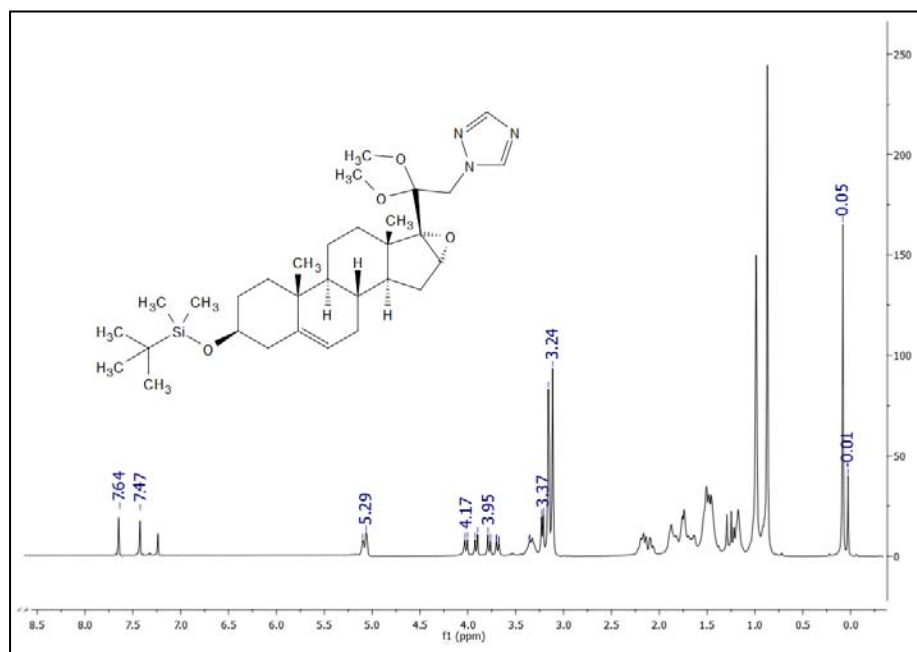
Espectro A.6. Espectro de RMN ¹³C de 3β-[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi]-20,20-dimetoxi-16α,17α-epoxipregn-5-en-21-ol (4 en ruta 1)



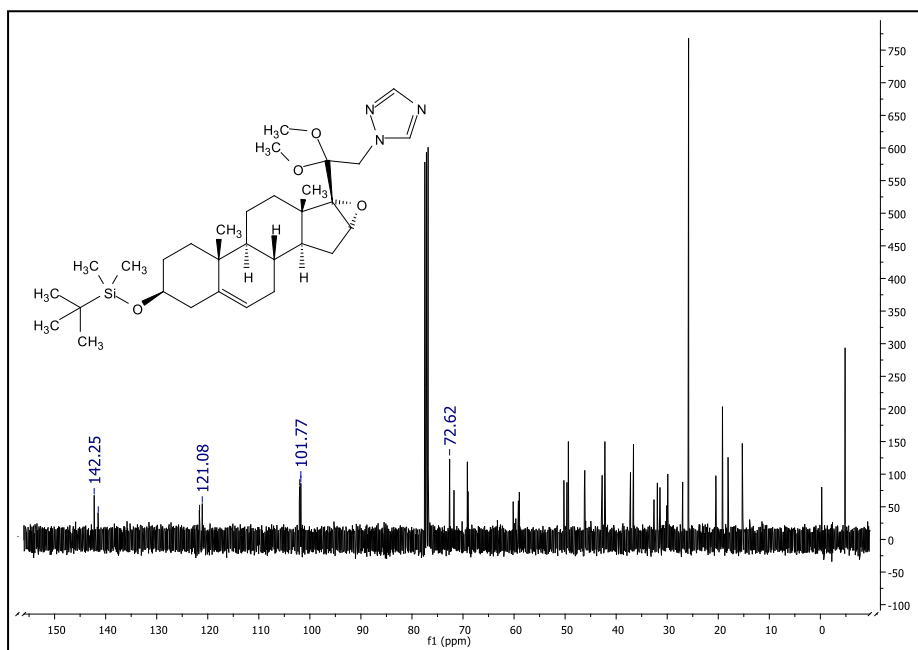
Espectro A.7. Espectro de RMN ^1H de 3 β -{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-21-cloro-20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-eno (5 en ruta 1)



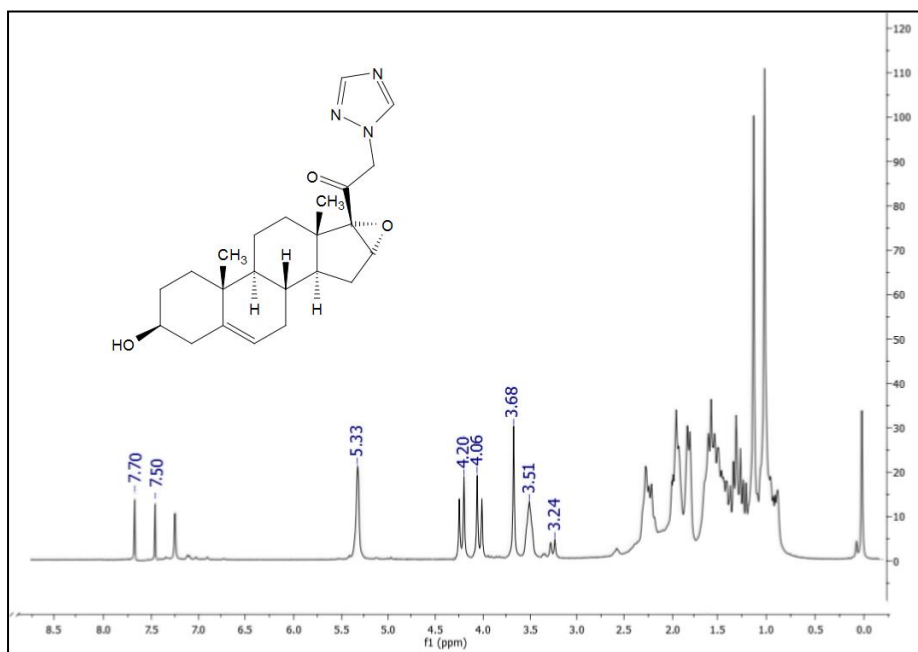
Espectro A.8. Espectro de RMN ^{13}C de 3 β -{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-21-cloro-20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-eno (5 en ruta 1)



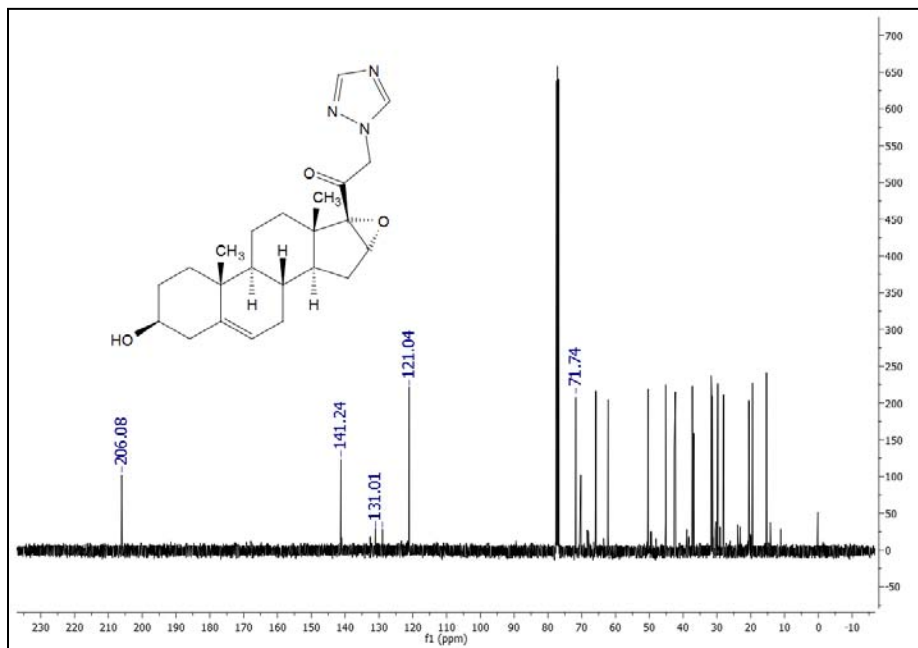
Espectro A.9. Espectro de RMN ^1H de 3β -{*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-eno (6 en ruta 1)



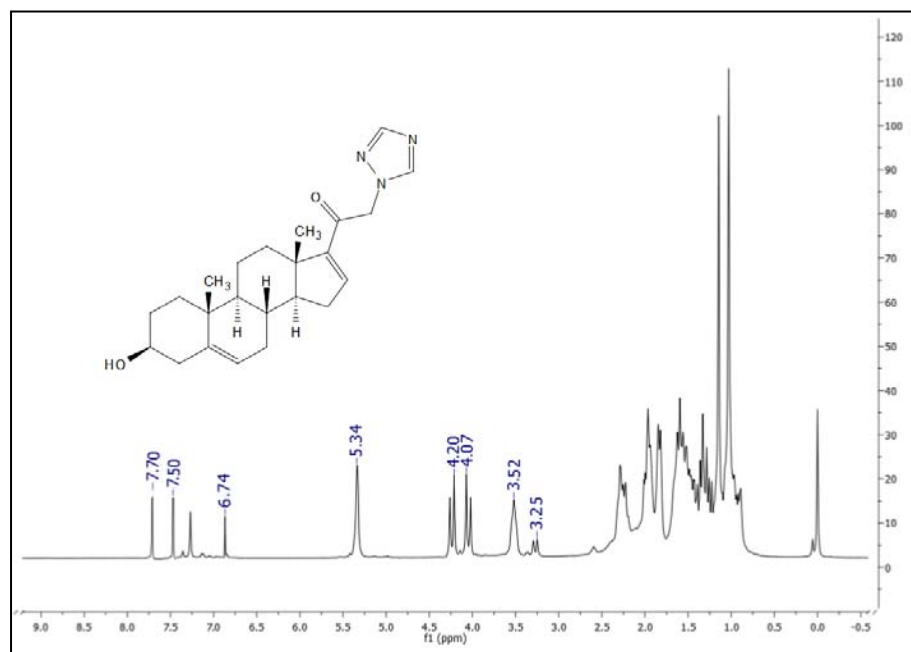
Espectro A.10. Espectro de RMN ^{13}C de 3β -{*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}-20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-eno (6 en ruta 1)



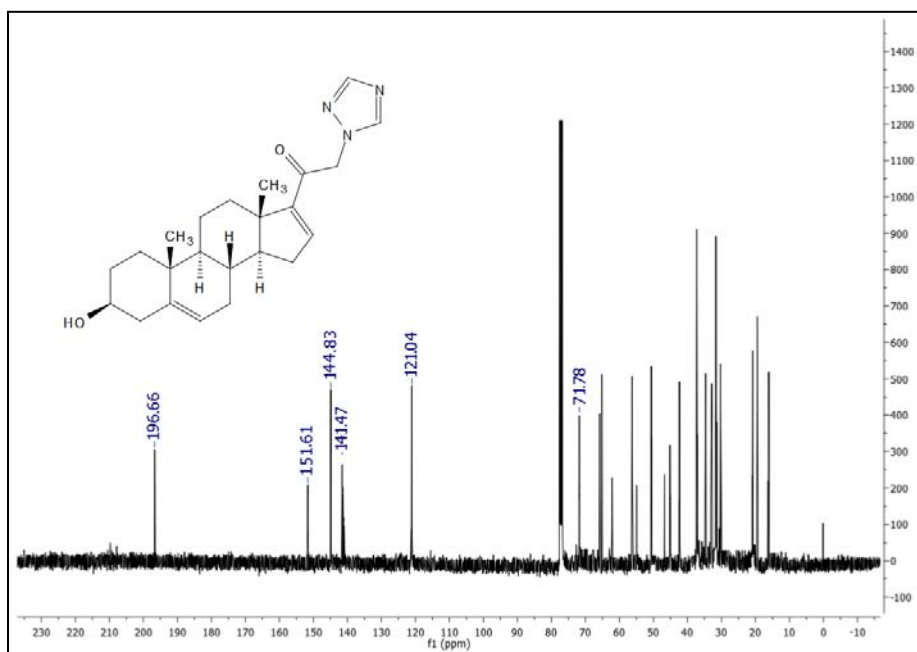
Espectro A.11. Espectro de RMN ^1H de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregn-5-en-20-ona (7 en ruta 1)



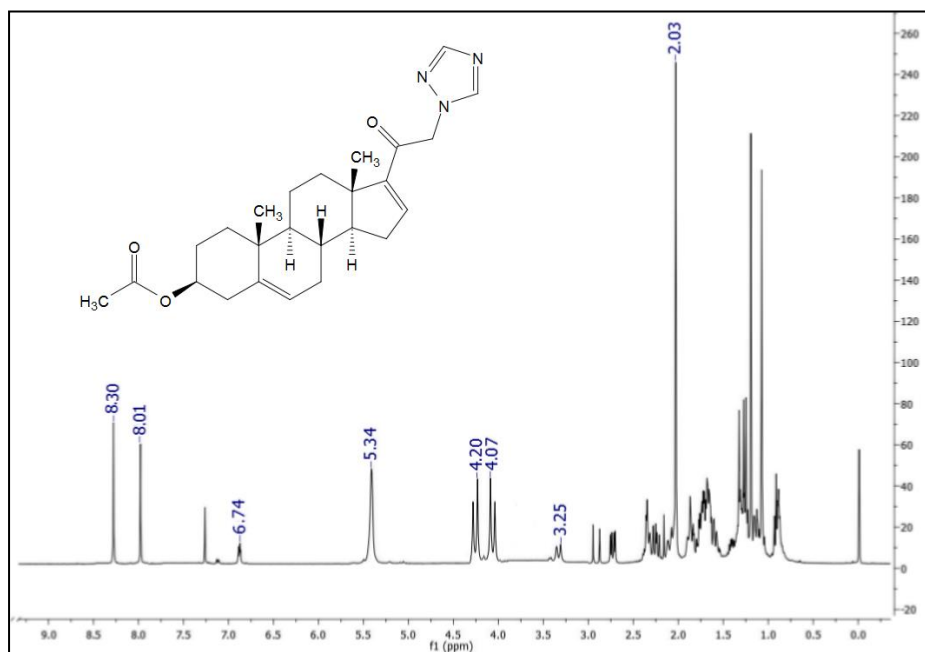
Espectro A.12. Espectro de RMN ^{13}C de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregn-5-en-20-ona (7 en ruta 1)



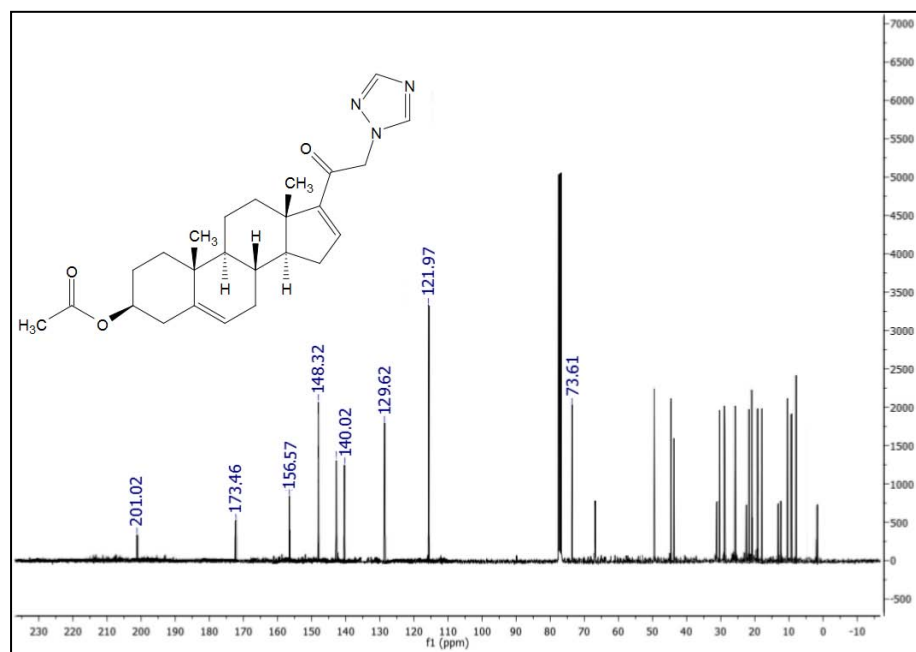
Espectro A.13. Espectro de RMN ^1H de 3 β -hidroxi-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (8 en ruta 1, T7 en ruta 2)



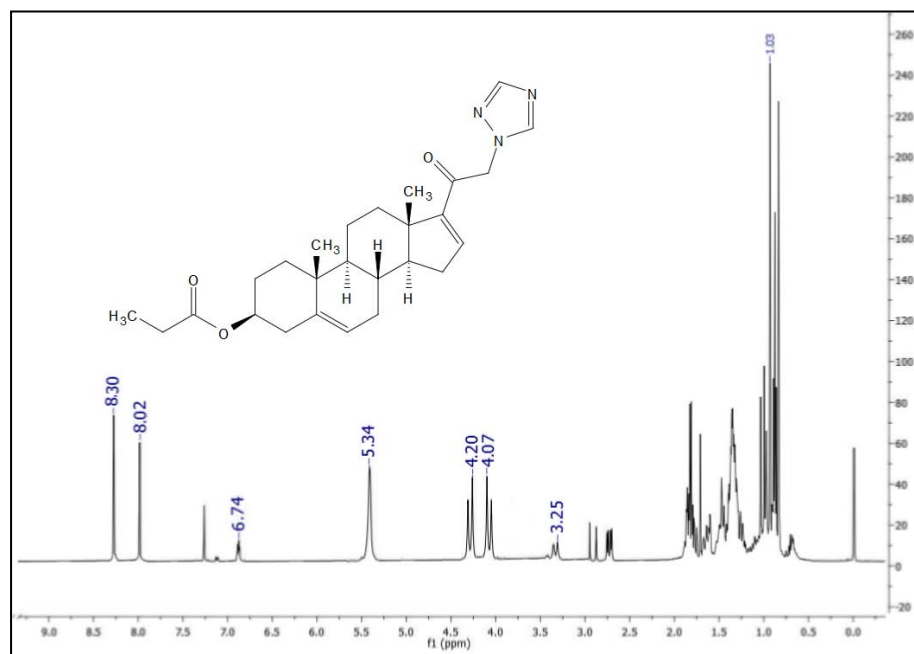
Espectro A.14. Espectro de RMN ^{13}C de 3 β -hidroxi-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (8 en ruta 1, T7 en ruta 2)



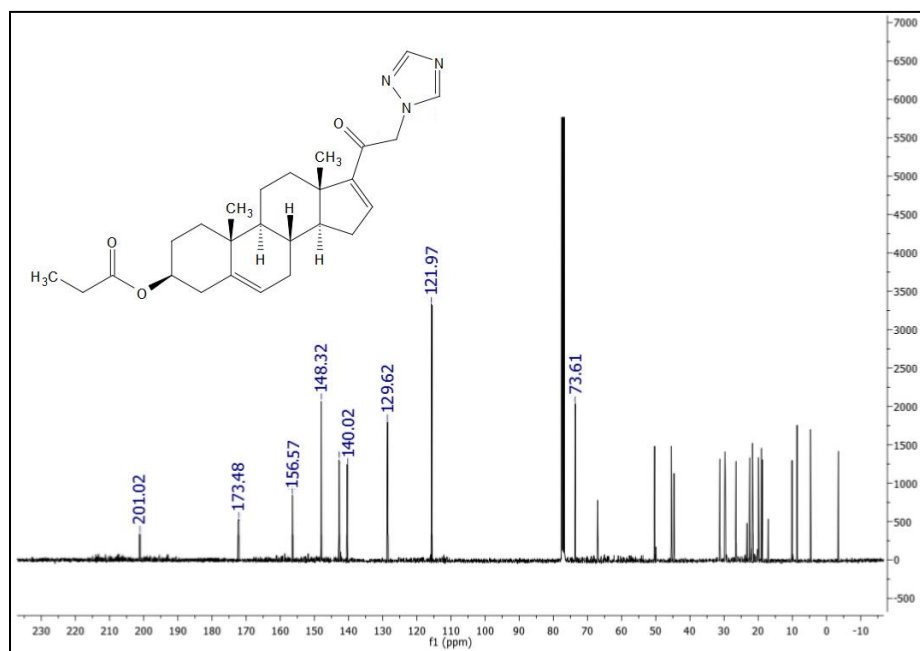
Espectro A.15. Espectro de RMN ^1H del acetato de 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8a en ruta 1)



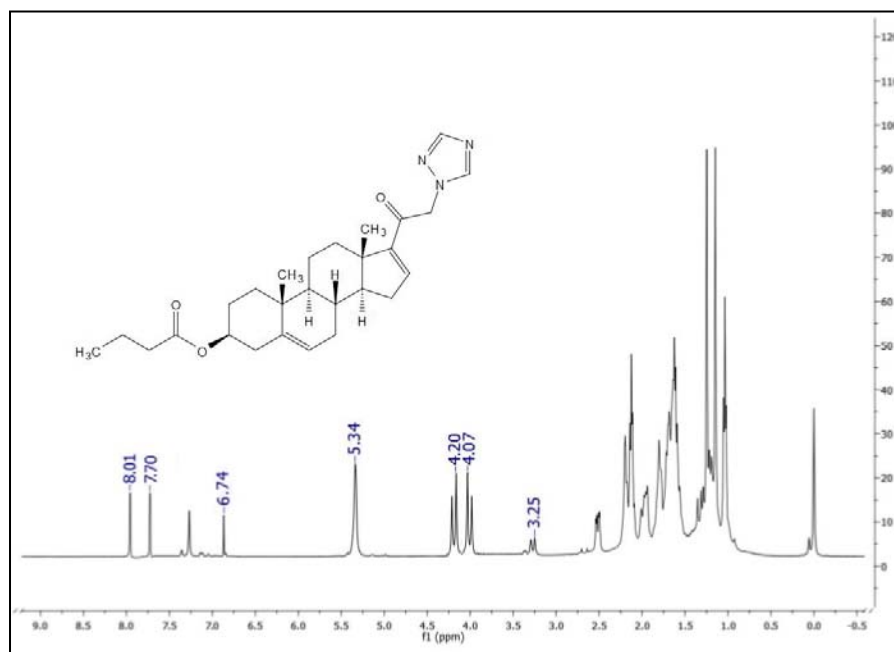
Espectro A.16. Espectro de RMN ^{13}C del acetato de 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8a en ruta 1)



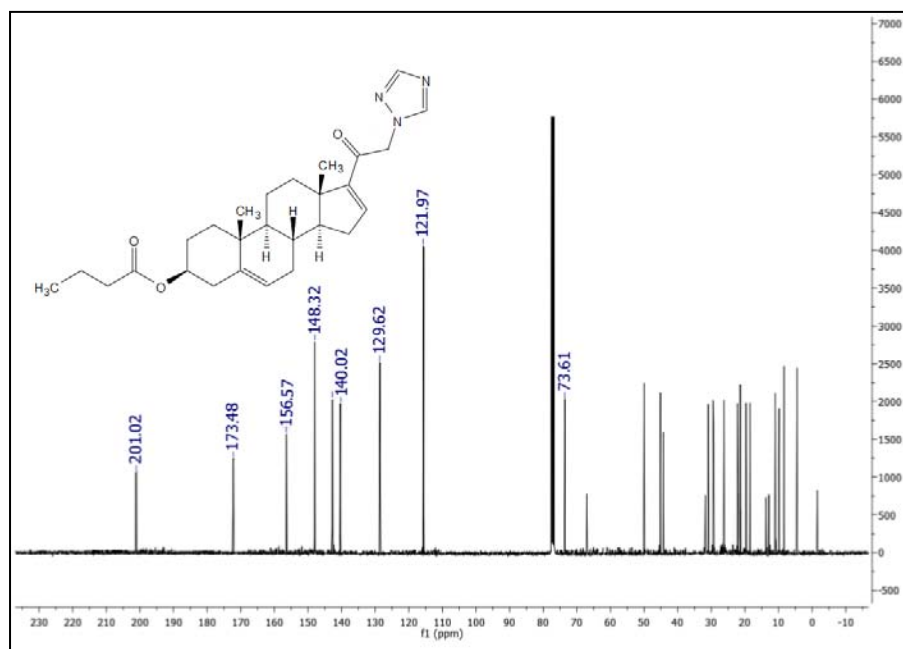
Espectro A.17. Espectro de RMN ^1H del propionato de 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8b en ruta 1)



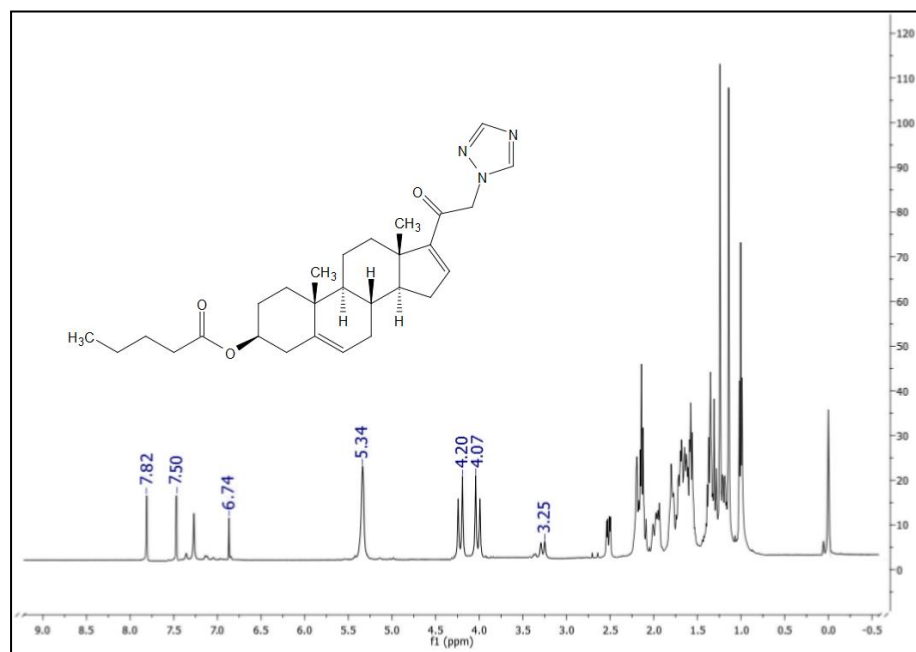
Espectro A.18. Espectro de RMN ^{13}C del propionato de 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8b en ruta 1)



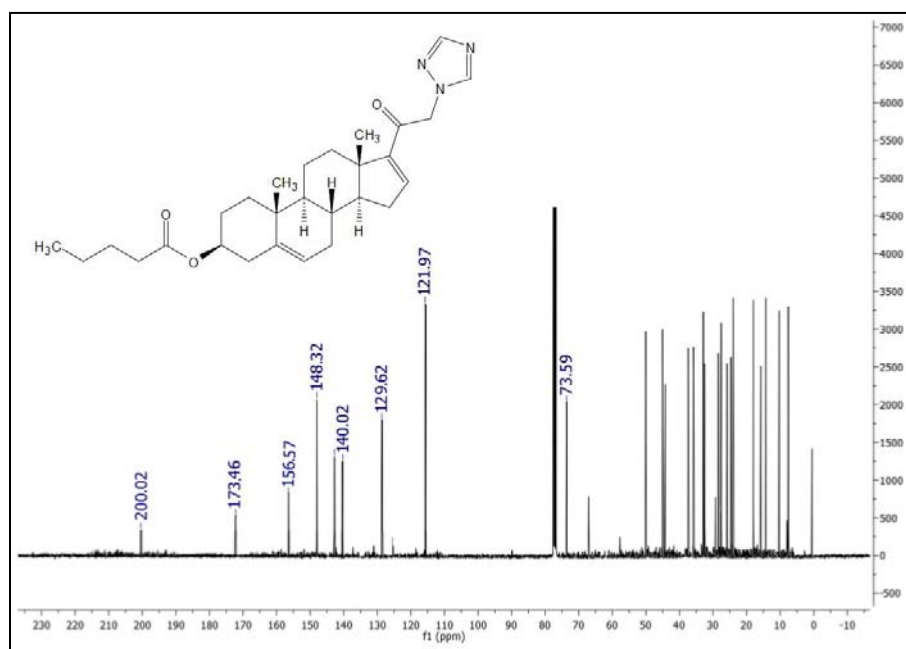
Espectro A.19. Espectro de RMN ^1H del butirato de 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8c en ruta 1)



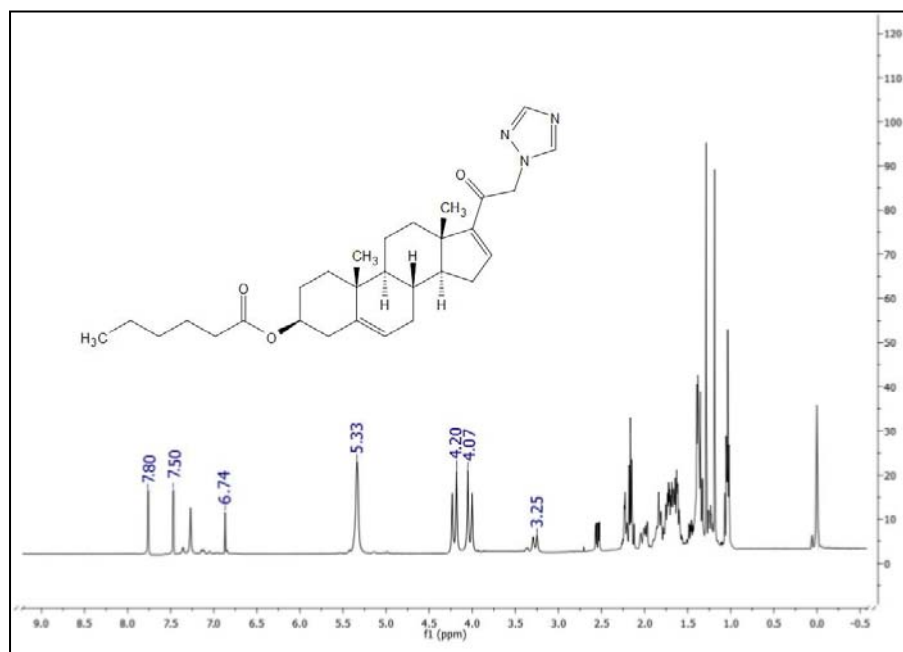
Espectro A.20. Espectro de RMN ^{13}C del butirato de 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8c en ruta 1)



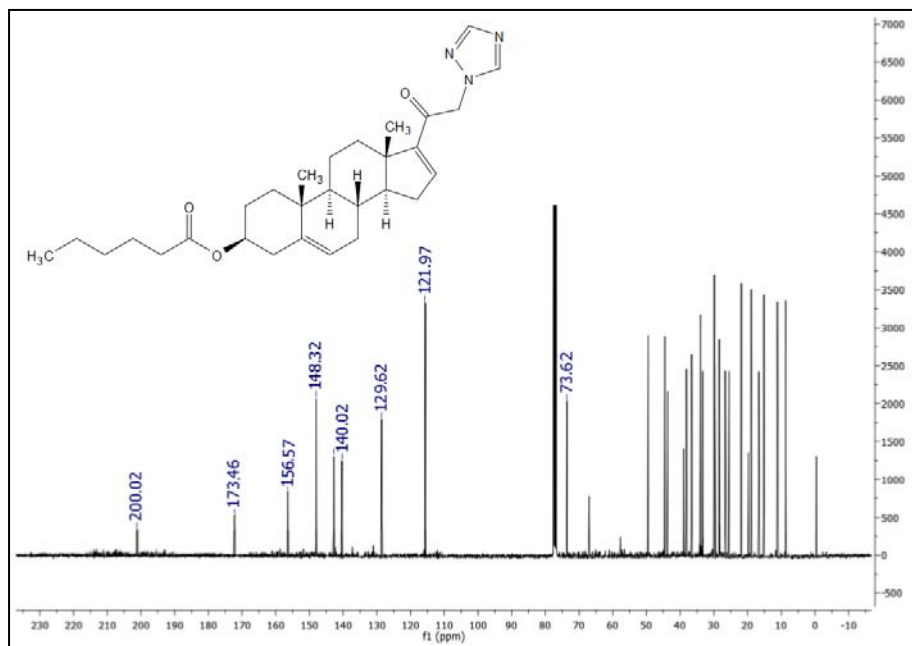
Espectro A.21. Espectro de RMN ¹H del pentanoato de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8d en ruta 1)



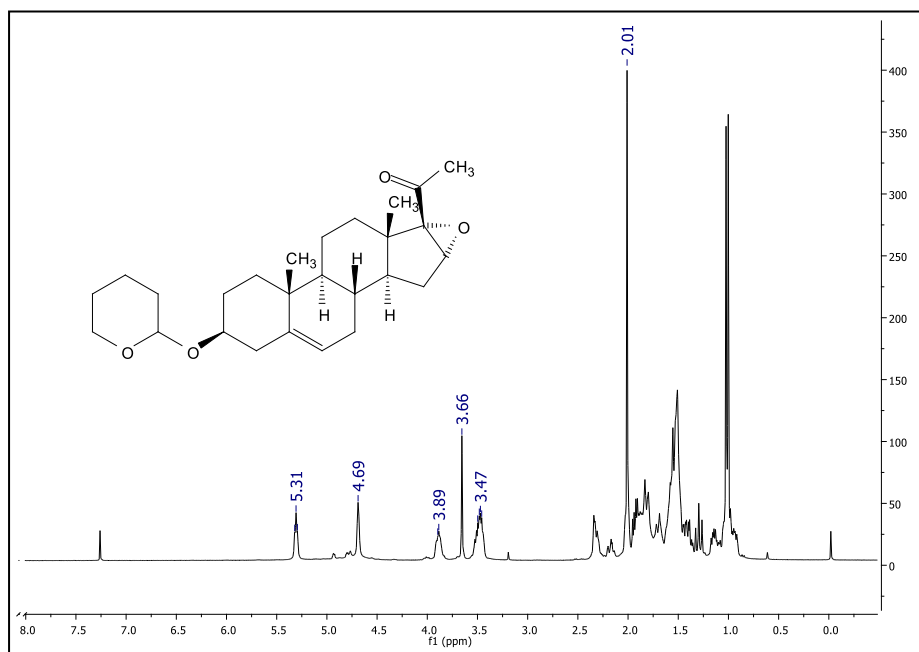
Espectro A.22. Espectro de RMN ¹³C del pentanoato de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8d en ruta 1)



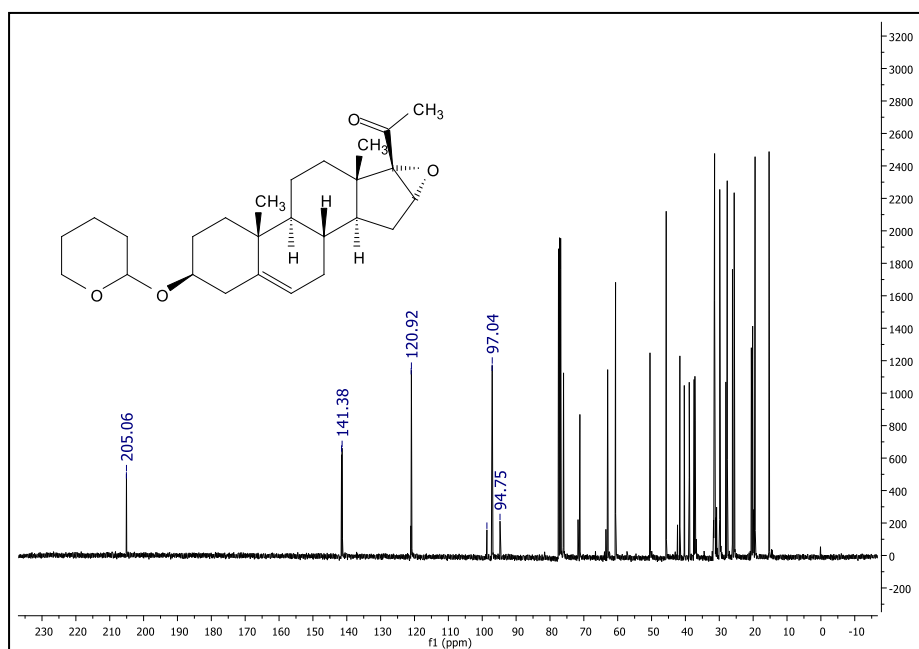
Espectro A.23. Espectro de RMN ^1H del hexanoato de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3 β -ilo (T8e en ruta 1)



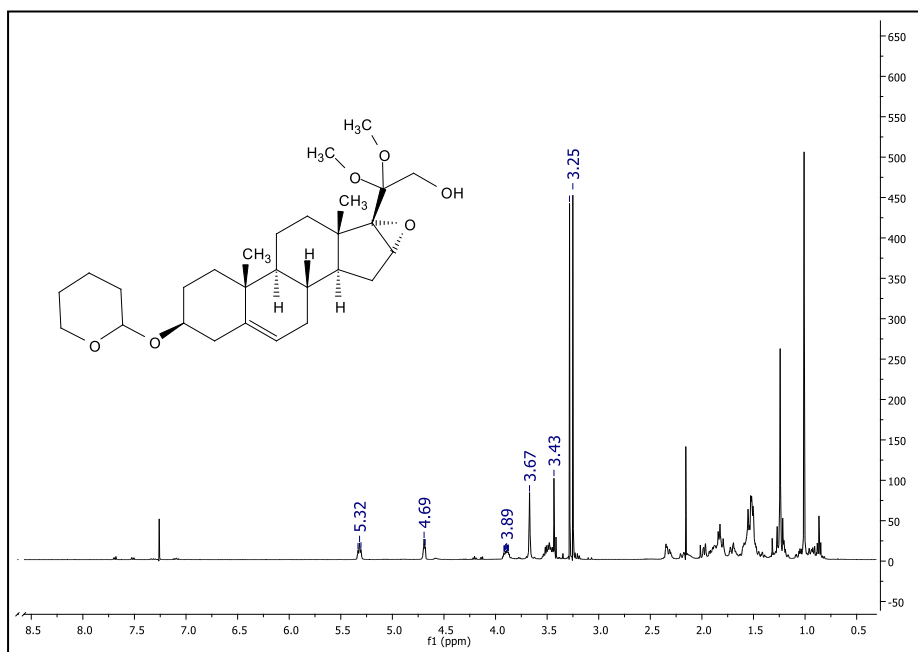
Espectro A.24. Espectro de RMN ^{13}C del hexanoato de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3 β -ilo (T8e en ruta 1)



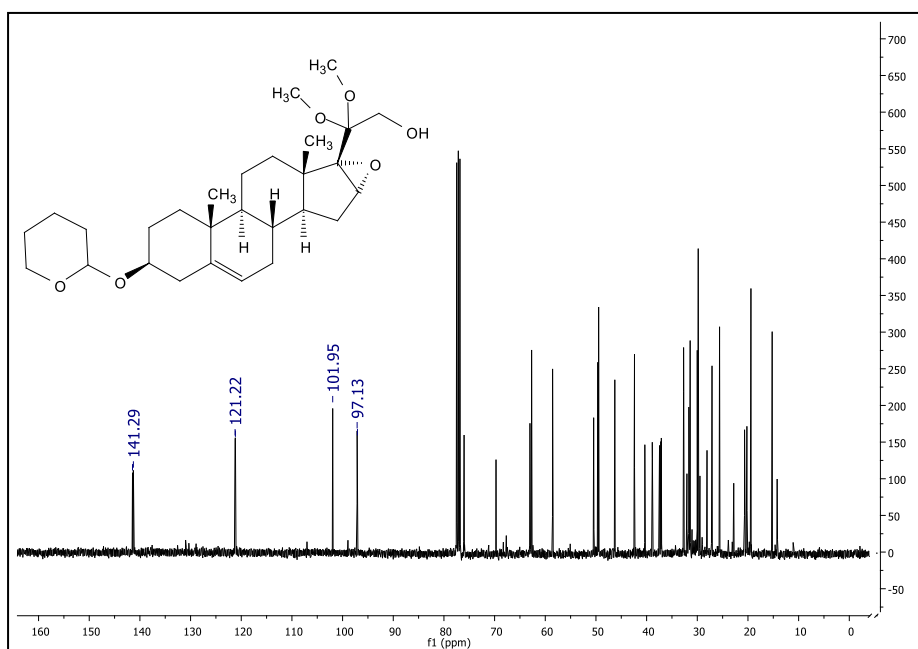
Espectro A.25. Espectro de RMN ^1H de 3 β -(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona (3 en ruta 2)



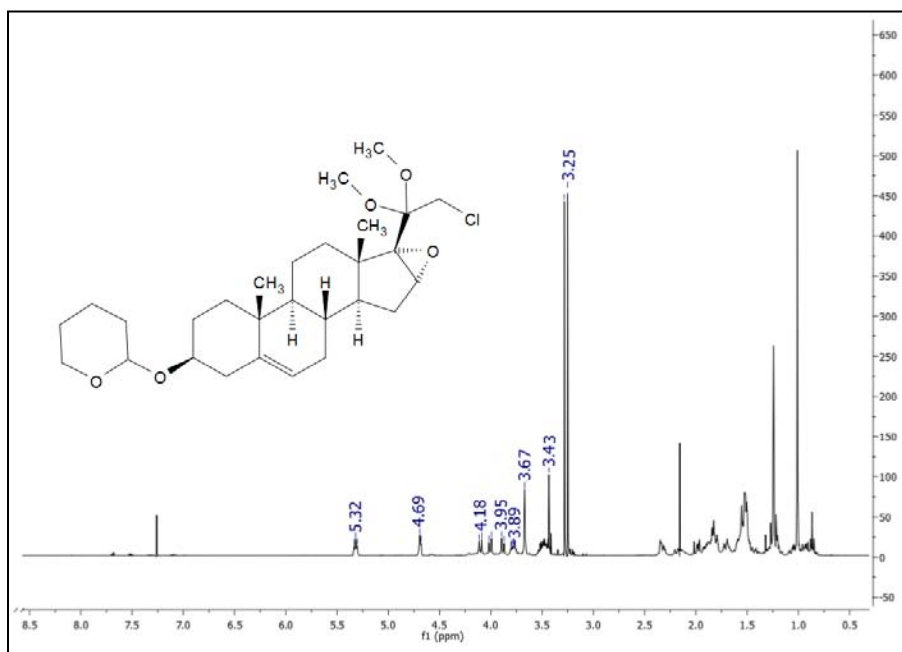
Espectro A.26. Espectro de RMN ^{13}C de 3 β -(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona (3 en ruta 2)



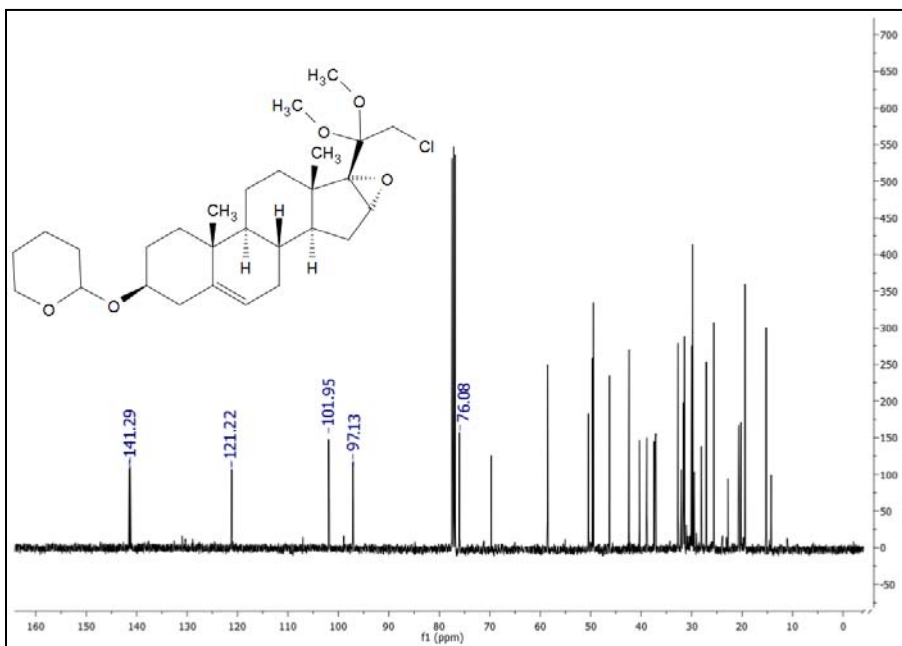
Espectro A.27. Espectro de RMN ¹H del 20,20-dimetoxi-3β-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)-16α,17α-epoxipregn-5-en-21-ol (4 en ruta 2)



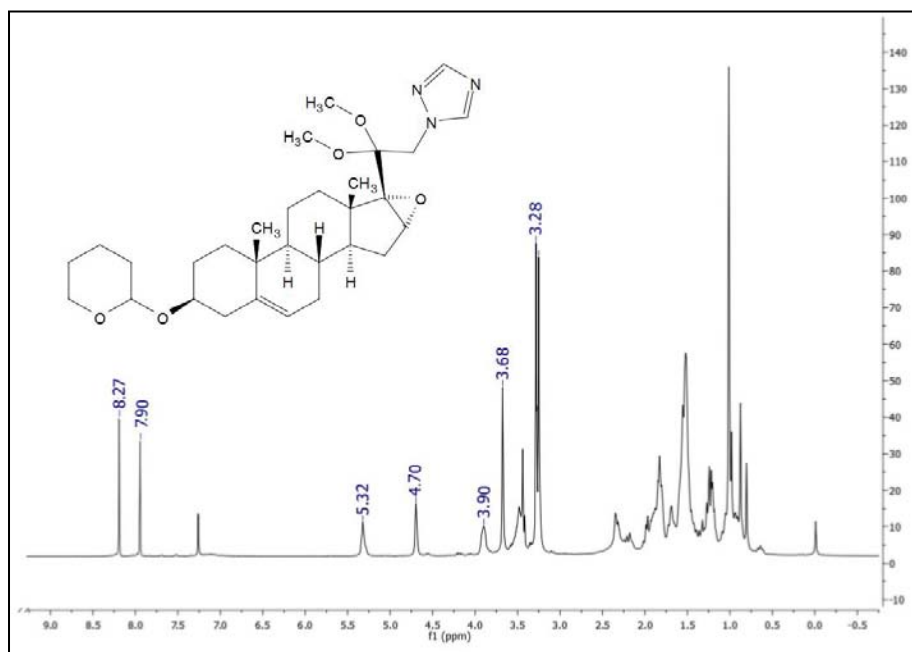
Espectro A.28. Espectro de RMN ¹³C del 20,20-dimetoxi-3β-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)-16α,17α-epoxipregn-5-en-21-ol (4 en ruta 2)



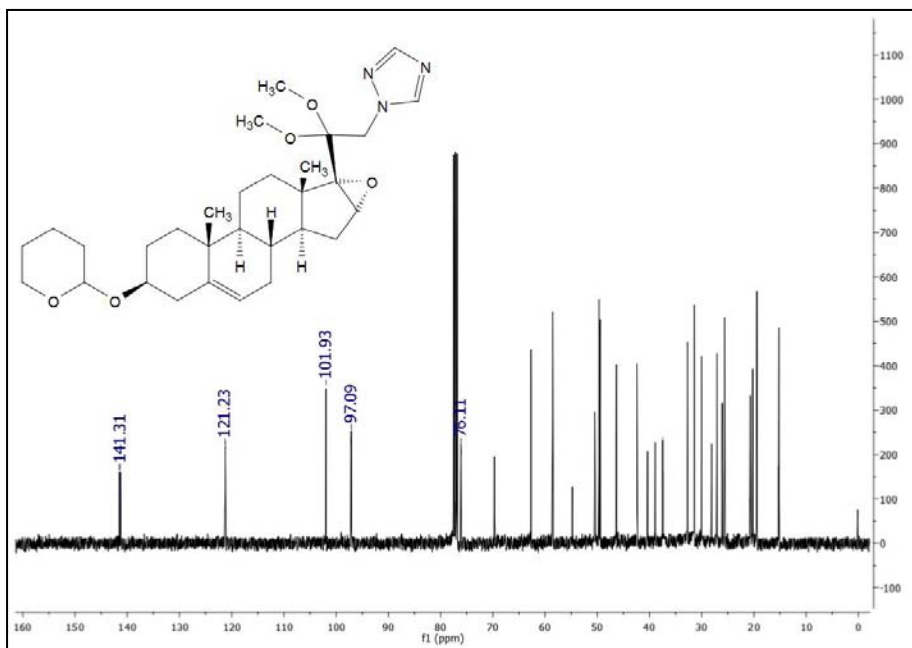
Espectro A.29. Espectro de RMN ¹H del 21-cloro-20,20-dimetoxi-3β-(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)-16α,17α-epoxipregn-5-eno (5 en ruta 2)



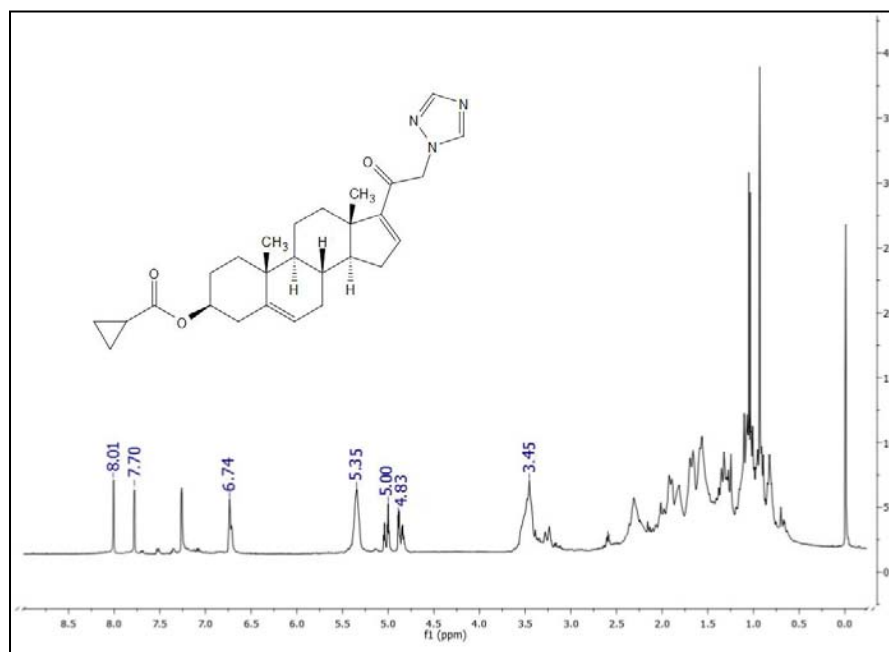
Espectro A.30. Espectro de RMN ¹³C del 21-cloro-20,20-dimetoxi-3β-(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)-16α,17α-epoxipregn-5-eno (5 en ruta 2)



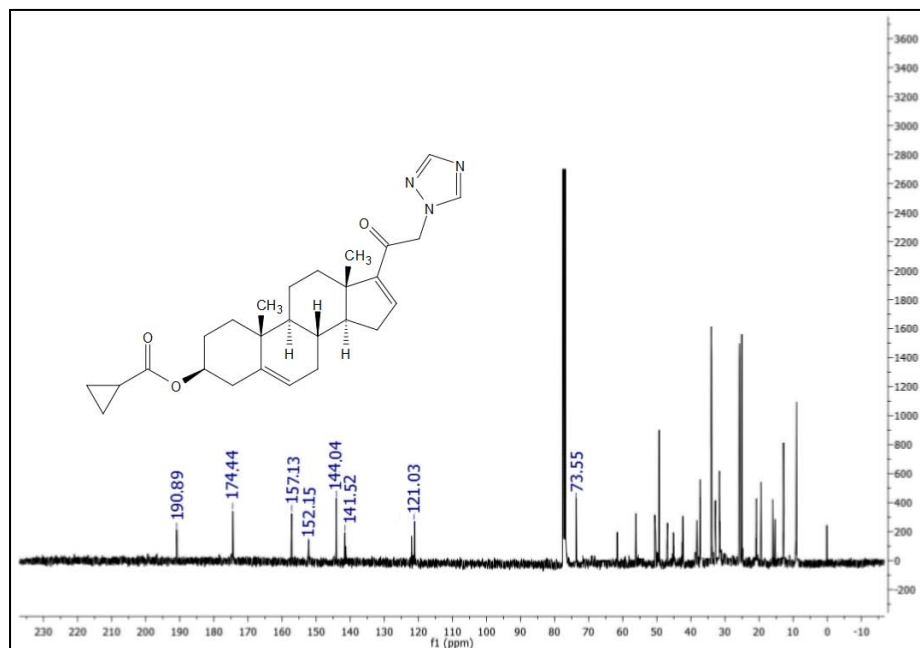
Espectro A.31. Espectro de RMN ¹H del 20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-eno (T6 en ruta 2)



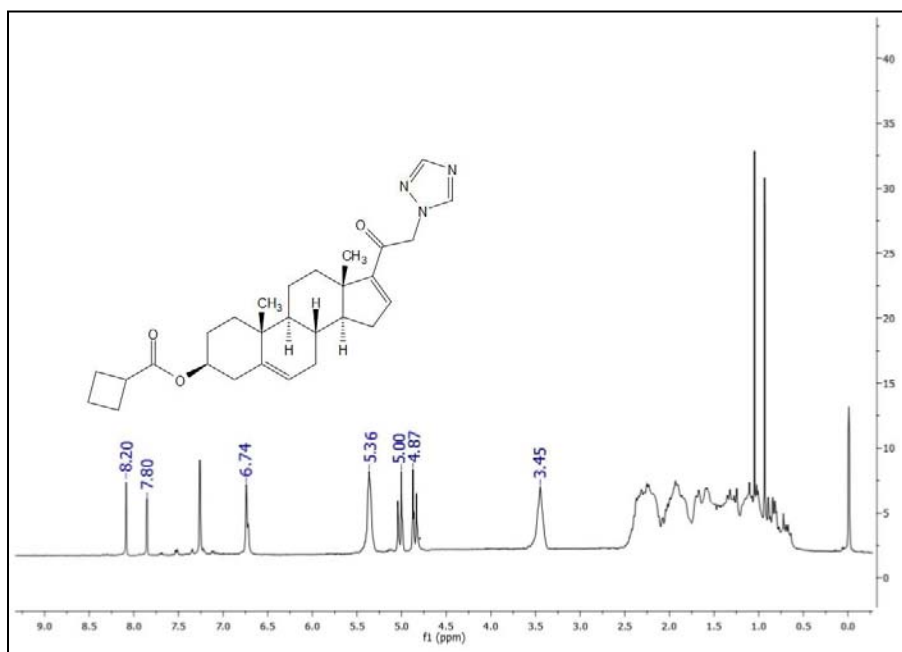
Espectro A.32. Espectro de RMN ¹³C del 20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregn-5-eno (T6 en ruta 2)



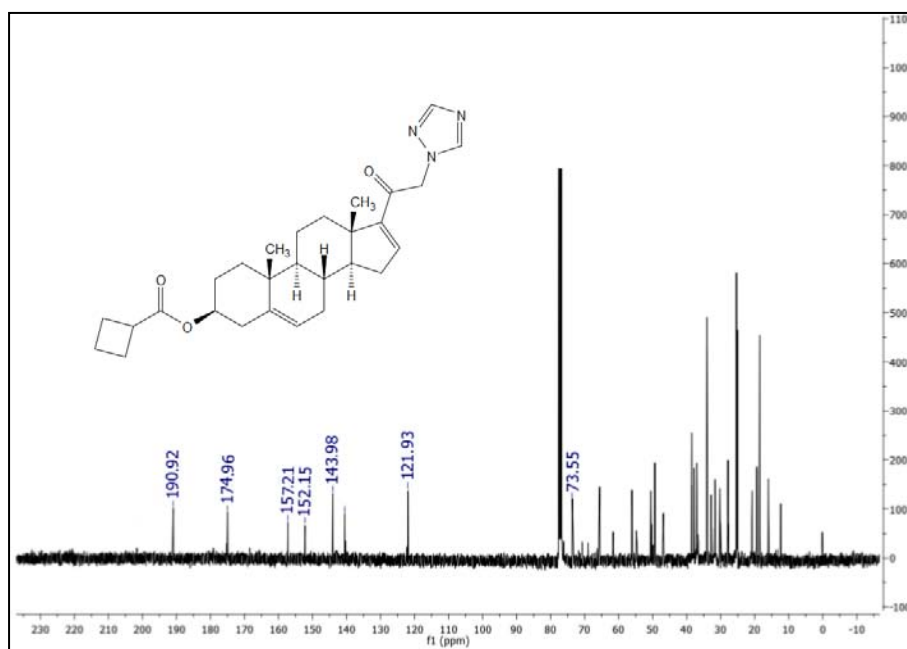
Espectro A.33. Espectro de RMN ¹H del ciclopropanocarboxilato de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8f)



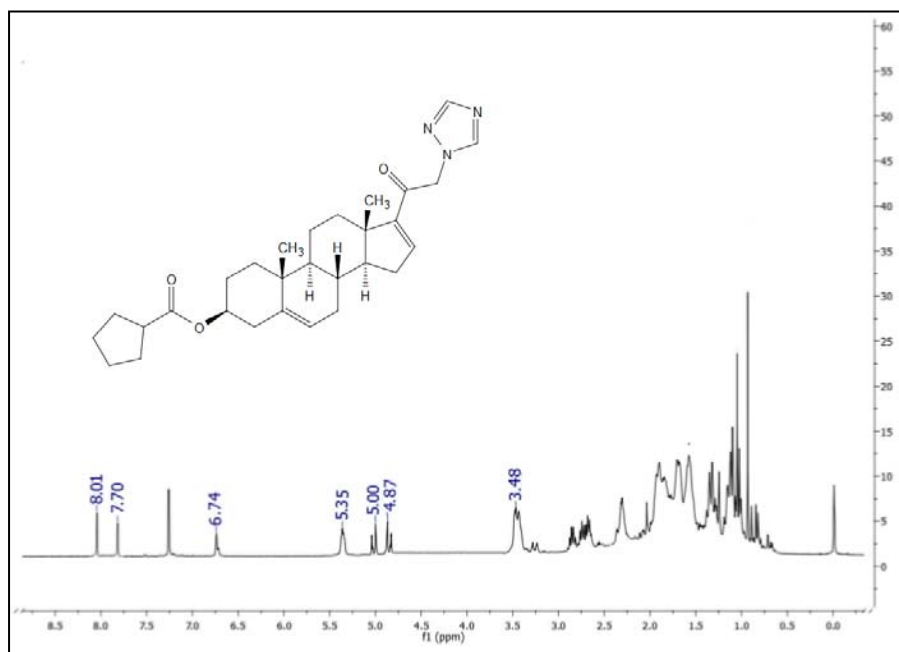
Espectro A.34. Espectro de RMN ¹³C del ciclopropanocarboxilato de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8f)



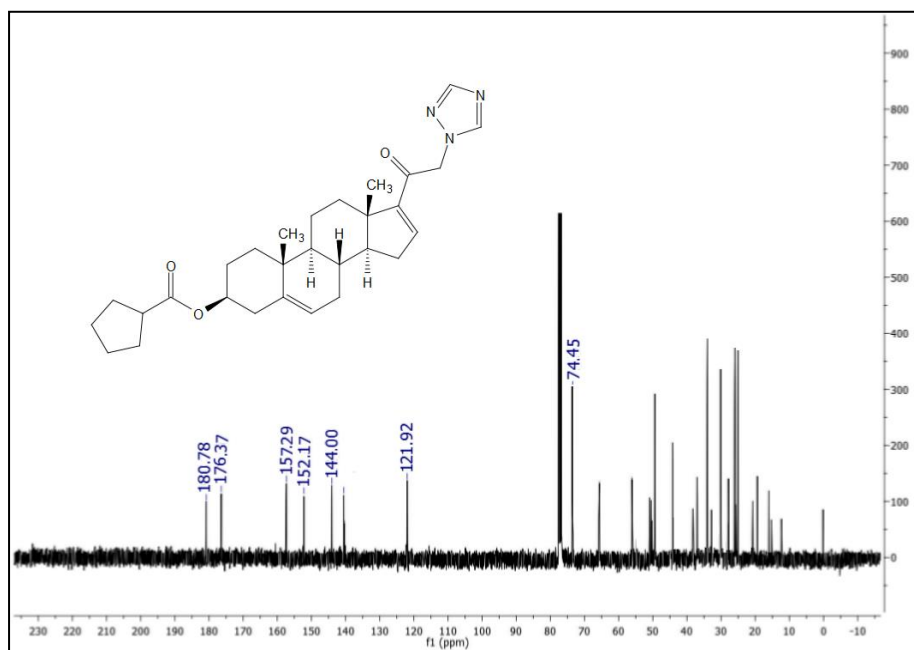
Espectro A.35. Espectro de RMN ¹H del ciclobutanocarboxilato de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8g)



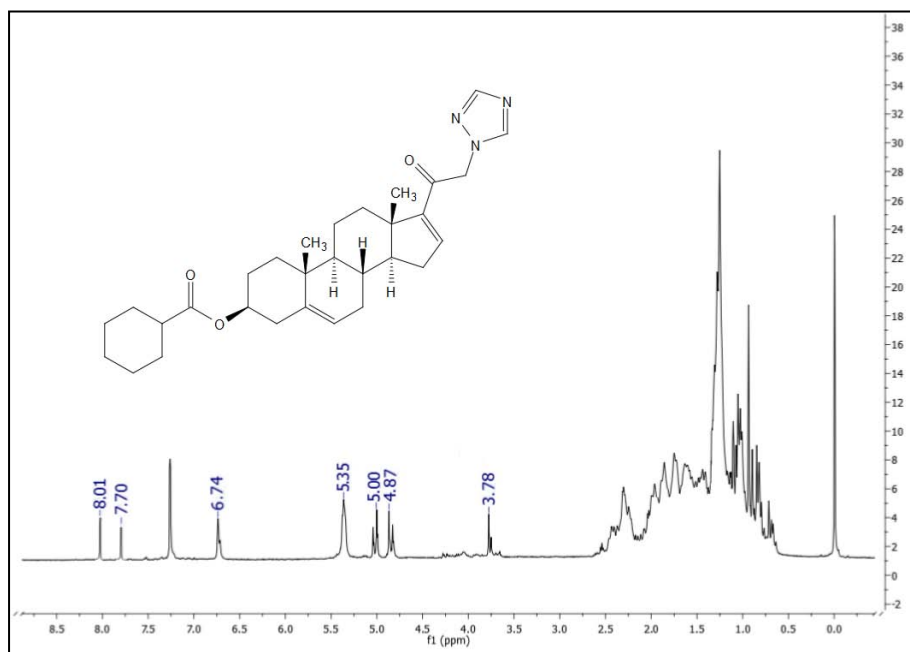
Espectro A.36. Espectro de RMN ¹³C del ciclobutanocarboxilato de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8g)



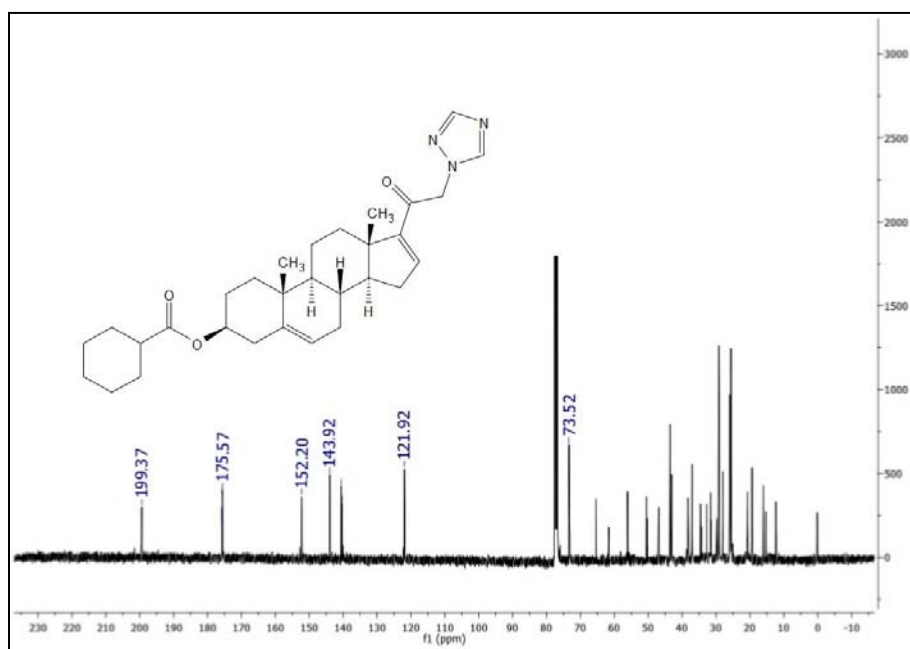
Espectro A.37. Espectro de RMN¹H del ciclopentanocarboxilato de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8h)



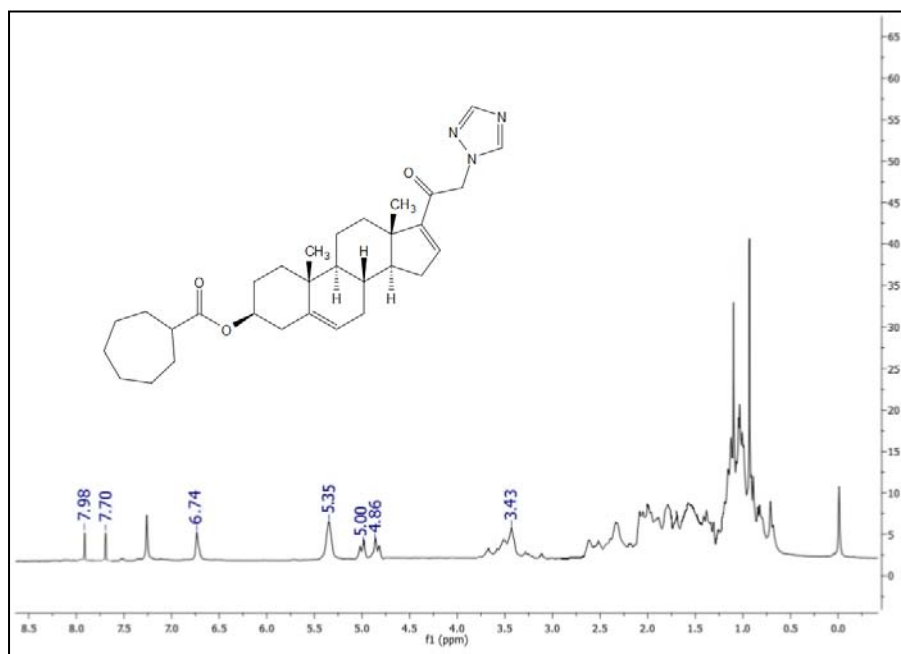
Espectro A.38. Espectro de RMN ¹³C del ciclopentanocarboxilato de 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3β-ilo (T8h)



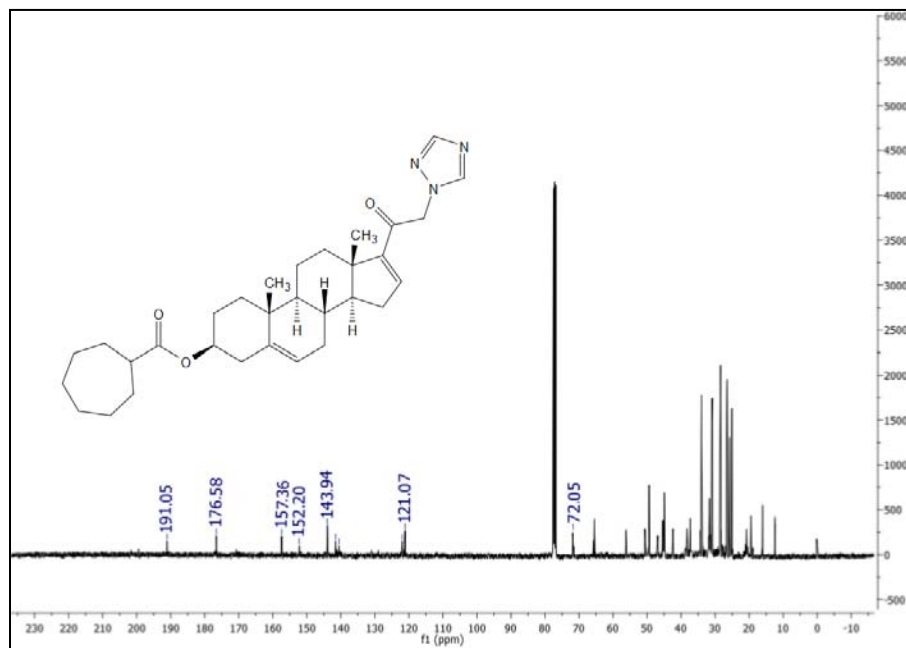
Espectro A.39. Espectro de RMN ^1H del ciclohexanocarboxilato de 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3 β -ilo (T8i)



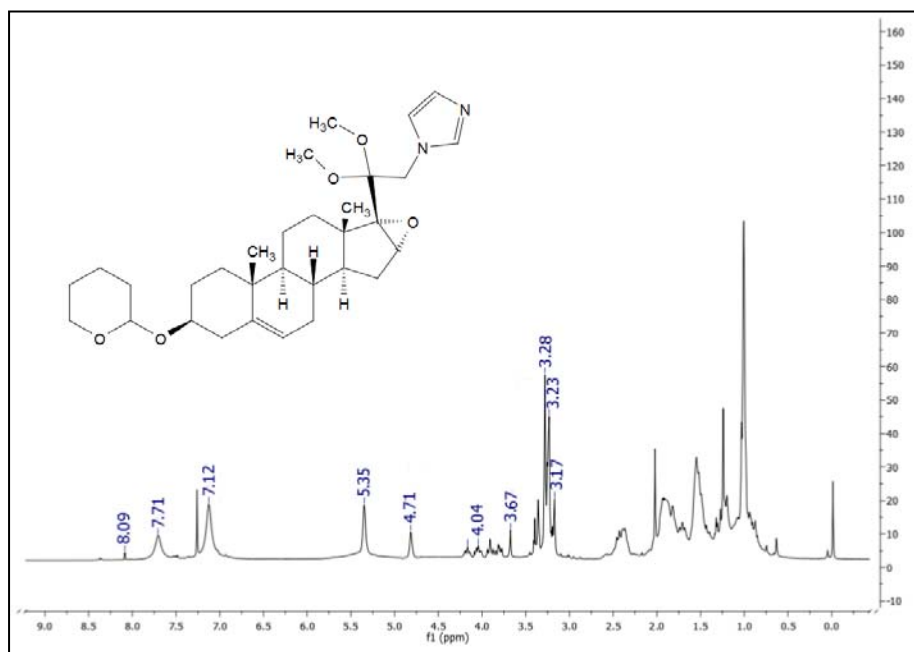
Espectro A.40. Espectro de RMN ^{13}C del ciclohexanocarboxilato de 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3 β -ilo (T8i)



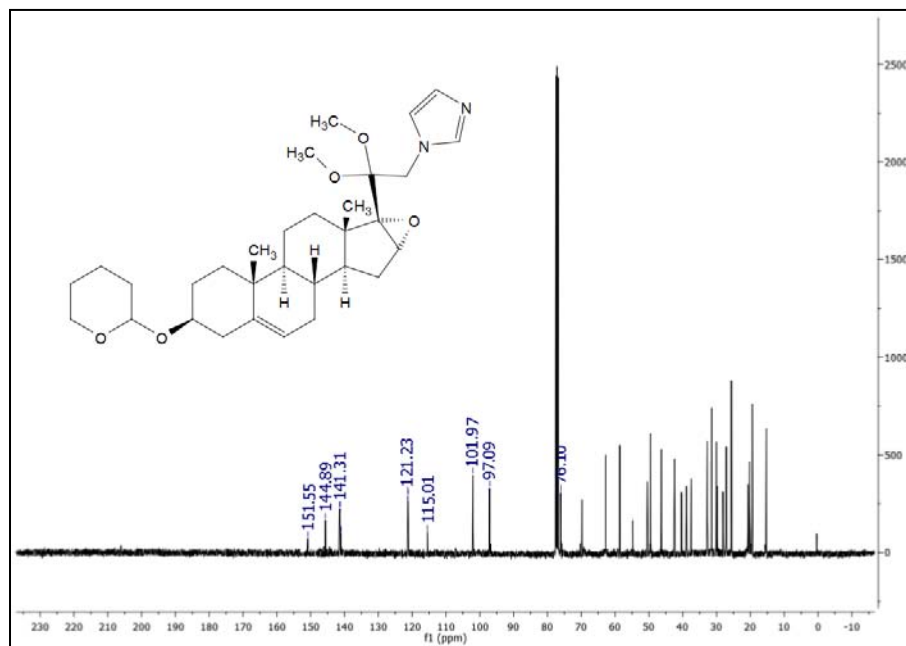
Espectro A.41. Espectro de RMN ^1H del cicloheptanocarboxilato de 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3 β -ilo (T8j)



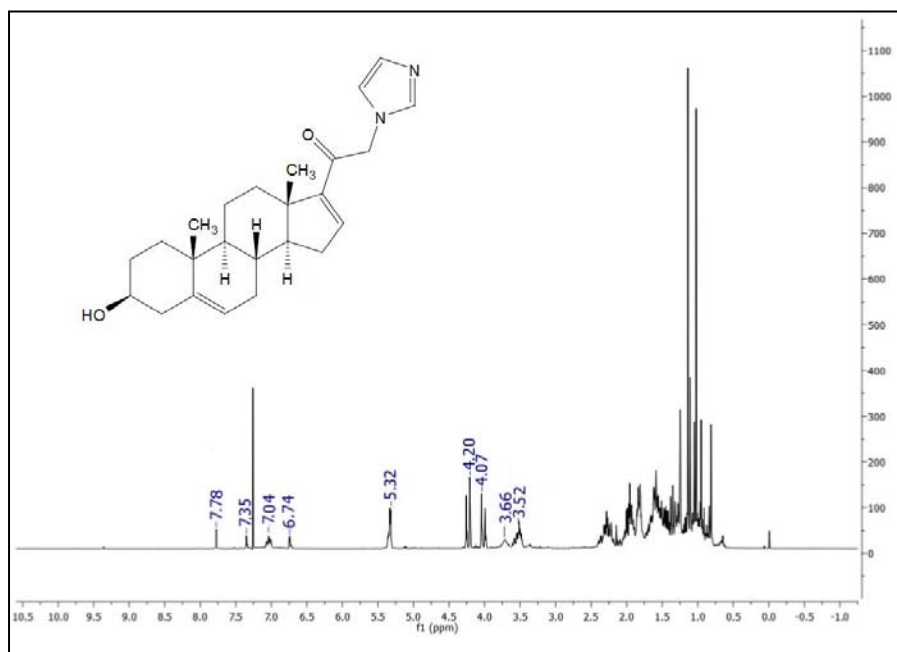
Espectro A.42. Espectro de RMN ^{13}C del cicloheptanocarboxilato de 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pregna-5,16-dien-3 β -ilo (T8j)



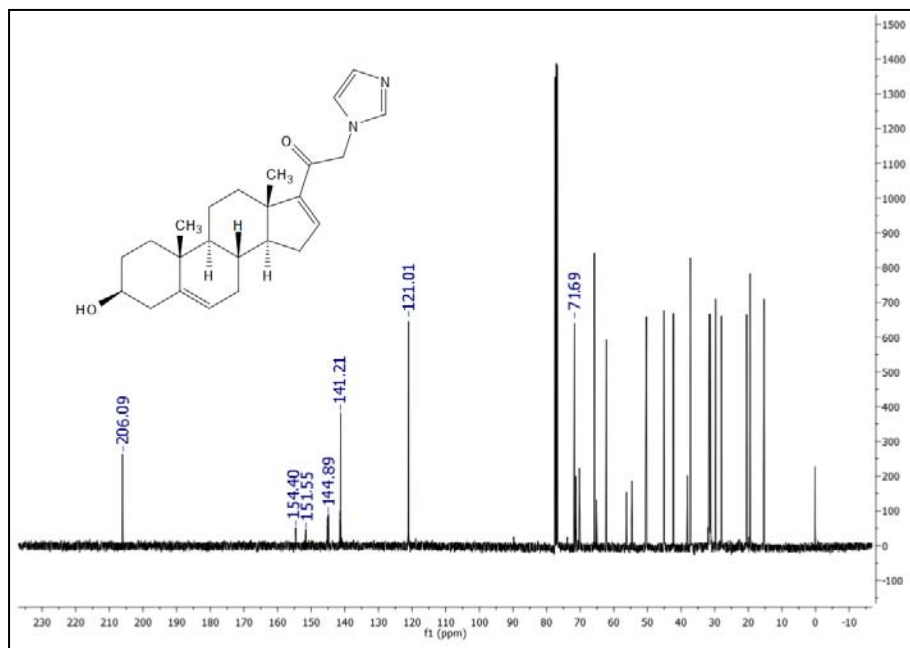
Espectro A.43. Espectro de RMN ¹H del 20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxy-3 β -(tetrahydro-2H-piran-2-iloxy)-21-(1H-imidazol-1-il)pregn-5-eno (16 en ruta 2)



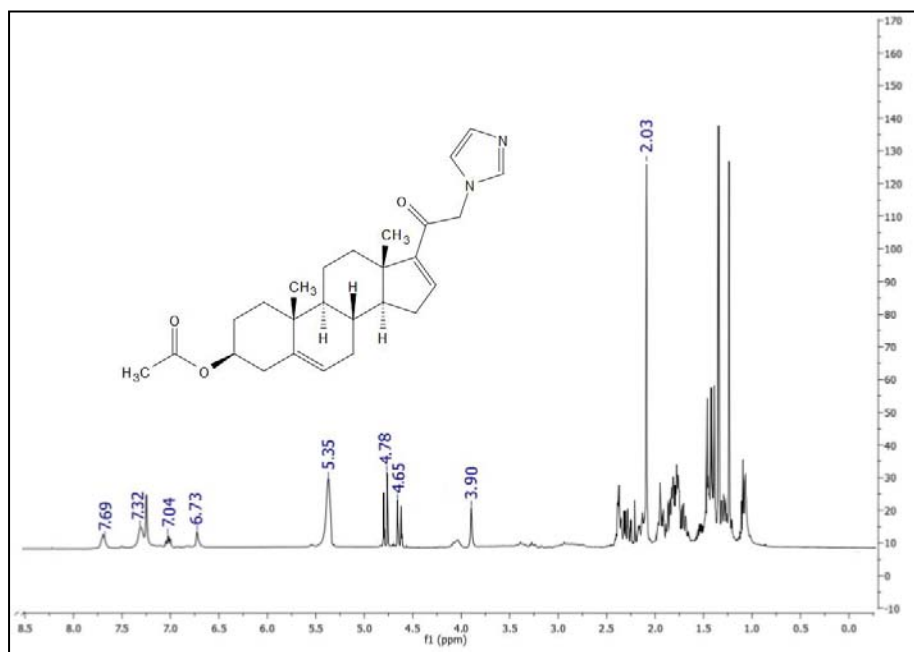
Espectro A.44. Espectro de RMN ¹³C del 20,20-dimetoxi-16 α ,17 α -epoxy-3 β -(tetrahydro-2H-piran-2-iloxy)-21-(1H-imidazol-1-il)pregn-5-eno (16 en ruta 2)



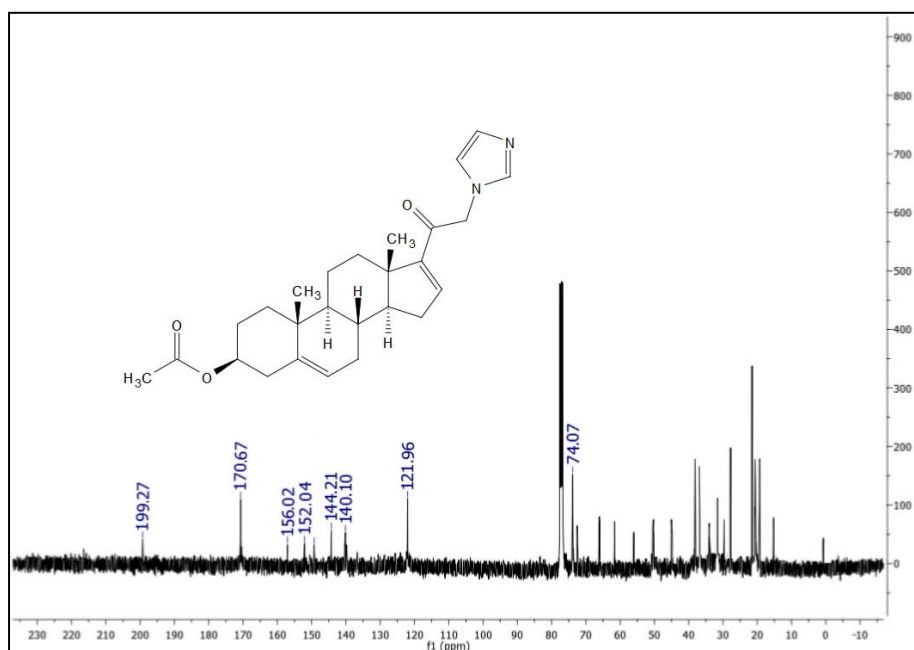
Espectro A.45. Espectro de RMN ¹H del 3β-hidroxi-21-(1*H*-imidazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (17 ruta 2)



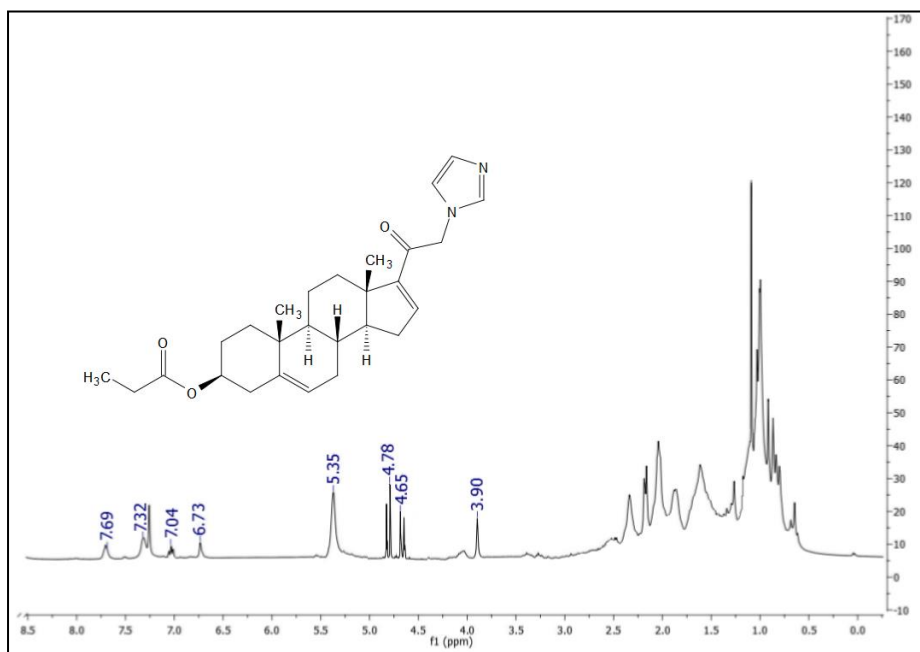
Espectro A.46. Espectro de RMN ¹³C del 3β-hidroxi-21-(1*H*-imidazol-1-il)pregna-5,16-dien-20-ona (17 ruta 2)



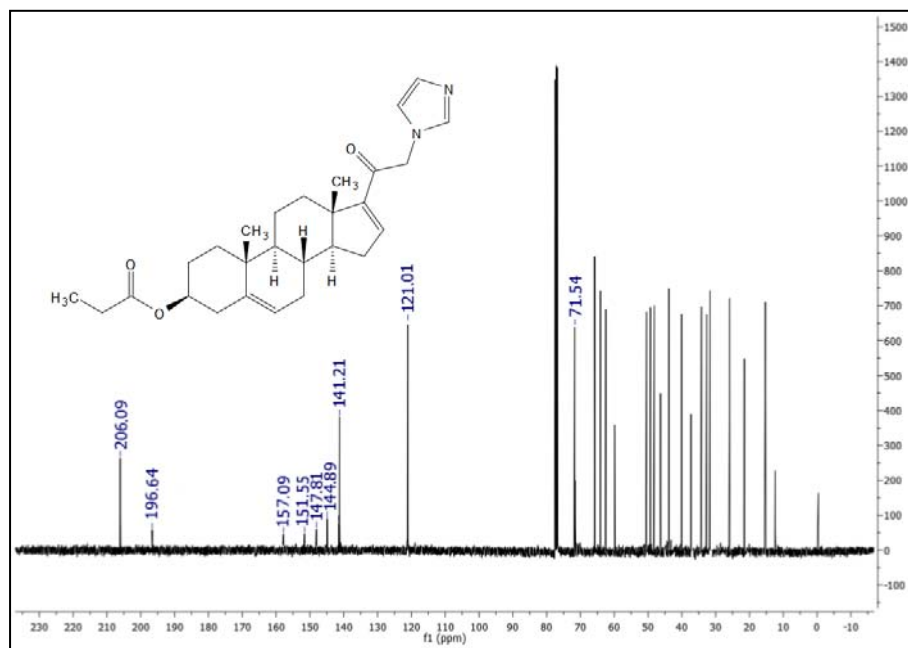
Espectro A.47. Espectro de RMN ¹H del acetato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (18a)



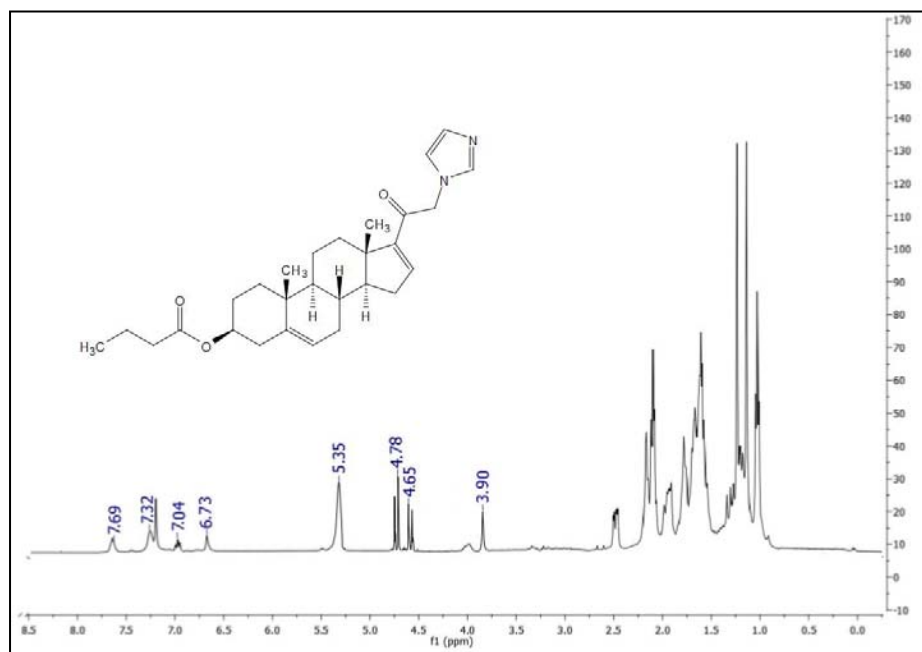
Espectro A.48. Espectro de RMN ¹³C del acetato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (18a)



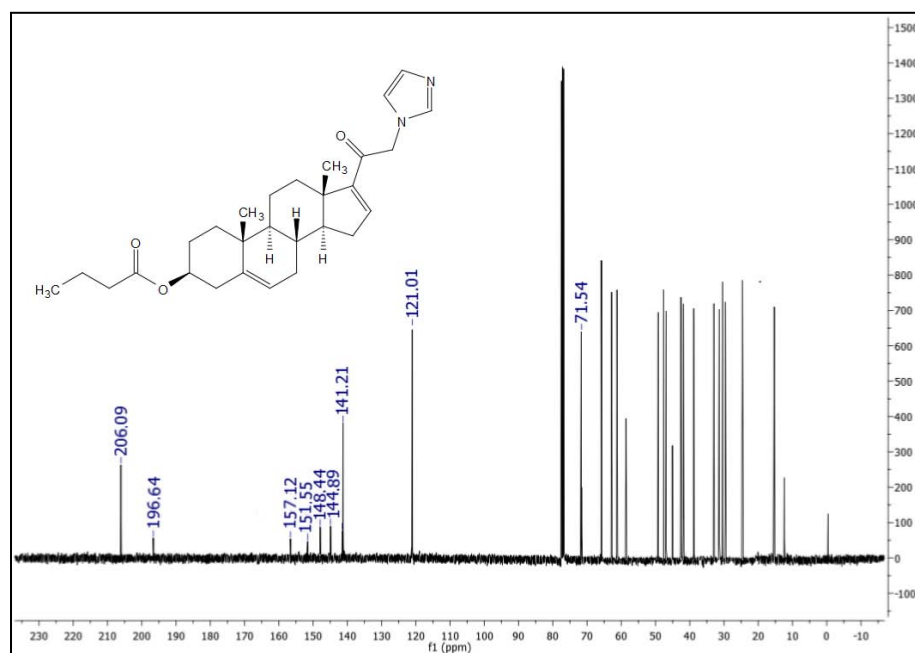
Espectro A.49. Espectro de RMN ¹H del propionato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (I8b)



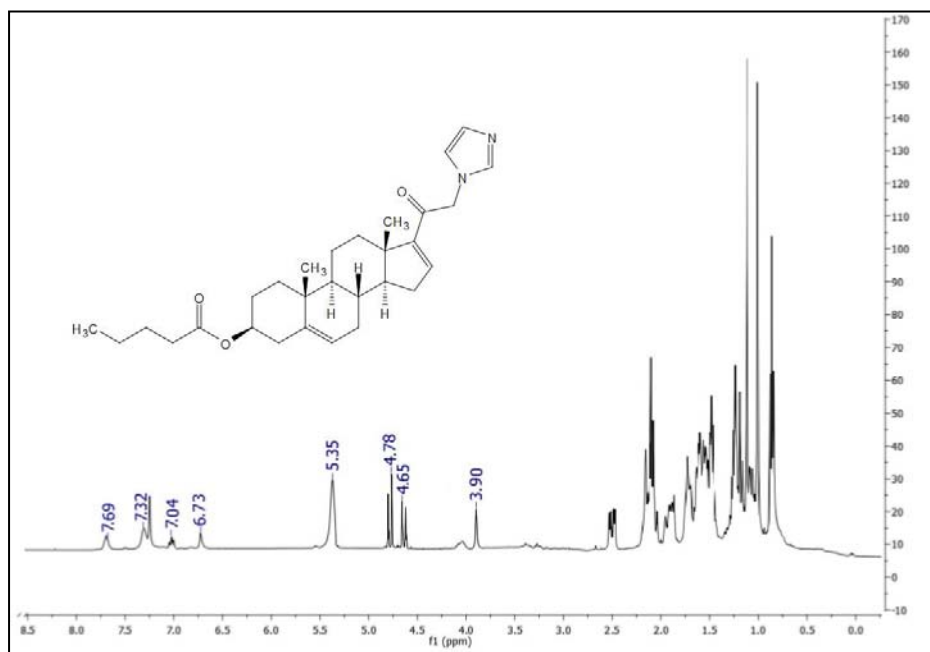
Espectro A.50. Espectro de RMN ¹³C del propionato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (I8b)



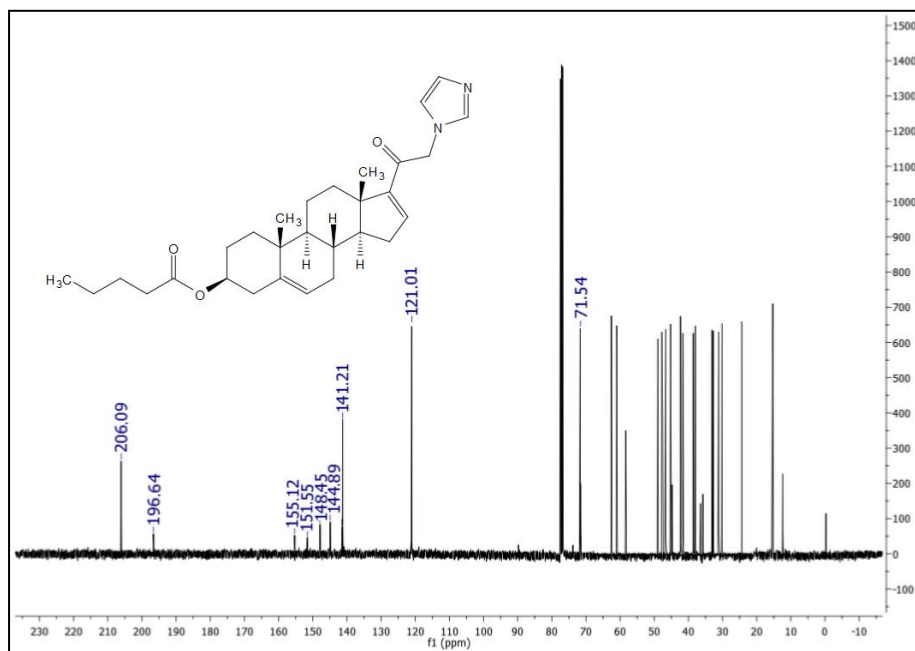
Espectro A.51. Espectro de RMN ¹H del butirato de 21-(1H-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (I8c)



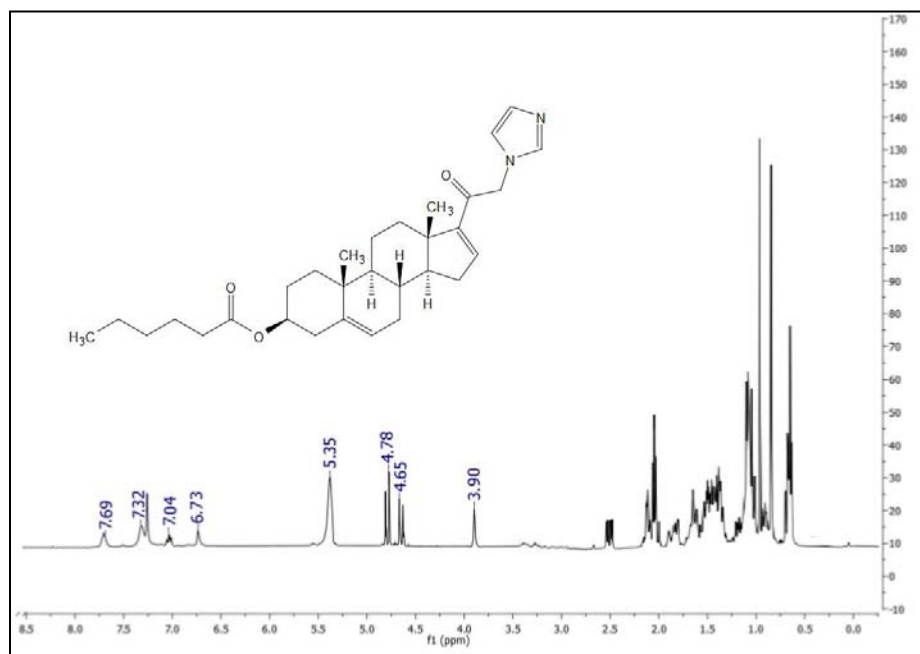
Espectro A.52. Espectro de RMN ¹³C del butirato de 21-(1H-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (I8c)



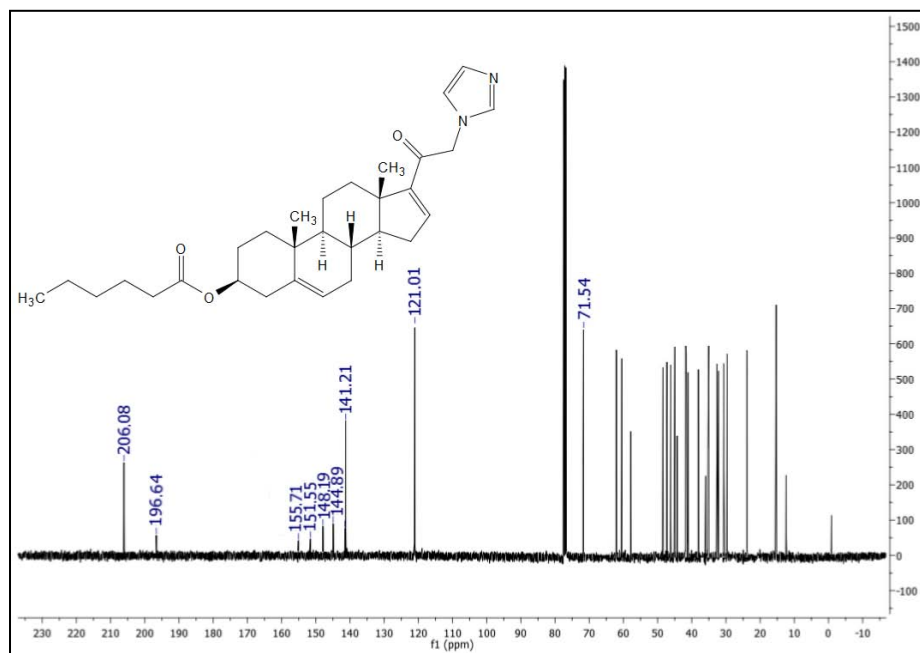
Espectro A.53. Espectro de RMN ¹H del pentanoato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (I8d)



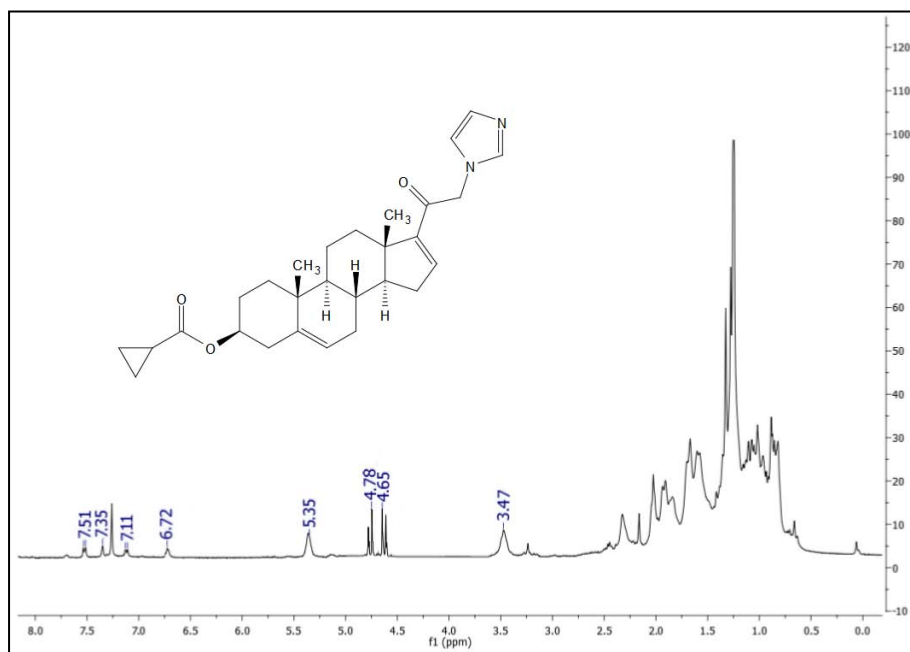
Espectro A.54. Espectro de RMN ¹³C del pentanoato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (I8d)



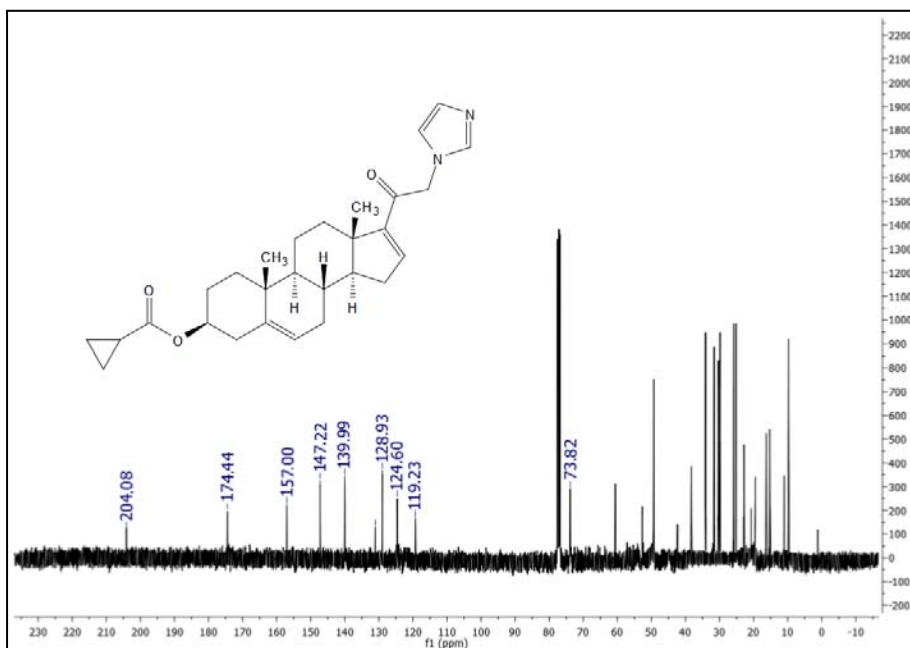
Espectro A.55. Espectro de RMN ¹H del hexanoato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (I8e)



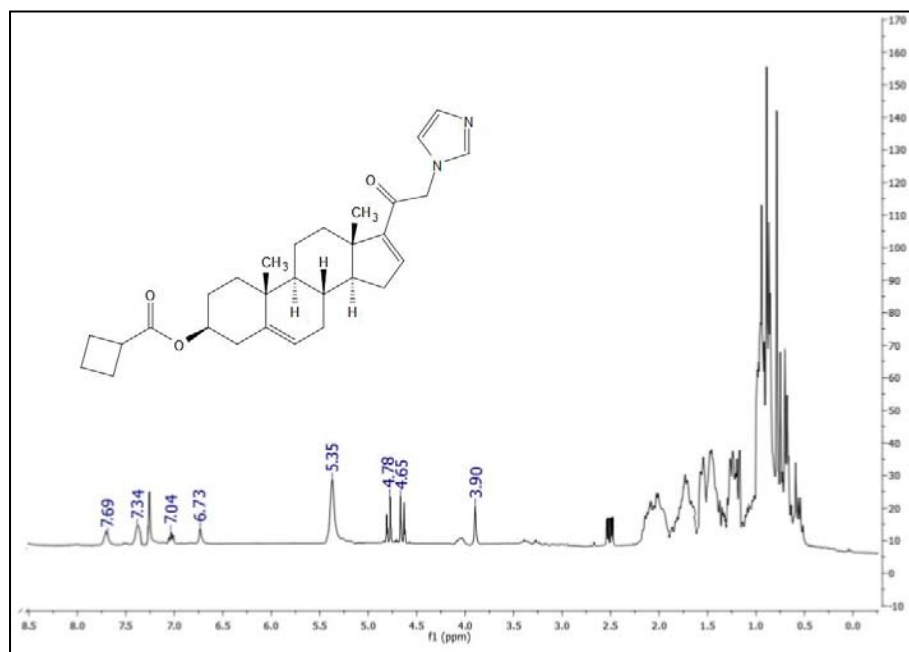
Espectro A.56. Espectro de RMN ¹³C del hexanoato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (I8e)



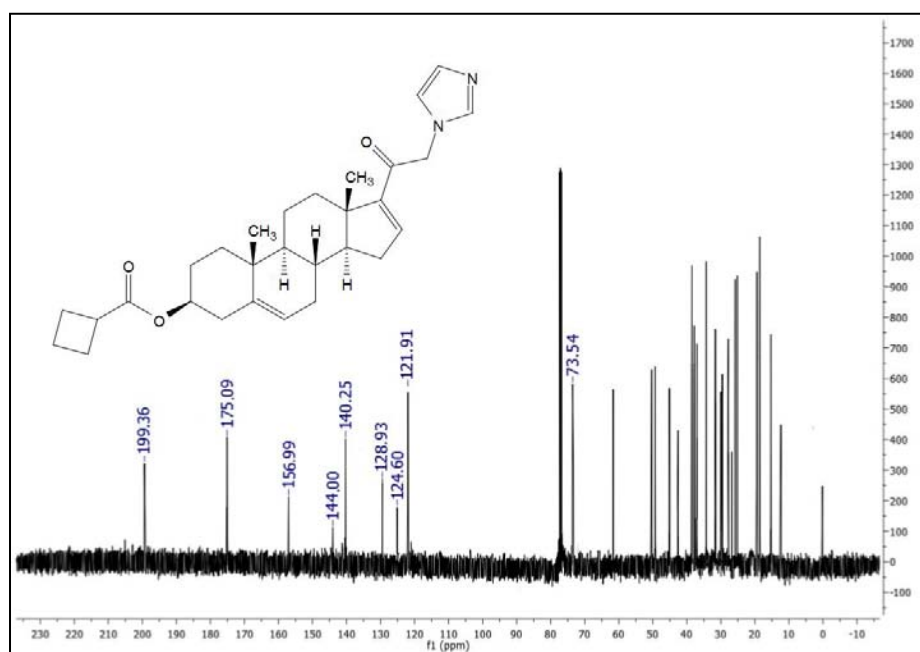
Espectro A.57. Espectro de RMN ¹H del ciclopropanocarboxilato de 21-(1H-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (18f)



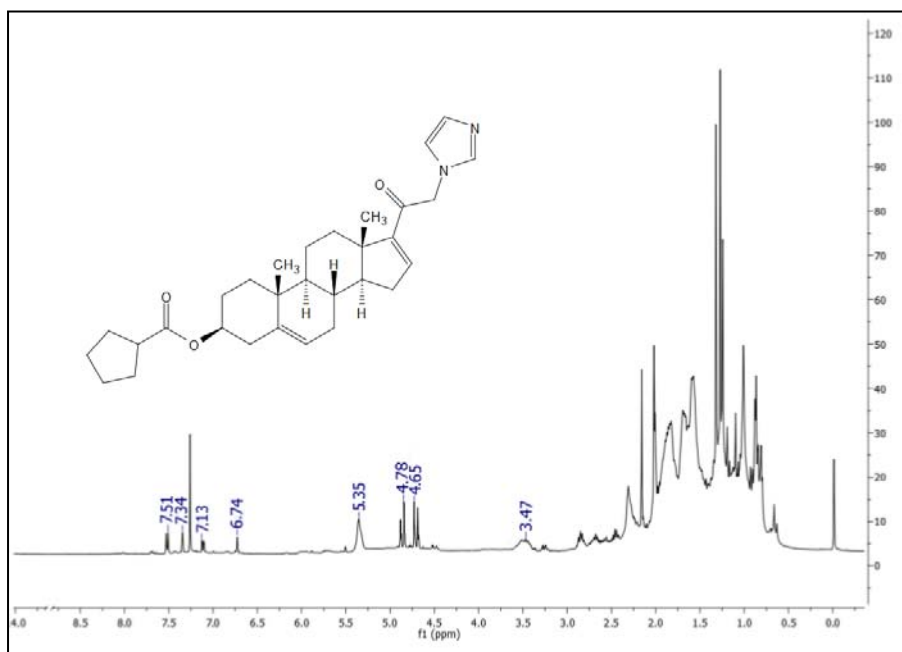
Espectro A.58. Espectro de RMN ¹³C del ciclopropanocarboxilato de 21-(1H-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (18f)



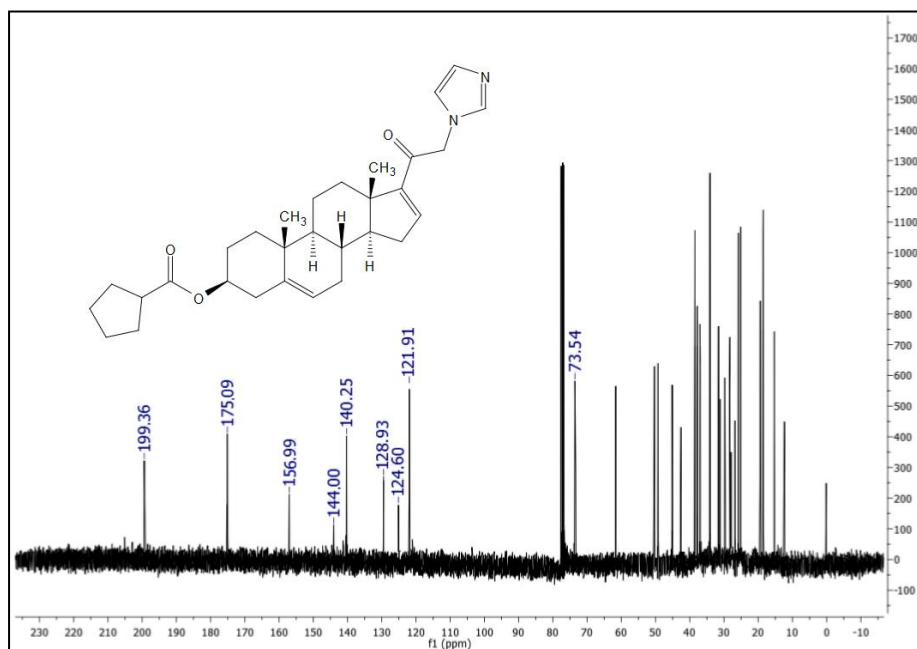
Espectro A.59. Espectro de RMN ¹H del ciclobutanocarboxilato de 21-(1H-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (18g)



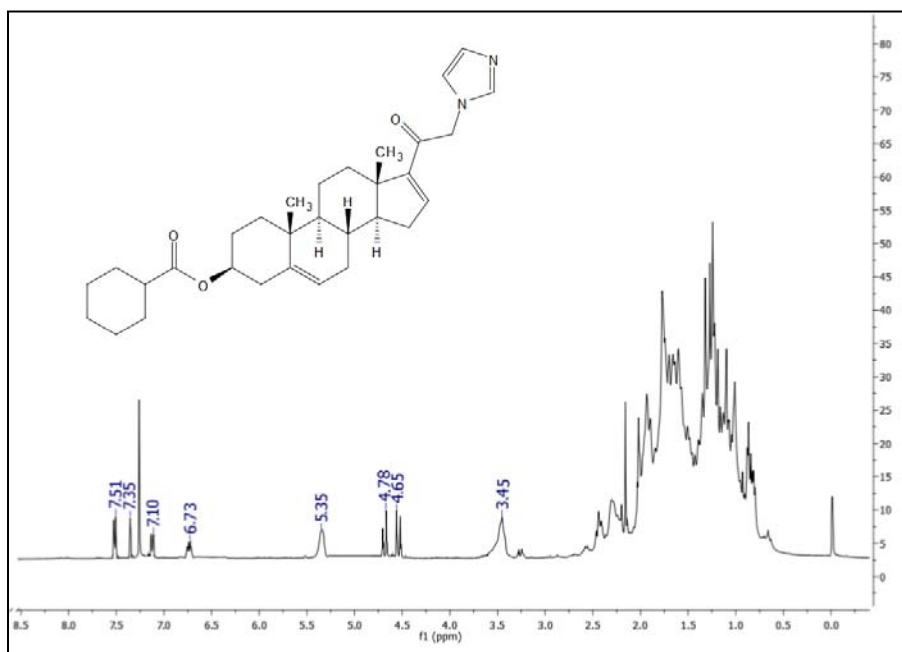
Espectro A.60. Espectro de RMN ¹³C del ciclobutanocarboxilato de 21-(1H-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (18g)



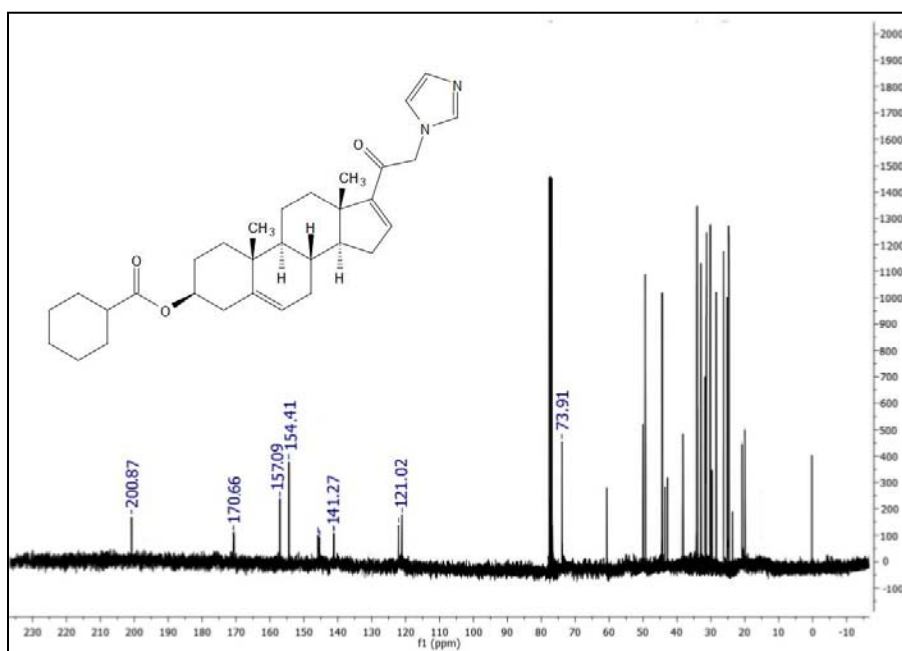
Espectro A.61. Espectro de RMN ¹H del ciclopentanocarboxilato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (I8h)



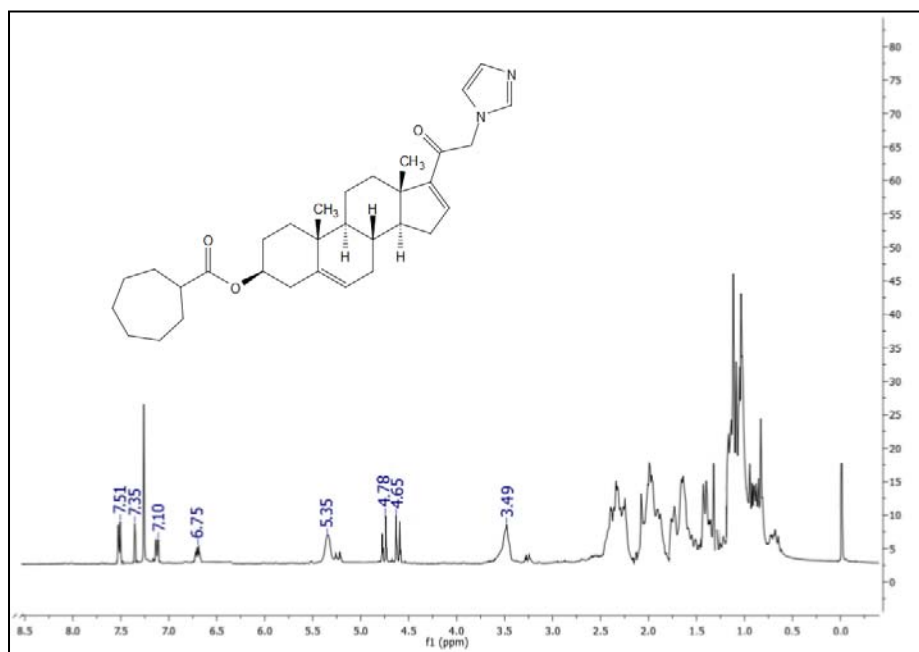
Espectro A.62. Espectro de RMN ¹³C del ciclopentanocarboxilato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (I8h)



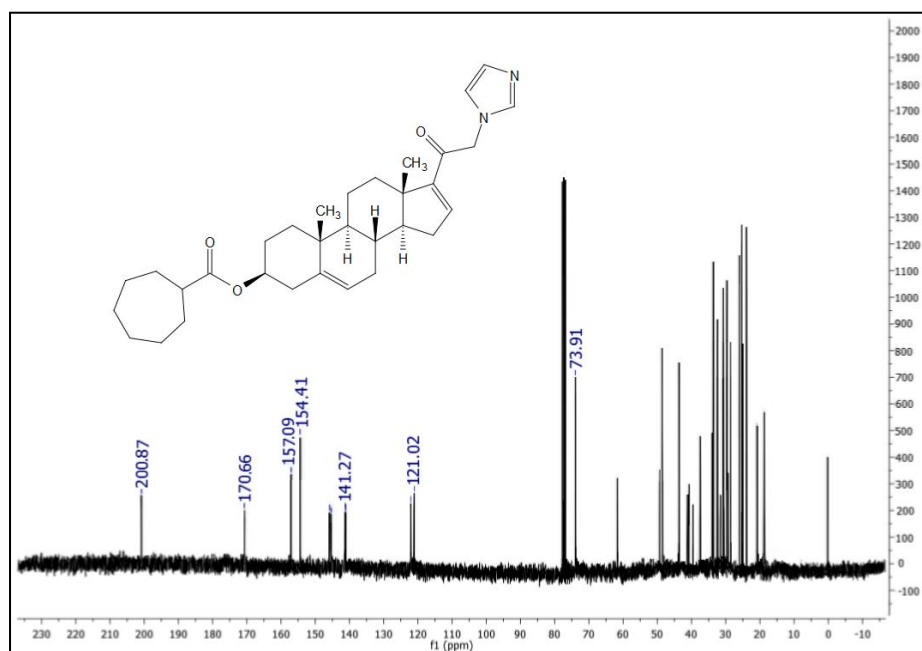
Espectro A.63. Espectro de RMN ^1H del ciclohexanocarboxilato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -ilo (I8i)



Espectro A.64. RMN de ^{13}C del ciclohexanocarboxilato de 21-(1*H*-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -ilo (I8i)



Espectro A.65. Espectro de RMN ¹H del cicloheptanocarboxilato de 21-(1H-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (18j)



Espectro A.66. Espectro de RMN ¹³C del Cicloheptanocarboxilato de 21-(1H-imidazol-1-il)-20-oxopregna-5,16-dien-3β-ilo (18j)

PUBLICACIONES

Bioorganic & Medicinal Chemistry 23 (2015) 7535–7542



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Synthesis and activity of novel 16-dehydropregnenolone acetate derivatives as inhibitors of type 1 5 α -reductase and on cancer cell line SK-LU-1



Aylin Viviana Silva-Ortiz^a, Eugene Bratoeff^{e,†}, Teresa Ramírez-Apan^b, Yvonne Heuze^c, Araceli Sánchez^c, Juan Soriano^d, Marisa Cabeza^{c,*}

^aDepartamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Copilco Universidad, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Distrito Federal, México D.F., Mexico

^bInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Copilco Universidad, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Distrito Federal, México D.F., Mexico

^cDepartamento de Sistemas Biológicos y de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960 Ciudad de México, México D.F. C.P. 04960, Mexico

^dDepartamento de Patología, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, México D.F., Mexico

^eFaculty of Chemistry, Department of Pharmacy (Departamento de Farmacia), National Autonomous University of Mexico in Mexico City (Universidad Nacional Autónoma de México), Mexico

Article history:

Received 26 August 2015

Revised 30 October 2015

Accepted 31 October 2015

Available online 4 November 2015

Keywords:

Synthesis of derivatives

dehydropregnenolone

5 α -Reductase 1 inhibitors

Antiproliferative activity on SKLU-1 cells

Testosterone (T) plays a crucial role in prostate growth. In androgen-dependent tissues T is reduced to dihydrotestosterone (DHT) because of the presence of the 5 α -reductase enzyme. This androgen is more active than T, since it has a higher affinity for the androgen receptor (AR). When this mechanism is altered, androgen-dependent diseases, including prostate cancer, could result.

The aim of this study was to synthesize several 16-dehydropregnenolone acetate derivatives containing a triazole ring at C-21 and a linear or alicyclic ester moiety at C-3 of the steroidal skeleton. These steroids were designed as potential inhibitors of the activity of both types (1 and 2) of 5 α -reductase. The cytotoxic activity of these compounds was also evaluated on a panel of PC-3, MCF7, and SK-LU-1 human cancer cell lines.

The results from this study showed that with the exception of steroids 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-propionate and 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-pentanoate, the compounds exhibit a lower inhibitory activity for both isoenzymes of 5 α -reductase than finasteride. Furthermore the 3 β -hydroxy-21-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)pregna-5,16-dien-20-one and 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-acetate derivatives display 80% cytotoxic activity on the SK-LU-1 cell line.

These results also indicated that the triazole derivatives, which have a hydroxyl or acetoxy group at C-3, could have an anticancer effect, whereas the derivatives with a alicyclic ester group at C-3 do not show biological activity.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Steroids are transcription factors that regulate gene expression; these messengers are able to cross the plasma membrane and bind

to specific receptors. The complex comprising the steroid receptor has a direct interaction with DNA, altering gene expression. The result of this process induces growth and differentiation of its target tissues, so any alteration in this mechanism can cause deregulation of the expression, resulting in the modification of several signaling pathways and therefore of functions.^{1,2}

It is known that in some metastatic tumors such as lung adenocarcinoma as well as in cancer cell line SK-LU-1, gene CYP24A1 is highly expressed.³ This gene is a member of the CYP450 superfamily, which codes for 24 hydroxylase enzyme.³ It is also recognized that the expression of glyoxalase enzyme genes is regulated by

* Corresponding author. Tel./fax: +52 55 5483 72 60.

E-mail addresses: aylinsilva@hotmail.es (A.V. Silva-Ortiz), eugene@unam.mx (E. Bratoeff), mtrapan@unam.mx (T. Ramírez-Apan), ymheuze@gmail.com (Y. Heuze), ara_sm89@live.com.mx (A. Sánchez), juansoriano@hotmail.com (J. Soriano), marisa@correo.xoc.uam.mx (M. Cab).

[†] Deceased author.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.10.047>

0968-0896/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

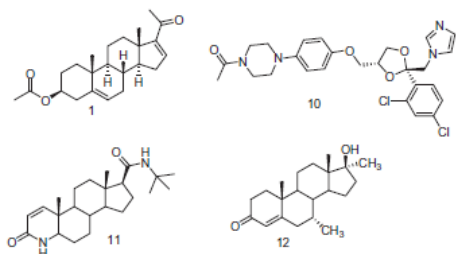


Figure 1. 16-Dehydropregnenole acetate (**1**), Ketoconazole (**10**), Finasteride (**11**) and Mibolerone (**12**).

testosterone (T) and that altered expression of genes encoding this glyoxalase is present in various types of cancerous tumors of the prostate.⁴ Furthermore, androgens also induce the development of benign prostatic hyperplasia (BPH). Both cancer and BPH have also been associated with an increase of dihydrotestosterone (DHT) in this gland.⁴ T is converted to DHT by the action of 5 α -reductase (5 α -R) isoenzymes. There are three 5 α -reductase isoenzymes in prostate tissue. Type 1 5 α -R (5 α -R1) is expressed in the prostate epithelial cells and is related to the development of prostate cancer.⁵ Type 2 5 α -R (5 α -R2) is associated with benign prostatic hyperplasia (BPH)³, and type 3 5 α -R (5 α -R3) is found in the brain and pancreas, and is related to hormone-refractory prostate cancer (HRPC).^{6,7} Each is encoded by a different gene; these have been characterized in several species.⁸

Therefore the development of new inhibitors of enzymes involved in the synthetic routes of steroidal hormones and antagonists of steroidal receptors could improve current anticancer therapies.^{9,10}

The cytotoxic effect of dehydroepiandrosterone derivatives with a triazole moiety and an aromatic ester at C-3 was demonstrated by our group.⁹ These derivatives displayed high cytotoxic activity in cell lines PC-3, MCF7 and SK-LU-1. We also demonstrated that several progesterone derivatives inhibited the activity of both types (1 and 2) of 5 α -R. These steroids also showed a high pharmacological activity inhibiting prostate growth.¹⁰

Based on these results we decided to study the synthesis and biological activity of a series of 21-(1*H*-1,2,4-triazole-1-yl)-5,16-pregnadiene-20-one-3 β -yl derivatives (**9a-j**). Their biological activity was evaluated by measuring their antiproliferative effect in a panel of human cancer cell lines; PC-3 (prostate), MCF7 (breast) and SK-LU-1 (lung). In addition we also evaluated their effect as inhibitors of the activity of 5 α -R1 and 5 α -R2 and their binding capacity to the androgen receptor (AR). The pharmacological effect of these pregnane derivatives was evaluated in an animal model.

In the cancer cell lines tested, ketoconazole **10** (Fig. 1) was used as a positive control. This compound is an antimycotic drug and an agent that inhibits cytochrome P450 enzymes, which are required for the synthesis of androgens.¹¹

2. Material and methods

2.1. Chemical and radioactive materials

2.1.1. Reagents

Solvents were purchased from commercial sources and used without further purification. Melting points were determined on a Fisher Johns melting point apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 200 spectrometer. The UV lamp (254 nm) was from UVP. ¹H and ¹³C NMR were taken

on a Varian VRX-400 spectrometer operating at 400 (¹H) and 100 (¹³C) MHz with TMS as internal standard ($\delta = 0$) in CDCl₃ (the abbreviations of signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet, t, triplet; m, multiplet). High resolution mass spectra (HRMS) were obtained with a Thermo DFS spectrometer by direct infusion and using FAB⁺ ionization mode.

(1,2,6,7-³H) Testosterone [³H] T specific activity: 95 Ci/mmol and Mibolerone (17 α -methyl-³H) [³H] MIB 10 specific activity 70–87 Ci/mmol were provided by Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA).

Radioinert T, 5 α -DHT and MIB were supplied by Steraloids (Wilton, NH, USA). Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) provided NADPH. Finasteride was obtained by extraction from Proscar[®] (Merck, Sharp & Dohme). The tablets were crushed, extracted with chloroform and the solvent was eliminated in vacuum; the crude product was purified by silica gel 60 (63–200 μ m) column chromatography (Sigma–Aldrich) with ethyl acetate as eluant. The melting point of the isolated finasteride (252–254 °C) was identical to that reported in the literature.

The ketoconazole used as a reference compound was purchased from Sigma Life Sciences.

2.1.2. Synthesis of derivatives of the 16-dehydropregnenolone acetate (**8, 9a-j**)

The synthetic pathway for the preparation of compounds **8** and **9a-j** are outlined in Figure 2. These steroids were prepared from the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate (**1**). The synthesis of these novel compounds is described below.

2.1.2.1. Synthesis of 16 α ,17 α -epoxy-3 β -hydroxypregn-5-en-20-one **2**.

A solution the steroid **1** (1 g, 2.82 mmol), sodium hydroxide 4 N (2 mL, 8 mmol) and H₂O₂ 30 % (4 mL, 135 mmol) in hot methanol (66 mL) was stirred at room temperature for 4 h. After this time the methanol was evaporated and the product was washed with water, obtaining a white solid.

Yield 0.665 g (72%), mp 197–199 °C, IR (KBr) cm⁻¹: 3457, 1692, 1642 and 1042. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.00 (s, H-18, 3H), 1.03 (s, H-19, 3H), 2.01 (s, H-21, 3H), 2.29 (s, H-16, 1H), 3.47 (m, J = 3.4 Hz, H-3, 1H), 3.66 (s, OH, 1H), 5.32 (t, J = 5.3 Hz, H-6, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ : 15.38 (C-18), 19.30 (C-19), 27.51 (C-21), 60.55 (C-16), 71.16 (C-17), 71.75 (C-3), 121.13 (C-6), 141.27 (C-5), 205.07 (C-20). HRMS calcd for C₂₁H₃₀O₃ 330.2195, found 330.2187.

2.1.2.2. Synthesis of 3 β -[[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy]-16 α ,17 α -epoxypregn-5-en-20-one **3**.

To a solution of steroid **2** (1 g, 3.02 mmol), t-butyl dimethylsilylbchloride (0.75 g, 5.51 mmol) and imidazole (0.488 g, 7.17 mmol) in dry DMF (15 mL) were added. The solution was stirred at room temperature for 2 h. When the reaction was finished, the DMF was evaporated at vacuum and the product was washed with water, obtaining a white solid.

Yield 1.17 g (87%), mp 118–120 °C, IR (KBr) cm⁻¹: 2935, 1704, 1642, 1698 and 1083. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : -0.051 (s, CH₃ of protector group, 6H), 0.048 (s, CH₃ of protector group, 9H), 0.88 (s, H-18, 3H), 1.00 (s, H-19, 3H), 2.02 (s, H-21, 3H), 2.25 (s, H-16, 1H), 3.47 (m, J = 3.4 Hz, H-3, 1H), 5.29 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-6), ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ : -4.33 (CH₃ of protector group) 15.40 (C-18), 19.32 (C-19), 27.70 (C-21), 26.08 (CH₃ of protector group), 60.57 (C-16), 71.11 (C-17), 72.55 (C-3), 120.43 (C-6), 141.93 (C-5), 205.08 (C-20). HRMS calcd for C₂₇H₄₄O₃Si 444.3060, found 444.3052.

2.1.2.3. Synthesis of 3 β -[[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy]-20,20-dimethoxy-16 α , 17 α -epoxypregn-5-en-21-ol **4**.

To a solution of steroid **3** (1 g, 2.2 mmol), (diacetoxyiodo) benzene (1.2 g,

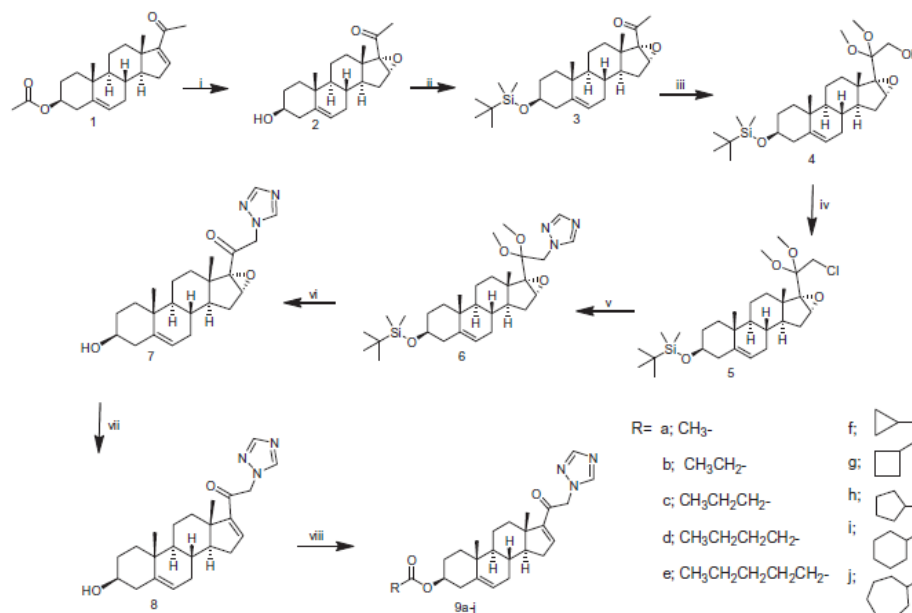


Figure 2. Reagents and conditions: (i) H₂O₂, NaOH 4 N; (ii) TBDMS, imidazole, DMF; (iii) NaOH, C₆H₅I(OAc)₂, MeOH; (iv) SOCl₂, Py, CH₂Cl₂; (v) 1,2,4-triazole, K₂CO₃, 80 °C, 5 h; (vi) HCl, acetone; (vii) CrCl₂, Ac. Acetic; (viii a) acetic anhydride, Py; (viii b–e) R-COOH, DCC, DMAP, CHCl₃.

3.72 mmol) and sodium hydroxide (1 g, 25 mmol) in methanol (21 mL) and dichloromethane (10 mL) were added, and stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure. Finally the purification was made with a basic aluminum column chromatography using mixture of hexane and ethyl acetate (95:5).

Yield 0.959 g (84 %), mp 215–218 °C, IR (KBr) cm⁻¹: 3597, 2930, 1666, 1070 and 1033. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: -0.051 (s, CH₃ of protector group, 6H), 0.048 (s, CH₃ of protector group, 9H), 0.88 (s, H-18, 3H), 1.01 (s, H-19, 3H), 2.25 (s, H-16, 1H), 3.29 (s, OCH₃, 6H), 3.44 (m, *J* = 3.6, H-3, 1H), 3.69 (s, OH, 1H), 5.30 (d, *J* = 5.3 Hz, H-6, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: -4.33 (CH₃ of protector group), 15.30 (C-18), 19.66 (C-19), 26.08 (CH₃ of protector group), 49.51 (OCH₃), 62.73 (C-21), 69.78 (C-16), 72.50 (C-3), 101.99 (C-20), 120.74 (C-6), 141.86 (C-5). HRMS calcd for C₂₉H₅₀O₅Si 506.3428, found 506.3423.

2.1.2.4. Synthesis of 3β-[[tert-butyl(dimethyl)silyloxy]-21-chloro-20,20-dimethoxy-16α,17α-epoxypregn-5-ene 5. To a cold solution of steroid 4 (1 g, 1.97 mmol) in a mixture of dry dichloromethane (8 mL) and pyridine (1 mL) thionyl chloride (0.25 mL) was added dropwise under nitrogen atmosphere and stirred at room temperature for 30 min. Chloroform (100 mL) was added and it was washed two times with 10% aqueous hydrochloric acid, aqueous sodium bicarbonate and water. It was dried over sodium sulfate and the solvent was evaporated in vacuum. The crude product was recrystallized from methanol.

Yield 0.830 g (80%), mp 150–152 °C, IR (KBr) cm⁻¹: 2930, 1668, 1088 and 1033. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: -0.051 (s, CH₃ of protector group, 6H), 0.048 (s, CH₃ of protector group, 9H), 0.88 (s, H-18, 3H), 1.00 (s, H-19, 3H), 2.24 (s, H-16, 1H), 3.24 (s, OCH₃, 6H), 3.46 (m, *J* = 3.4 Hz, H-3, 1H), 4.01 (s, 2H, H-21), 5.28 (d, *J* = 5.2 Hz, H-6, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: -4.33 (CH₃ of protector group), 15.99 (C-18), 18.83 (C-19), 26.08 (CH₃ of protector group),

49.87 (OCH₃), 59.57 (C-21), 69.50 (C-16), 72.96 (C-3), 101.96 (C-20), 121.18 (C-6), 142.08 (C-5). HRMS calcd for C₂₉H₄₉ClO₅Si 524.3089, found 524.3093.

2.1.2.5. Synthesis of 3β-[[tert-butyl(dimethyl)silyloxy]-20,20-dimethoxy-16α,17α-epoxy-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregn-5-ene 6.

A mixture of 1,2,4-triazole (0.069 g, 1.0 mmol), K₂CO₃ (0.263 g, 1.90 mmol) and the corresponding compound 5 (1 g, 1.90 mmol) dissolved in dry DMF (5 mL) was heated at 90 °C under N₂ atmosphere for 4 h. Cold water was added and the resulting solid was filtered. The compound was purified by a column chromatography with florisil.

Yield 0.753 g (71%), mp 188–190 °C, IR (KBr) cm⁻¹: 2929, 1616, 1086 and 1058. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: -0.051 (s, CH₃ of protector group, 6H), 0.048 (s, CH₃ of protector group, 9H), 0.88 (s, H-18, 3H), 1.00 (s, H-19, 3H), 2.30 (s, H-16, 1H), 3.24 (s, OCH₃, 6H), 3.48 (m, *J* = 3.3 Hz, H-3, 1H), 4.01 (s, 2H, H-21), 5.29 (d, *J* = 5.3 Hz, H-6, 1H), 7.47 (s, H-Het., 1H), 7.84 (s, H-Het., 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: -4.84 (CH₃ of protector group), 15.20 (C-18), 18.03 (C-19), 26.08 (CH₃ of protector group), 49.40 (OCH₃), 60.14 (C-21), 68.99 (C-16), 71.99 (C-17), 72.65 (C-3), 101.77 (C-20), 121.08 (C-6), 121.60 (C-Het.), 141.44 (C-Het.), 142.25 (C-5). HRMS calcd for C₃₁H₅₁N₃O₄Si 557.3649, found 557.3645.

2.1.2.6. Synthesis of 16α,17α-epoxy-3β-hydroxy-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregn-5-en-20-one 7.

This compound was prepared from compound 6 (0.5 g, 0.89 mmol). The hydrolysis was carried out in acetone (1.5 mL) with 36% chlorhydric acid (1.3 mL), at room temperature 1 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was recrystallized from methanol.

Yield 0.275 g (77%), mp 155–157 °C, IR (KBr) cm⁻¹: 3346, 2928, 1724, 1378, 1274 and 1051. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.90 (s, H-18, 3H), 1.20 (s, H-19, 3H), 3.24 (m, *J* = 3.5, H-3, 1H), 3.51

(s, OH, 1H), 3.68 (s, H-16, 1H), 4.18 (s, 2H, H-21), 5.33 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 7.51 (s, H-Het, 1H), 7.70 (s, H-Het, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.32 (C-18), 19.56 (C-19), 62.26 (C-21), 71.74 (C-3), 121.04 (C-6), 121.2 (C-Het.), 131.2 (C-Het.), 141.24 (C-5), 206.08 (C-20). HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3$ 397.2365, found 397.2369.

2.1.2.7. Synthesis of 3 β -hydroxy-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-20-one 8. A solution of steroid 7 (0.5 g, 1.25 mmol) and chromous chloride (0.4 g, 3.25 mmol) in acetic acid (20 mL) was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was diluted with cold water (150 mL) and the precipitate was filtered and dried. The product was purified by silica gel column chromatography using a mixture of hexane and ethyl acetate (9:1). From this compound, compounds (9a–j) were derived.

Yield 0.370 g (77%), mp 120–122, IR (KBr) cm^{-1} : 3355, 2927, 1709, 1670, 1276 and 1051. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.90 (s, H-18, 3H), 1.20 (s, H-19, 3H), 3.25 (m, $J = 3.5$ Hz, H-3, 1H), 3.52 (s, OH, 1H), 4.18 (s, 2H, H-21), 5.34 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 6.74 (s, H-16, 1H), 7.50 (s, H-Het., 1H), 7.70 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.32 (C-18), 20.01 (C-19), 62.15 (C-21), 71.78 (C-3), 121.04 (C-6), 141.23 (C-5), 141.38 (C-16), 141.47 (C-Het.), 144.83 (C-Het.), 196.66 (C-20). HRMS calcd For $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3$ 381.2416, found 381.2420.

2.1.2.8. Preparation of 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl acetate 9a. The synthesis of this compound was conducted from a solution of steroid 8 (0.1 g, 2.62 mmol), pyridine (0.4 mL) and acetic anhydride (0.4 mL). The resulting solution was stirred at room temperature for 1 h. A solution of water and salt was added and the precipitated was filtered. The compound was washed with water 3 times.

Yield 0.10 g (90%), mp 119–121 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2927, 1731, 1270 and 1087. ^1H RMN (40 MHz, CDCl_3) δ : 1.15 (s, H-18, 3H), 1.30 (s, H-19, 3H), 2.03 (t, ester-H-2', 3H), 3.25 (m, $J = 3.2$ Hz, H-3, 1H), 4.19 (s, 2H, H-21), 5.34 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 6.74 (s, $J = 6.7$, C-16, 1H), 8.01 (s, H-Het., 1H), 8.30 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.30 (C-18), 19.40 (C-19), 21.3 (C-2' of ester), 65.50 (C-21), 73.61 (C-3), 121.97 (C-6), 129.62 (C-16), 140.02 (C-Het.), 141.24 (C-5), 148.32 (C-Het.), 156.57 (C-17), 173.46 (ester carbonyl), 201.02 (C-20). HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_3$ 423.2522, found 423.2525.

2.1.2.9. General procedure for obtention of 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -ylpropionate (9b) to 20-oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -ylcycloheptanecarboxylate (9j). To a solution of steroid 8 (0.1 g, 0.262 mmol), DCC (0.110 g, 0.524 mmol) and DMAP (0.064 g, 0.524 mmol) in chloroform (3 mL) the corresponding acid (0.6 mmol) was stirred at room temperature for 2 h. Ethyl acetate (8 mL) was added and the precipitated dicyclohexyl urea was filtered. The organic phase was washed three times with 10% aqueous hydrochloric acid, 5% aqueous sodium bicarbonate, water and was dried over anhydrous sodium sulfate. The crude ester was recrystallized from chloroform-methanol.

2.1.2.9.1. 20-Oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-propionate 9b. Yield 0.097 g (85%), mp 119–121 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2927, 1728, 1571, 1270 and 1087. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.90 (s, H-18, 3H), 1.03 (s, H-19, 3H), 1.3 (t, H-3' of ester, 3H), 2.1 (q, H-2' of ester, 2H), 3.25 (m, $J = 3.2$, H-3, 1H), 4.19 (s, 2H, H-21), 5.34 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 6.74 (s, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 8.02 (s, H-Het., 1H), 8.30 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 8.30 (C-3' of ester), 10.3 (C-18), 12.03 (C-19), 73.61 (C-3), 121.97 (C-6), 129.62 (C-16), 140.02 (C-Het.), 141.24 (C-5), 148.32 (C-Het.), 156.57 (C-17), 173.48 (ester carbonyl), 201.02 (C-20). HRMS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3$ 437.2678, found 437.2673.

2.1.2.9.2. 20-Oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-butirate 9c. Yield 0.095 g (80%), mp 202–205 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2927, 1732, 1575, 1270 and 1087. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.90 (t, ester-H-4', 3H), 1.03 (s, H-18, 3H), 1.20 (s, H-19, 3H), 2.20 (q, ester-H-3', 2H), 3.25 (m, $J = 3.2$ Hz, H-3, 1H), 4.20 (s, 2H, H-21), 5.34 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 6.74 (s, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.51 (s, H-Het., 1H), 7.84 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 10.1 (C-3' of ester), 12.32 (C-18), 15.20 (C-19), 18.6 (C-4' of ester), 67.01 (C-21), 73.61 (C-3), 121.97 (C-6), 129.62 (C-16), 140.02 (C-Het.), 142.2 (C-5), 148.32 (C-Het.), 156.57 (C-17), 173.48 (ester carbonyl), 201.02 (C-20). HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_3$ 451.2835, found 451.2830.

2.1.2.9.3. 20-Oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-pentanoate 9d. Yield 0.095 g (78%), mp 195–197 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2927, 1731, 1570, 1275 and 1087. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.98 (t, ester-H-5', 3H), 1.03 (s, H-18, 3H), 1.20 (s, H-19, 3H), 2.4 (q, ester-H-4', 2H), 3.25 (m, $J = 3.2$ Hz, H-3, 1H), 4.20 (s, 2H, H-21), 5.34 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 6.74 (s, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.51 (s, H-Het., 1H), 7.82 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 9.82 (C-5' of ester), 10.1 (C-4' of ester), 10.31 (C-18), 15.4 (C-19), 67.31 (C-21), 73.59 (C-3), 121.97 (C-6), 129.62 (C-16), 140.02 (C-Het.), 142.25 (C-5), 148.32 (C-Het.), 156.57 (C-17), 173.46 (ester carbonyl), 200.02 (C-20). HRMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_3$ 465.2991, found 465.2993.

2.1.2.9.4. 20-Oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-hexanoate 9e. Yield 0.098 g (73%), mp 197–199 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2927, 1725, 1571, 1270 and 1087. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.0 (t, ester-H-6', 3H), 1.23 (s, H-18, 3H), 1.30 (s, H-19, 3H), 2.32 (q, ester-H-5', 2H), 3.25 (m, $J = 3.2$ Hz, H-3, 1H), 4.20 (s, 2H, H-21), 5.33 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 6.74 (s, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.51 (s, H-Het., 1H), 7.80 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 9.80 (C-6'), 12.30 (C-18), 15.42 (C-19), 67.30 (C-21), 73.62 (C-3), 121.97 (C-6), 129.62 (C-16), 140.02 (C-Het.), 142.31 (C-5), 148.32 (C-Het.), 156.57 (C-17), 173.46 (ester carbonyl), 200.02 (C-20). HRMS calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_3$ 479.3148 for, found 479.3141.

2.1.2.9.5. 20-Oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclopropanecarboxylate 9f. Yield 0.059 g, (50%), mp 131–134 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2928, 1722, 1625, 1575, 1270 and 1172. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.90 (s, H-18, 3H), 1.31 (s, H-19, 3H), 1.83 (m, ester-H-1', 1H), 3.45 (m, $J = 3.5$ Hz, H-3, 1H), 4.90 (s, 2H, H-21), 5.35 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 6.74 (s, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.70 (s, H-Het., 1H), 8.01 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 13.6 (C-1' of ester), 14.53 (C-18), 15.23 (C-19), 63.2 (C-21), 73.55 (C-3), 121.03 (C-6), 121.1 (C-16), 141.52 (C-5), 144.04 (C-Het.), 152.15 (C-Het.), 157.13 (C-17), 174.44 (ester carbonyl), 190.89 (C-20). HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3$ 449.2678, found 449.2672.

2.1.2.9.6. 20-Oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclobutanecarboxylate 9g. Yield 0.068 g, (56%), mp 136–138 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2930, 1723, 1625, 1575, 1270 and 1167. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.98 (s, H-18, 3H), 1.01 (s, H-19, 3H), 2.30 (m, ester-H-1', 1H), 3.45 (m, $J = 3.4$ Hz, H-3, 1H), 4.90 (s, 2H, H-21), 5.36 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 6.74 (m, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.80 (s, H-Het., 1H), 8.2 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 12.18 (C-18), 15.86 (C-19), 30.10 (C1' of ester), 65.51 (C-21), 73.55 (C-3), 121.93 (C-6), 121.96 (C-16), 141.53 (C-5), 143.98 (C-Het.), 152.15 (C-Het.), 157.21 (C-17), 174.96 (ester carbonyl), 190.92 (C-20). HRMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_3$ 463.2835, found 463.2837.

2.1.2.9.7. 20-Oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclopentanecarboxylate 9h. Yield 0.073 g, (58%), mp 118–120 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2928, 1724, 1625, 1574, 1270 and 1168. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.96 (s, H-18, 3H), 1.20 (s, H-19, 3H), 2.31 (m, ester-H-1', 1H), 3.48 (m, $J = 3.4$ Hz, H-3, 1H), 4.90 (s, 2H, H-21), 5.36 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 6.74 (m, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.70 (s, H-Het., 1H), 8.01 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN

(100 MHz, CDCl_3) δ : 15.87 (C-18), 19.25 (C-19), 30.10 (C1' of ester), 65.10 (C-21), 74.45 (C-3), 121.92 (C-6), 140.01 (C-16), 141.23 (C-5), 144.0 (C-Het.), 152.17 (C-Het.), 157.29 (C-17), 176.37 (ester carbonyl), 190.96 (C-20). HRMS calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_3$ 477.2991, found 477.2997.

2.1.29.8. 20-Oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclohexanecarboxylate **9i**. Yield 0.071 g, (55%), mp 115–118 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2930, 1724, 1627, 1585, 1275 and 1166. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.96 (s, H-18, 3H), 1.31 (s, H-19, 3H), 2.30 (m, ester-H-1', 1H), 3.78 (m, J = 3.7 Hz, H-3, 1H), 4.90 (s, 2H, H-21), 5.36 (d, J = 5.3 Hz, H-6, 1H), 6.74 (m, J = 6.7 Hz, C-16, 1H), 7.70 (s, H-aromatic, 1H), 8.01 (s, H-aromatic, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.80 (C-18), 19.25 (C-19), 30.10 (C1' of ester), 65.50 (C-21), 73.52 (C-3), 121.92 (C-6), 140.10 (C-16), 141.50 (C-5), 143.92 (C-Het.), 152.20 (C-Het.), 175.57 (ester carbonyl), 199.37 (C-20). HRMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_3$ 491.3148 for found 491.3144.

2.1.29.9. 20-Oxo-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-cycloheptanecarboxylate **9j**. Yield 0.068 g, (51%), mp 197–199 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2932, 1726, 1629, 1583, 1270 and 1160. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.90 (s, H-18, 3H), 1.33 (s, H-19, 3H), 2.30 (m, ester-H-1', 1H), 3.48 (m, J = 3.4 Hz, H-3, 1H), 4.90 (s, 2H, H-21), 5.35 (d, J = 5.3 Hz, H-6, 1H), 6.73 (m, J = 6.7 Hz, C-16, 1H), 7.70 (s, H-aromatic, 1H), 7.98 (s, H-aromatic, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.87 (C-18), 19.31 (C-19), 30.71 (C1' of ester), 65.50 (C-21), 72.05 (C-3), 121.07 (C-6), 140.30 (C-16), 141.50 (C-5), 143.94 (C-Het.), 152.20 (C-Het.), 176.58 (ester carbonyl), 191.05 (C-20). HRMS calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_3$ 505.3304, found 505.3310.

2.2. Animal and human tissues

2.2.1. Type 1 5 α -R isoenzyme isolated from rat liver

Two adult (8-month old) rats were obtained by the Metropolitan University in Xochimilco from Animal Care Facility, Mexico. All procedures with animals were approved by the Institutional Care and Use Committee of UAM.

The adult rats weighing 500 g had been fasted overnight to decrease glycogen levels before their livers were extirpated for use as a source of 5 α -R1.¹² To prepare microsomes, the livers (30 g) were minced in one volume of buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 6.5, containing 0.32 M sucrose, 0.1 mM DTT (Sigma-Aldrich, Mexico City, Mexico) with an IKA-A11 basic tissue mill (IKA Laboratory Equipment, Mexico City, Mexico). Unless otherwise specified, the following procedures were carried out at 4 °C.

The tissue was homogenized and the suspension was centrifuged (13,200 rpm; 20 min; 0 °C) (Beckman L70 K ultracentrifuge). The pellet was discarded. The supernatant was filtered through a nylon mesh filter (pore size 11 μm , distributed by OEM-Membrane Solution, Dallas TX) and centrifuged again (10,000 rpm; 60 min, 4 °C); the microsomal pellet was resuspended in five volumes of buffer A with a homogenizer. The protein amount was measured by the Bradford method.¹³

The suspension was re-centrifuged (13,200 rpm; 20 min, 4 °C) and the pellet was resuspended in buffer A to give a final concentration of 20 mg protein/mL. The microsomal suspension was stored at –70 °C prior to the preparation of the sample steroid.

2.2.2. Type 2 5 α R isoenzyme isolated from human prostate

Four hours after a 53-year-old patient had died of a heart attack, his normal prostate was extirpated in the Pathology Department of the General Hospital in Mexico City. The Ethical Committee of the General Hospital in Mexico City approved this protocol.

The tissue was rinsed and immediately chilled in ice-cold 150 mM NaCl and stored at –20 °C. The frozen human prostate

was thawed on ice, rinsed, and minced in buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 6.5, containing 0.32 M sucrose, 0.1 mM DTT; Sigma-Aldrich, Mexico City, Mexico) with an IKA® A11 basic tissue mill (IKA Laboratory Equipment, Mexico City, Mexico). Unless otherwise specified, the following procedures were carried out at 4 °C.

Human prostate was used in this experiment because this tissue is an abundant source of 5 α -R2, but not of 5 α -R1; the AR study in this model is very complex.

The human prostate tissue was homogenized in two volumes of buffer A with a tissue homogenizer Ultra-Turrax IKA, T18 basic (Wilmington, NC). The homogenates were centrifuged (1500g; 60 min)¹⁰ in a SW 60 Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). The pellets were resuspended in buffer A, and stored at –70 °C. This suspension had a final concentration of 5 mg protein/mL, as determined by the Bradford method, and was used as source of 5 α -R2 isozyme.

2.2.3. Rat prostate cytosol as source of AR

In order to evaluate the binding of steroids **8** and **9a-j** to the androgen receptor, the prostates of 50 adult rats (8 months old; 500 g) were removed, blotted, weighed and soaked in cold TEMD (40 mM tris-HCl, 3 mM EDTA and 20 mM sodium molybdate, dithiothreitol 0.5 mM, 10% glycerol at pH 8) before use. All procedures were carried out in an ice bath at 0 °C.

The tissues were homogenized with a tissue homogenizer (Teckmar, Cincinnati, OH) in one volume of buffer TEMD plus protease inhibitors (2 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antipain, 5 mM leupeptin)¹⁴ in an ice bath with a tissue homogenizer; subsequently the homogenates were centrifuged (14,000 rpm, 60 min)¹⁵ in a SW 60 Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). The cytosolic fraction obtained from the supernatant liquid of the rat prostate homogenate described above was stored at –70 °C. The protein (6 mg of protein in 200 μL) was determined by the Bradford Method.

In this study we used rats because the prostate gland is bigger than that of the hamster and there is no difference in the binding activity of the AR between rat and hamster cytosol.¹⁵

2.2.4. Characteristics of cell lines

The following panel of cells was used in this study: PC-3 (human prostate cancer cell line), MCF7 (human breast cancer cell line), and SK-LU-1 (human lung cancer cell line), supplied by the National Cancer Institute (USA).

2.2.5. In vivo experiments

For the experiments in vivo, 80 adult male golden hamsters (2.5 months old; 150–200 g) were used. After gonadectomies had been performed on the hamsters under isoflurane anesthesia, the castrated hamsters were allowed to recover for 30 days prior to experimentation. The castrated hamsters and the remaining eight intact hamsters were housed in a room with controlled temperature (22 °C) and light-dark periods of 12 h; the hamsters were fed with food and water ad libitum. Thirty days post gonadectomy, the hamsters were separated into nine groups consisting of four animals per group. The hamsters were treated for six days, and thereafter sacrificed with CO_2 .¹⁰ This experiment was carried out twice under the same conditions.

2.3. Biological activity of the new compounds

2.3.1. In vitro experiments

The effect of steroids **8** and **9a-j**, (Fig. 2) on the activity of 5 α -R1 and 5 α -R2 was evaluated under the same in vitro conditions that we described previously.¹⁰

We give a brief description of some of the details of the technique to evaluate the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of **8** and

9a–j required to inhibit the activity of 5 α -R isozymes. Different concentrations (1×10^{-10} to 10^{-4} M) of each of the steroid derivatives were added to tubes containing the culture medium.¹⁰ The transformation of T to DHT in the presence of **8** and **9a–j** was calculated from radioactive compounds present in each of the lanes of the chromatographic plate, taking into account the entire radioactivity present in the rest of the plate. These data were plotted using SigmaPlot software 12 inhibition curves.¹⁰

2.3.2. Competitive studies in AR

The binding capacity of steroids **8** and **9a–j** to the AR was determined using the same technique that was described previously by our group⁹ and the IC₅₀ of each compound was calculated according to the plots of concentration versus percentage of binding, using SigmaPlot 12.

2.3.3. In vivo experiments

2.3.3.1. Weight of the prostate, seminal vesicles and diameter of the pigmented spot. For six consecutive days, each of the steroid derivatives **8**, **9a–e** (2 mg/kg body weight (BW)) dissolved in 200 μ L of sesame oil, together with 1 mg/kg (BW) of testosterone, was administered by subcutaneous (SC) injection to a group of gonadectomized hamsters (four animals per derivative). Three groups of gonadectomized animals were kept as control; the first group was injected SC with 200 μ L sesame oil, the second group with 1 mg/kg (BW) of testosterone, and the third group with 1 mg T plus 1 mg/kg (BW) of finasteride also prepared in sesame oil. Additionally, one group of four intact hamsters was used as the intact control. After treatment, the animals were sacrificed with CO₂. The diameters of the flank organs were measured using a vernier caliper; the prostate and seminal vesicles of each hamster were dissected and weighed. Two separate experiments were performed for each group of steroid treated hamsters. The results were analyzed by using one-way analysis of variance and Dunnett's method to compare means, using JMP IN 5.1 software (JMP, Statistical Discovery, Cary, NC, USA).

2.3.4. Cytotoxicity assay

Cytotoxic activity of steroids **8** and **9a–j** on three different cell lines; PC-3, MCF7, and SK-LU-1, was evaluated as reported previously.^{16,17}

The percentage of cell growth inhibition was calculated according to the following expression:

$$\text{Cell growth inhibition (\%)} = \frac{100 - (\text{simple absorption})}{(\text{vehicle absorption})} \times 100$$

3. Results

3.1. Chemistry

In this synthesis the strategy for the preparation of **8** and **9a–j** (Fig. 2) was the following: we used the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate (**1**) treated with hydrogen peroxide and sodium hydroxide 4 N to form the 16 β , 17 β -epoxy compound **2**. The protection in C-3 with *tert*-butyldimethylsilyl chloride and imidazole in DMF afforded the compound **3**. The oxidation of **3** with (diacetoxyiodo) benzene, sodium hydroxide and methanol generated the compound with the alcohol in C-21 **4**. This compound treated with thionyl chloride yielded the chlorinated compound **5**. **6** was prepared using potassium carbonate and 1,2,4-triazole in DMF and warmed at 80 °C for 5 h. Compound **6** upon treatment with hydrochloric acid in acetone afforded the compound **7**. The 16 β ,17 β -epoxy elimination of **7** was performed with chromium chloride (II) in acetic acid giving compound **8**.

Finally compounds **9b–j** were obtained from **8** by using the Steglich esterification method.¹⁸ Their esters were obtained with a high and regular yields (51–90%). The synthesis of **9a** was done with acetic anhydride and pyridine (77% yield). All compounds were isolated and the melting points showed a maximum of two degrees difference. The desired compounds and intermediates were characterized by IR, ¹H NMR, ¹³C NMR and mass spectrometry.

3.2. Effect of steroids **8** and **9a–j** as inhibitors of the activity of 5 α -R isozymes

The in vitro effect of steroids **8**, **9a–j** and finasteride (**11** in Fig. 1) required for inhibiting 5 α -R1 and 5 α -R2 activity for 50% (IC₅₀ value) are shown in Table 1.

These results indicate that **9b** and **9d** with IC₅₀ values for 5 α -R1 of 88 nM and 320 nM respectively (Table 1) have higher inhibitory activity (lower IC₅₀ values) than finasteride (IC₅₀ = 630). However, the rest of these compounds do not show this inhibitory activity by 5 α -R1.

The data in Table 1 also show that **9a** and **9f** inhibited the activity of 5 α -R2 with IC₅₀ values of 100 and 118 μ M, respectively. These IC₅₀ values are higher than that of finasteride (0.0085 μ M), which is the steroid we used as a reference control. Thus **9a** and **9f** are less potent than finasteride for inhibiting the activity of 5 α -R2.

3.3. Competitive studies

These studies show that **8** and **9a–j** did not displace the tritium-labeled MIB (**12** in Fig. 1) of AR in the trial. However, the unlabeled MIB used as reference control shifted the labeled MIB from AR, giving an IC₅₀ value of binding to the AR of 1 nM. MIB is a very potent agonist of AR; this is the reason we used this steroid as a reference control.

3.4. Cytotoxic activity on cancer cell lines

The percentage of antiproliferative effect produced by steroids **8**, **9a–j** on the growth of human cancer cell lines PC-3 (prostate), MCF7 (breast) and SK-LU-1 (lung) is shown in Table 1. Ketoconazole was used in this study as a reference standard because it is known that this compound has an antiproliferative effect in cancer cell lines.

The data in Table 1 also show that compounds **8** and **9a** have lower antiproliferative activity on PC-3 and MCF7 (61.3%, 56.2%, 62.1% and 59.4%, respectively) than in SK-LU-1 cells. Furthermore these compounds have a high inhibitory activity on this last cell line (88.9% and 74.8%, respectively). However steroids **9b–9j** displayed a lower cytotoxic activity than ketoconazole; this low cytotoxic activity could be due to its low solubility in DMSO, which could prevent availability in the cell culture medium.

3.5. Pharmacological results

After castration, the weight of the hamster prostate and seminal vesicles decreased ($p < 0.05$) compared to the normal glands, as did the diameter of the pigmented spot. Treatment with vehicle alone did not change these conditions. However, injections of 1 mg/kg of T for 6 days significantly increased ($p \leq 0.05$) the diameter of the pigmented spot as well as the weight of the prostate and seminal vesicles (Table 2). When T (1 mg/kg) and finasteride were injected together, the diameter of the flank organs and the weight of the prostate and seminal vesicles decreased significantly ($p \leq 0.05$) compared to that of T-treated animals (Table 2). This reduction of the weight of these glands and diameter of the pigmented spot was comparable to that produced by finasteride **11** (Table 2).

Table 1
Biological activity of novel derived compounds on human cancer cell line growth inhibition at 50 μ M, IC₅₀ value for 5 α -R isoenzymes and AR binding assay

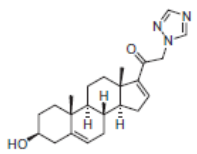
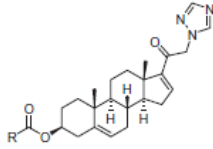





Structure	Compound	R	PC-3	MCF7	SK-LU-1	5 α -R1 IC ₅₀ nM	5 α -R2 IC ₅₀ μ M	RBA AR %
Ketoconazole	10	–	88.48 \pm 3.9	95.16 \pm 4.8	73.39 \pm 1.6	ND	ND	ND
Finasteride	11	–	NA	NA	NA	630	0.0085	NA
	8	–	61.3 \pm 0.3	62.1 \pm 0.8	88.9 \pm 5.5	NA	NA	NA
	9a	–CH ₃	56.2 \pm 1.3	59.4 \pm 2.3	74.8 \pm 1.5	NA	100	NA
	9b	–C ₂ H ₅	NA	5.9 \pm 2.2	8.8 \pm 0.7	88	NA	NA
	9c	–C ₃ H ₇	9.2 \pm 1.6	25.6 \pm 2.7	15.6 \pm 1.8	NA	NA	NA
	9d	–C ₄ H ₉	38.2 \pm 2.2	38.5 \pm 0.9	20.2 \pm 2.8	320	NA	NA
	9e	–C ₅ H ₁₁	16.9 \pm 1.8	14.4 \pm 0.2	6.4 \pm 1.7	100x10 ³	NA	NA
	9f		NA	NA	NA	NA	118	NA
	9g		NA	NA	NA	NA	NA	NA
	9h		NA	NA	NA	NA	NA	NA
	9i		NA	NA	NA	NA	NA	NA
	9j		NA	NA	NA	NA	98x10 ³	NA

Table 2
Diameter of the pigmented spot of the flank organs; weight of the prostate and seminal vesicles glands \pm standard deviation from castrated hamsters receiving different treatments for 6 days

Treatment	Diameter of the pigmented spot (mm) \pm standard error	Weight of prostate (mg) \pm standard error	Weight of seminal vesicles (mg) \pm standard error
Control	2.03 \pm .63	50.4 \pm 9.9	96.11 \pm 12.5
T	5.65 \pm 1.1	98 \pm 32.6	200.6 \pm 55
T + F	3.57 \pm 0.9	69.6 \pm 21.2	161.4 \pm 44.5
T + 8	3.05 \pm 1.5	89.0 \pm 16	163.33 \pm 41.4
T + 9a	2.9 \pm 0.9	87.65 \pm 21.8	216.075 \pm 67.2
T + 9b	2.79 \pm 1.4	89.55 \pm 21.1	157.08 \pm 32.6
T + 9c	2.71 \pm 0.7	81.3 \pm 57	138.9 \pm 45
T + 9d	3.71 \pm 1.0	82.30 \pm 21.9	180.03 \pm 39.5
T + 9e	2.8 \pm 0.4	86.9 \pm 19.5	200 \pm 56.7
T + 9f	2.88 \pm 0.8	107.48 \pm 22.8	180.3 \pm 39.5
T + 9g	2.14 \pm 2.5	100 \pm 40	130 \pm 58
T + 9h	2.8 \pm 1.0	97 \pm 30	120 \pm 25
T + 9i	3 \pm 0.3	88 \pm 10	150 \pm 15
T + 9j	4.45 \pm 0.4	78.2 \pm 18.5	203.98 \pm 47.8

The control animals were treated with vehicle only.

The results of this experiment (Table 2) show the effect of steroids **8**, **9a–j** on the size of the pigmented spot of the flank organs as well as the weight of prostate and seminal vesicles. The Dunnett test, which compares the mean obtained in the pharmacological experiments, indicated that no significant differences exist between the response obtained with T-treatment and T plus **8**, **9a–j**.

4. Discussion

In this study we demonstrated that derivatives **8** and **9a–j** were less potent for inhibition of the activity of 5 α -R2 than other 16-pregnenolone acetate and 16-pregnanediene acetate derivatives previously studied.¹⁹ This low activity in vitro (**8** and **9a–j**) fully explains the lack of pharmacological effect of these steroids observed in these experiments.

However **9b** and **9d** were more potent for inhibition of 5 α R1 than the previously reported derivatives.¹⁹ Compounds **9b** and **9d** have ester groups with an even number of carbon atoms in their

structure, which may favor union with 5 α -R1. This is important because some types of prostate tumor cells, such as LnCaP, proliferate due to the presence of 5 α -R1 specifically, so these compounds may have therapeutic potential for this type of condition.⁵

The structure of the two isozymes of 5 α -R has not been elucidated because they are membrane proteins, which makes them very difficult to purify in their functional form.¹ For this reason its crystal structure is unknown and docking and SAR studies remain in the theoretical stage.^{9,10,19}

Data obtained in this study demonstrated that steroid **8** with a triazole moiety at C-21 showed high cytotoxic activity on the cell line SK-LU-1 (lung cancer). In a previous study it has been reported that DHEA derivatives to which triazole groups were added at C-17 were able to inhibit the growth of the same three cell lines used in this study.⁹ But these derivatives of DHEA⁹ also had antiproliferative action on cell lines PC-3 and MCF7. The triazole group added to the synthesized pregnane derivatives increased their solubility in the culture medium of cells studied.²⁰ In addition, the ester group attached at C-3 of these derivatives enhances the value of log P

and therefore its permeability through the cell membrane. When the antiproliferative effect produced by steroid derivatives with imidazole or a pyrazole ring is compared with triazole it is observed that the antiproliferative effect increases triazole ring.²¹ Other 21-triazolyl derivatives of pregnenolone have displayed a potent antitumor activity. For example the compound 21-[4-[(4-methoxyphenoxy)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-3-hydroxypreg-5-en-20-one synthesized by the group of Banday, which was very active to inhibit the growth of DU-145 and PC-3 cell lines.²²

These data indicate that the hydroxylated derivative of pregnenolone at C-3 and with a triazole group at C-21 synthesized and studied in this work displays antiproliferative specificity on the SK-LU-1 cells, which could be considered an advantage for its therapeutic use. This activity could be attributed to the presence of a free OH group at C-3 (8), which forms hydrogen bonds with different molecules in the cells.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT project number 165049) and from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA project number IN 211312).

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.10.047>. These data include MOL files and InChIKeys of the most important compounds described in this article.

References and notes

1. Russell, D. W.; Wilson, J. D. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 25.
2. Ribarska, T.; Goering, W.; Droop, J.; Bastian, K.-M.; Ingenwerth, M.; Schulz, W. A. *Epigenetics* **2014**, *9*, 704.
3. Rammath, N.; Nadal, E.; Jeon, C. K.; Sandoval, J.; Colacino, J.; Rozek, L. S.; Christensen, P. J.; Esteller, M.; Beer, D. G.; Kim, S. H. *J. Thorac. Oncol.* **2014**, *9*.
4. Antognelli, C.; Del Buono, C.; Baldracchini, F.; TALESA, V.; Cottini, E.; Brancadoro, C.; Zucchi, A.; Mearini, E. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1880.
5. Thomas, L. N.; Lazier, C. B.; Gupta, R.; Norman, R. W.; Troyer, D. A.; O'Brien, S. P.; Rittmaster, R. S. *Prostate* **2005**, *63*, 231.
6. Godoy, A.; Kawinski, E.; Li, Y.; Oka, D.; Alexiev, B.; Azzouni, F.; Titus, M. A.; Mohler, J. L. *Prostate* **2011**, *71*, 1033.
7. Uemura, M.; Tamura, K.; Chung, S.; Honma, S.; Okuyama, A.; Nakamura, Y.; Nakagawa, H. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 81.
8. Liang, T. E. H. M.; Cascieri, M. A.; Cheung, A. H.; Reynolds, G. F.; Rasmussen, G. H. *Endocrinology* **1985**, *117*, 571.
9. Bratoeff, E.; Garrido, M.; Ramírez-Apan, T.; Heuze, Y.; Sánchez, A.; Soriano, J.; Cabeza, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6233.
10. Bratoeff, E.; García, P.; Heuze, Y.; Soriano, J.; Mejía, A.; Labastida, A. M.; Valencia, N.; Cabeza, M. *Steroids* **2010**, *75*, 499.
11. Ngo, L. S. M.; Yeo, A.; Wong, A. S. C.; Tay, M. H. *Ann. Acad. Med. Singapore* **2007**, *36*, 811.
12. Levy, M. A.; Brandt, M.; Greway, A. T. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2808.
13. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
14. Hendry, I. W. J.; Danzo, B. J. *J. Steroid Biochem.* **1985**, *23*, 883.
15. Liang, T.; Heiss, C. E.; Cheung, A. H.; Reynolds, G. F.; Rasmussen, G. H. *JBC* **1984**, *259*, 734.
16. Garrido, M.; Cabeza, M.; Cortés, F.; Gutiérrez, J.; Bratoeff, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 301.
17. Eichenberger, T.; Trachenbeig, J.; Chronis, P. *Am. J. Clin. Oncol.* **1988**, *11*, S104.
18. Neises, B.; Steglich, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1978**, *17*, 522.
19. Pérez-Ornelas, V.; Cabeza, M.; Bratoeff, E.; Heuze, Y.; Sánchez, M.; Ramírez, E.; Naranjo-Rodríguez, E. *Steroids* **2005**, *70*, 217.
20. Patrick, G. L. *Medicinal Chemistry*, 2nd ed.; Oxford University Press: Oxford, 2001.
21. Garrido, M.; Cabeza, M.; Cortés, F.; Gutiérrez, J.; Bratoeff, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 301.
22. Banday, A.; Verma, M.; Srikakulam, S.; Gupta, B. D.; Kumar, S. *Steroids* **2010**.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsmb

Synthesis and biological activity of two pregnane derivatives with a triazole or imidazole ring at C-21



Aylin Viviana Silva-Ortiz^a, Eugene Bratoeff^{a,1}, María Teresa Ramírez-Apan^c,
Rocío García-Becerra^b, David Ordaz-Rosado^b, Nancy Noyola-Martínez^b,
Rafael Castillo-Bocanegra^a, David Barrera^{b,*}

^a Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México

^b Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Col. Belisario Domínguez, Sección XVI, México, D.F. 14080, México

^c Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 November 2015

Received in revised form 22 January 2016

Accepted 11 February 2016

Available online 23 February 2016

Keywords:

Pregnane derivatives
Prostate cancer
Breast cancer
Lung cancer
Cyclin D1
Cyclin E1

ABSTRACT

Pregnane derivatives are studied as agents for the treatment of different hormone-dependent diseases. The biological importance of these steroids is based on their potential use against cancer. In this study, we report the synthesis, characterization and biological activity of two pregnane derivatives with a triazole (3 β -hydroxy-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-20-one; **T-OH**) or imidazole (3 β -hydroxy-21-(1*H*-imidazol-1-yl)pregna-5,16-dien-20-one; **I-OH**) moieties at C-21. These derivatives were synthesized from 16-dehydropregnenolone acetate. The activity on cell proliferation of the compounds was measured on three human cancer cells lines: prostate cancer (PC-3), breast cancer (MCF7) and lung cancer (SK-LU-1). The cytotoxic and antiproliferative effects of **T-OH** and **I-OH** were assessed by using SBR and XTT methods, respectively. The gene expressions were evaluated by real time PCR. In addition, results were complemented by docking studies and transactivation assays using an expression vector to progesterone and androgen receptor.

Results show that the two compounds inhibited the three cell lines proliferation in a dose-dependent manner. Compound **I-OH** downregulated the gene expression of the cyclins D1 and E1 in PC-3 and MCF7 cells; however, effect upon Ki-67, EAG1, BIM or survivin genes was not observed. Docking studies show poor interaction with the steroid receptors. Nevertheless, the transactivation assays show a weak antagonist effect of **I-OH** on progesterone receptor but not androgenic or antiandrogenic actions.

In conclusion, the synthesized compounds inhibited cell proliferation as well as genes key to cell cycle of PC-3 and MCF7 cell lines. Therefore, these compounds could be considered a good starting point for the development of novel therapeutic alternatives to treat cancer.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is well known that the steroids play a pivotal role in several processes, such as the differentiation, development, growth, as well as physiological and reproductive functions in the human body. Steroid hormones are molecules that share as structural

feature a tetracyclic nucleus formed by three cyclohexanes and one cyclopentane. They differ by the oxidation state, the chains and functional groups attached to this four-ring structure which change their chemical functions and biologic specificity [1].

Generally, many of the cellular effects of steroids are mediated via the classical genomic mechanism, where the steroids are taken from circulation to cells and bind to specific receptors, two hormone-receptor complexes dimerize and are translocated from cytoplasm to nucleus to recognize the hormone-response elements and induce changes in the transcriptional expression of target genes [2]. In addition, several non-genomic actions have been described. In this respect, ion channels, membrane-associated steroid receptors, enzyme-linked receptors and cytoplasmic proteins activate intracellular signaling cascades that in turn activate second messengers [3]. In fact, the steroid effects may

Abbreviations: AR, androgen receptor; PR, progesterone receptor; VDR, vitamin D receptor; P₄, progesterone.

* Corresponding author at: Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Col. Belisario Domínguez, Sección XVI, Tlalpan, 14080 México, D. F., México.

E-mail addresses: barreia1912@gmail.com, vidadav@hotmail.com (D. Barrera).

¹ Deceased.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsmb.2016.02.013>

0960-0760/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

occur using one or both mechanisms in a tissue-dependent manner.

Indeed, the literature describes numerous examples of the natural and synthetic compounds used for the treatment of both sex hormone-dependent and independent cancer tumors [4–9]. However, the resistance to therapies impedes the successful treatment. Consequently, the design of compounds with a specific activity for each molecular target should be performed.

In this sense, the replacement of one or more carbon atoms in a steroid molecule by nitrogen atoms affects the chemical properties of the steroid and changes its biological activity. Since 1980's, azasteroids had received much attention for the development of new compounds that are being used for the treatment of hormone-dependent diseases such as adenocarcinomas, offering an important strategy for tumor control [10]. Actually, many drugs used in the treatment of a number of androgen-independent, androgen-, estrogen-, and other steroid-dependent diseases, have in its structure a heterocyclic group. Some interesting compounds in the pharmaceutical market are for example aminoglutethimide and its derivatives; esters of 4-pyridineacetic acid; bis-chlorophenyl-pyrimidine analogues; as well as imidazole and triazole derivatives, such as ketoconazole, liarozole, fadrozole, CGS 18320 B, vorozole and CGS 20267 [11].

In particular, pharmacological studies have displayed that some pregnane derivatives have a variety of bioactivities, such as cytotoxicity and immunoregulation among others, whereas some synthetic steroids have been previously described as regulators of apoptosis or implicated in cellular proliferation [12–17]. In this study, we synthesized two steroidal derivatives from 16-dehydropregnenolone acetate with triazole (3 β -hydroxy-21-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-20-one; **T-OH**) or imidazole (3 β -hydroxy-21-(1*H*-imidazol-1-yl)pregna-5,16-dien-20-one; **I-OH**) moieties at C-21 (Fig. 1). The compounds were tested *in vitro* to determine the effect on cell growth, and upon gene expression of proliferative and apoptotic proteins using a panel of human cancer cell lines: PC-3 (prostate), MCF7 (breast) and SK-LU-1 (lung).

In order to rationalize and visualize at the molecular level the important features of these pregnane derivatives and their implication in ligand-protein interaction we used docking tools to calculate the thermochemical parameters between **T-OH** and **I-OH** versus progesterone, androgen and vitamin D receptors (PR, AR and VDR, respectively). Additionally, transactivation assays were performed with **I-OH** compound to determine its agonistic or antagonistic actions.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Reagents and solvents were purchased from commercial sources. Melting points (uncorrected) were determined on a Fisher Johns melting point apparatus (Fisher Johns, Mexico City, Mexico). Infrared spectra (IR) were recorded on a Perkin-Elmer

200 spectrometer (Perkin-Elmer Life and Analytical Science, Shelton CT, USA). ^1H and ^{13}C NMR were taken on a Varian VRX-400 spectrometer (MR resources NC, USA) operating at 400 (^1H) and 100 (^{13}C) MHz with tetramethylsilane (TMS) as internal standard ($\delta = 0$) in CDCl_3 (the abbreviations of signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet). High resolution mass spectra (HRMS) were obtained with a Thermo DFS spectrometer by direct infusion and using FAB^+ ionization mode (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA USA).

16-dehydropregnenolone acetate, progesterone (**P**₄), RU486, 5 α -dihydrotestosterone (5 α -DHT), flutamide (FLUT) and sulforhodamine B (SRB) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ketoconazol was purchased from Sigma Life Science (St. Louis, MO, USA). Cell culture medium (DMEM and RPMI) was obtained from Gibco-Invitrogen. TRIzol and oligonucleotides for real time polymerase chain reaction (qPCR) were from Invitrogen (CA, USA). The probes, capillaries, the TaqMan Master reagents, the Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit, the cell proliferation assay (XTT) were purchased from Roche (Roche Applied Science, IN, USA). The ^3H chloramphenicol (specific activity 38.9Ci/mmol) was purchased from DuPont NEN Research products (Perkin-Elmer, Boston, MA) and radioactivity was determined in a Beckman LS6500 scintillation system (Beckman Instruments, CA) using Biodegradable Counting Scintillant (Amersham, CA) as counting solution.

2.2. Synthesis of 16-Dehydropregnenolone derivatives (**T-OH** and **I-OH**)

The synthetic pathways for the preparation of **T-OH** and **I-OH** are outlined in Fig. 2. These compounds were prepared from the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate (**1**) as follows:

2.2.1. 16 α ,17 α -Epoxy-3 β -hydroxypregn-5-en-20-one (**2**)

A solution of steroid **1** (1 g, 2.82 mmol), sodium hydroxide 4 N (2 mL, 8 mmol) and H_2O_2 30% (4 mL, 135 mmol) in hot methanol (66 mL) was stirred at room temperature for 4 h. After this time the methanol was evaporated and the product was washed with water and air dried to give a white solid.

Yield 0.665 g (72%), m.p. 197–199 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 3457, 1692, 1642 and 1042. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.00 (s, H-18, 3H), 1.03 (s, H-19, 3H), 2.01 (s, H-21, 3H), 3.47 (m, $J = 3.4$ Hz, H-3, 1H), 3.50 (s, OH, 1H), 3.66 (s, H-16, 1H), 5.32 (t, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.38 (C-18), 19.30 (C-19), 27.51 (C-21), 60.55 (C-16), 71.16 (C-17), 71.75 (C-3), 121.13 (C-6), 141.27 (C-5), 205.07 (C-20). HRMS cal. for $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$ 330.2195, found 330.2187.

2.2.2. 3 β -(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-16 α ,17 α -epoxypregn-5-en-20-one (**3**)

A solution of steroid **2** (1 g, 2.42 mmol), 3,4-dihydro-2*H*-pyran (30 mL) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.100 mg, 0.058 mmol) in dichloromethane (40 mL), was stirred at room

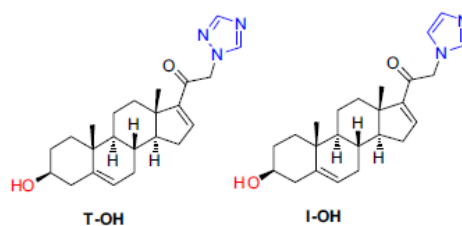


Fig. 1. Molecular structures of **T-OH** and **I-OH**.

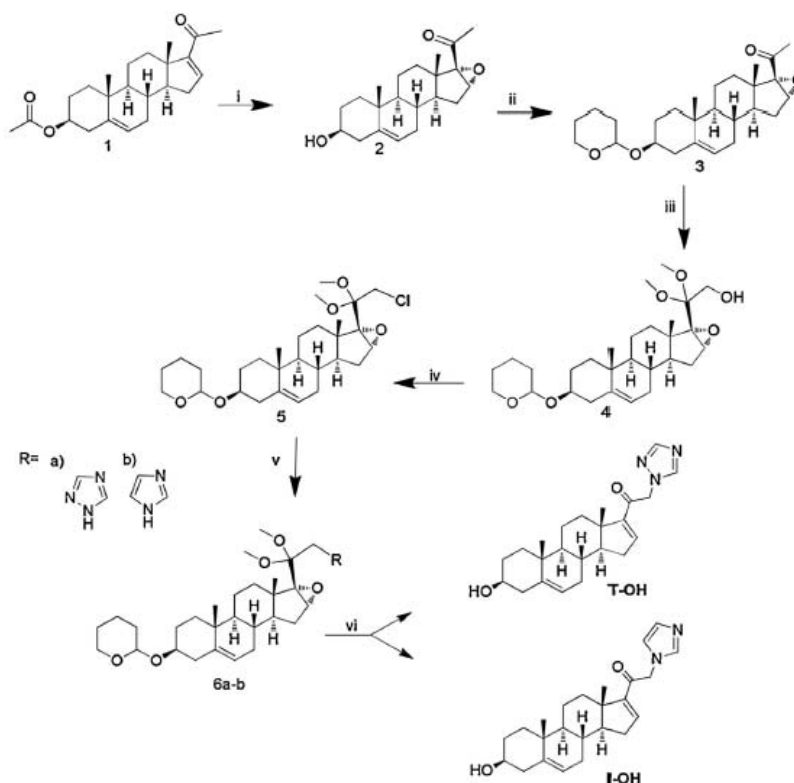


Fig. 2. Synthesis of two 16-dehydropregnenolone acetate derivatives.

temperature for 1 h. Then, the solvent was removed with the rotaevaporator and the product was recrystallized from methanol.

Yield 0.88 g (71%), m.p. 114–116 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2935, 1703, 1438 and 1024. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.00 (s, H-19, 3H), 1.02 (s, H-19, 3H), 2.01 (s, H-21, 3H), 3.47 (m, $J = 3.4$ Hz, H-3, 1H), 3.66 (s, H-16, 1H), 3.89 (d, H-5' of protector group, 2H), 4.69 (t, H-1' of protector group, 1H), 5.31 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-6). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.37 (C-18), 19.28 (C-19), 27.65 (C-21), 60.63 (C-5 of protector group), 62.96 (C-16), 75.99 (C-17), 76.06 (C-3), 120.92 (C-6), 141.38 (C-5), 205.06 (C-20). HRMS cal. for $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_4$ 414.2770, found 414.2774.

2.2.3. 20,20-Dimethoxy-3 β -(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-16 α ,17 α -epoxypregn-5-en-21-ol (4)

A solution of steroid 3 (1 g, 2.11 mmol), (diacetoxyiodo) benzene (1.2 g, 3.72 mmol) and sodium hydroxide (1 g, 25 mmol) in methanol (21 mL) and dichloromethane (10 mL) was stirred at room temperature for 3 h. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by a column chromatography packed with basic aluminum oxide eluted with a mixture of hexane and acetone (95:5).

Yield 0.751 g (65%), m.p. 139–141 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 3504, 2937, 1083 and 1030. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.00 (s, H-18, 3H), 1.24 (s, H-19, 3H), 3.25 (s, OCH_3 , 6H), 3.43 (m, $J = 3.4$, H-3, 1H), 3.44 (s, OH, 1H), 3.48 (s, H-21, 2H), 3.67 (s, H-16, 1H), 3.89 (d, H-5' of protector group, 2H), 4.69 (t, H-1' of protector group, 1H), 5.32 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.27 (C-18), 19.41 (C-19), (CH₃ of protector group), 50.49 (OCH₃), 60.63 (C-5' of protector group), 62.69 (C-16), 63.02 (C-21), 76.08 (C-3), 76.02 (C-

17), 97.13 (C-20), 101.95 (C-1' of protector group), 121.22 (C-6), 141.29 (C-5). HRMS cal. for $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_6$ 476.3138, found 476.3134.

2.2.4. 21-Chloro-20,20-dimethoxy-3 β -(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-16 α ,17 α -epoxypregn-5-ene (5)

To a cold solution of steroid 4 (0.5 g, 1.01 mmol) in a mixture of dry dichloromethane (4 mL) and pyridine (0.5 mL) was added dropwise thionyl chloride (0.15 mL) under a nitrogen atmosphere, and the mixture was stirred at room temperature for 20 min. Chloroform (50 mL) was added to stop the reaction and then it was evaporated in vacuum. The crude product was recrystallized from methanol.

Yield 0.418 g (80%), m.p. 101–103 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2932, 1670, 1065 and 1039. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.02 (s, H-18, 3H), 1.23 (s, H-19, 3H), 3.25 (s, OCH_3 , 6H), 3.43 (m, $J = 3.4$, H-3, 1H), 3.48 (s, H-21, 2H), 3.67 (s, H-16, 1H), 3.89 (d, H-5' of protector group, 2H), 4.69 (t, H-1' of protector group, 1H), 5.32 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.26 (C-18), 19.50 (C-19), 50.45 (OCH₃), 59.51 (C-21), 68.30 (C-16), 76.08 (C-3), 60.63 (C-5' of protector group), 97.13 (C-20), 101.95 (C-1' of protector group), 121.22 (C-6), 141.29 (C-5). HRMS cal. for $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{ClO}_5$ 494.2799, found 494.2793.

2.2.5. 20,20-Dimethoxy-16 α ,17 α -epoxy-3 β -(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) pregn-5-ene (6a)

A mixture of 1,2,4-triazole (0.031 g, 0.443 mmol), K_2CO_3 (0.123 g, 0.89 mmol) and compound 5 (0.1 g, 0.202 mmol) was dissolved in dry DMF (5 mL) and the solution was heated at 90 °C under nitrogen for 3 h. Cold water was added and the resulting

solid was filtered. The compound was purified by a column chromatography with florisil.

Yield 0.078 g (73%), m.p. 124–125 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2934, 1379, 1275 and 1026. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.87 (s, H-18, 3H), 0.98 (s, H-19, 3H), 3.28 (s, OCH₃, 6H), 3.46 (m, $J = 3.4$, H-3, 1H), 3.48 (s, H-21, 2H), 3.68 (s, H-16, 1H), 3.90 (d, H-5' of protector group, 2H), 4.70 (t, H-1' of protector group, 1H), 5.32 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 7.98 (s, H-Het., 1H), 8.27 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.20 (C-18), 19.43 (C-19), 49.66 (C-16), 50.47 (OCH₃), 58.52 (C-21), 62.68 (C-5' of protector group), 76.04 (C-3), 97.13 (C-20), 101.93 (C-1' of protector group), 121.16 (C-6), 121.23 (C-Het.), 141.31 (C-5), 141.48 (C-Het.). HRMS cal. for $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_5$ 527.3359, found 527.3355.

2.2.6. 3 β -Hydroxy-21-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pregna-5,16-dien-20-one (T-OH)

Compound **6a** (0.1 g, 0.19 mmol) was hydrolyzed and the epoxide group at C-16 was eliminated at the same time with a reaction carried out in acetic acid (4 mL), chromous chloride (0.08 g, 0.65 mmol) and two drops of 36% hydrochloric acid at room temperature for 20 min the mixture was diluted with cold water (150 mL) and the precipitate was filtered and dried. The product was purified by silica gel column chromatography using a mixture of hexane and acetone (9:1).

Yield 0.370 g (77%), m.p. 120–122 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 3355, 2927, 1709, 1670, 1276 and 1051. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.90 (s, H-18, 3H), 1.20 (s, H-19, 3H), 3.25 (m, $J = 3.5$ Hz, H-3, 1H), 3.52 (s, OH, 1H), 4.18 (s, 2H, H-21), 5.34 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 6.74 (s, H-16, 1H), 7.50 (s, H-Het., 1H), 7.70 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.32 (C-18), 20.01 (C-19), 62.15 (C-21), 71.78 (C-3), 121.04 (C-6), 141.23 (C-5), 141.38 (C-16), 141.47 (C-Het.), 144.83 (C-Het.), 196.66 (C-20). HRMS cal. for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$ 381.2416, found 381.2409.

2.2.7. 21-(1H-Imidazol-1-yl)-20,20-dimethoxy-16 α ,17 α -epoxy-3 β -(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-pregn-5-ene (6b)

This compound was obtained by the procedure described in the section 2.2.5 using 1H-imidazole (0.04 g, 0.61 mmol) and Cs_2CO_3 (0.40 g, 1.21 mmol).

Yield 0.083 g (78%), m.p. 90–92 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2935, 1377, 1258 and 1028. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.00 (s, H-18, 3H), 1.28 (s, H-19, 3H), 3.28 (s, OCH₃, 6H), 3.44 (m, $J = 3.4$, H-3, 1H), 3.67 (s, H-16, 1H), 3.90 (d, H-5' of protector group, 2H), 4.04 (s, H-21, 2H), 4.71 (t, H-1' of protector group, 1H), 5.35 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 7.12 (d, H-Het., 1H), 7.71 (d, H-Het., 1H), 8.27 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.30 (C-18), 19.90 (C-19), 49.52 (C-16), 50.00 (OCH₃), 55.5 (C-21), 63.02 (C-5' of protector group), 76.10 (C-3), 97.09 (C-17), 101.97 (C-1' of protector group), 115.01 (C-20), 121.23 (C-6), 141.29 (C-Het.), 141.31 (C-5), 141.89 (C-Het.), 151.55 (C-Het.). HRMS cal. for $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_5$ 526.3407, found 526.3411.

2.2.8. 3 β -Hydroxy-21-(1H-imidazol-1-yl)pregna-5,16-dien-20-one (I-OH)

The procedure to prepare this compound is the same as that previously described in section 2.2.6.

Yield 0.053 g (73%), m.p. 179–181 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 3334, 2930, 1707, 1668, 1277 and 1051. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 0.95 (s, H-18, 3H), 1.30 (s, H-19, 3H), 3.52 (m, $J = 3.5$ Hz, H-3, 1H), 3.66 (s, OH, 1H), 4.25 (s, 2H, H-21), 5.32 (d, $J = 5.3$ Hz, H-6, 1H), 6.74 (s, H-16, 1H), 7.04 (d, H-Het., 1H), 7.35 (d, H-Het., 1H), 7.78 (s, H-Het., 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.30 (C-18), 19.9 (C-19), 61.31 (C-21), 71.69 (C-3), 121.01 (C-6), 141.21 (C-5), 144.30 (C-16), 141.24 (C-Het.), 144.89 (C-Het.), 151.55 (C-Het.), 154.40 (C-17), 206–09 (C-20). HRMS cal. for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2$ 380.2464, found 380.2470.

Reagents and conditions: (i) H_2O_2 , NaOH 4N, 4 h; (ii) DHP, *p*-toluenesulfonic acid, 2 h; (iii) NaOH, $\text{C}_6\text{H}_5\text{I}(\text{OAc})_2$, MeOH, 3 h; (iv) SOCl_2 , Py, CH_2Cl_2 , 20 min; (v) a) 1,2,4-triazole, K_2CO_3 , 80 °C, 5 h; b) 1H-imidazole, K_2CO_3 , 80 °C, 5 h; (vi) HCl, CrCl_2 , CH_3COOH , 20 min.

2.3. Cell culture

PC-3, MCF7, SK-LU-1 and HeLa human cell lines were supplied by National Cancer Institute (NCI), USA. These lines were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 –95% air. Experimental procedures were performed with different supplemented medium as described in each section.

2.4. Cell cytotoxic assay with SRB

The cytotoxicity of 16-dehydropregnenolone acetate and I-OH was determined using the protein-binding dye SRB in microculture assay at a single concentration for the studied compounds and compared with Ketoconazole and T-OH previously reported [16].

The compounds were screened *in vitro* on PC-3, MCF7 and SK-LU-1, these cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin G sodium, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin sulfate, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B (Gibco[®]), and 1% of nonessential amino acids (Gibco[®]). The viability of these cells exceeds 95% as determined with trypan blue.

Cells were removed from the tissue culture flask and diluted with fresh media. From this cell suspension, 100 μL containing 5000 cells per well, were seeded in 96-wells tissue culture plates (Costar) and the material was incubated at 37 °C for 24 h. Furthermore, another plate was prepared with culture medium only and it was incubated for 1 h. Next, 100 μL of a solution of the compounds obtained by diluting the stocks were added to each well.

Cells were exposed for 48 h to the compounds at concentration of 50 μM . Then, the cells were fixed by the addition of cold 50% aqueous trichloroacetic acid and the plates were incubated at 4 °C for 1 h, washed with tap H_2O and air-dried. The trichloroacetic-acid-fixed cells were stained by the addition of 0.4% SRB as described [15]. Free SRB solution was removed by washing with 1% aqueous acetic acid. The samples were air dried, and the bound dye was solubilized with 100 μL (10 mM) of unbuffered Tris base. The plates were placed on a vortex for 5 min, and the absorption was determined at 515 nm using an ELISA plates reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA). Cell growth inhibition was calculated according to the following expression:

$$\text{cell growth inhibition(\%)} = \frac{100 - (\text{sample absorption})}{\text{vehicle absorption}} \times 100$$

Ketoconazole was used as control for this assay. This compound is an antimycotic drug that has previously been described as an agent that inhibits cytochrome P450 enzymes and has shown cytotoxic activity *in vitro* studies [18–20].

2.5. Cell proliferation assay with XTT method

The PC-3 cells were incubated in RPMI 1640, MCF7 in DMEM-HG and the SK-LU-1 in DMEM-F12 medium, all supplemented and with phenol red. The proliferation was determined using the colorimetric XTT assay Kit (Roche[®]). The T-OH and I-OH proliferative effects were evaluated at different concentrations and its inhibitory concentrations 20% and 50% (IC_{20} and IC_{50}) were determined.

For this assay, 1000 cells were seeded in 96-well tissue culture plates by sextuplicate. After 24 h, culture medium was removed and cells were incubated with T-OH or I-OH at different concentrations (1×10^{-10} – 1×10^{-4} M). Ethanol (0.1% v/v) was used as vehicle (V). The cells were incubated at 37 °C for 4 h (control plate) or 4 days (evaluation plates) using the colorimetric XTT assay according to manufacturer's instructions. The absorbance at 492 nm was determined in a microplate reader (BioTek, Winooski,

VT, USA). The IC₂₀ and IC₅₀ values were calculated by means of a scientific graphing software (Origin 5, OriginLab Corporation, Northampton MA) using a non-linear regression analysis with sigmoidal fitting based in a dose-response curve as described [21].

2.6. Gene expression analysis by qPCR

The cancer cells were incubated in the presence of different I-OH concentrations (1×10^{-9} – 1×10^{-4} M) or its vehicle.

Afterwards, medium was aspirated and total RNA was extracted using Trizol reagent and 1 µg was reverse transcribed using the transcriptor RT system (Roche, Germany).

The qPCR was carried out using the LightCycler Taqman Master System and the LightCycler 2.0 Instrument from Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The following protocol was used: Taq DNA polymerase activation and DNA denaturation at 95 °C for 10 min, proceeded by 45 amplification cycles, each cycle consisting of 10 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, and 1 s at 72 °C.

The genes studied related with cell proliferation were cyclin D1 (CCND1), cyclin E1 (CCNE1), Ki-67 and the potassium channel Ether-à-go-go (EAG1), while for apoptosis were BIM and survivin. Additionally, in order to establish a possible binding of the compounds to the VDR, the expression of CYP24A1 gene was evaluated with different concentrations of I-OH (1×10^{-9} – 1×10^{-6} M), in absence and presence of calcitriol (1×10^{-8} M). Expression levels were calculated after normalization to the housekeeping gene β-actin (internal control). Probes and primers were designed with the Universal Probe Library Assay Design Center from Roche, and they are reported in Table 1.

Data obtained from qPCR were analyzed using the statistical software Sigma Plot 12.0. The representative differences for dose-response were determined by One-Way ANOVA followed by appropriate post-hoc test (Holm-Sidak method for pair-wise comparisons). Data were expressed as the mean ± standard deviation (S.D.) and the differences were considered statistically significant at $P \leq 0.01$.

2.7. Plasmid and transfection in HeLa cell line

HeLa cells were plated the day before transfections, at 6 well plates in DMEM-HG medium without red phenol, supplemented with 5% stripped FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin [22]. Transfections were performed in triplicate using PolyFect™ (QIAGEN Inc., Valencia, CA) following the protocol provided by the manufacturer. The cells were co-transfected with 1.0 µg of the expression vector pLEN-hPRB or pSVhAR.BHEXE containing the coding sequence of the PR-B and AR, respectively; and 0.5 µg of reporter plasmid PRE-E1b-CAT which contains an oligonucleotide with a progesterone/androgen response element upstream of the adenovirus E1bTATA box fused to the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene [23]. Twenty-four hours later, the cells were treated with different concentrations of I-OH alone, or in combination with P₄ and 5α-DHT, or

the antagonists RU486 and FLUT. The plates were incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Ethanol was used as vehicle. The CAT activity was determined using 5 µg of protein, 10 µg of butyryl coenzyme-A (Sigma), 2×10^5 cpm of xylene-extracted [³H] chloramphenicol in 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0. The reporter plasmid and expression vectors used to transfect HeLa cells were kindly provided by Dr A. J. Cooney (Baylor College of Medicine).

2.8. Docking studies

To characterize the molecular interactions between the receptors and the synthesized compounds we performed a docking study. Considering the structural origin of these compounds, the progesterone receptor (PR: NR3C3) and androgen receptor (AR: NR3C4) were used as templates for the docking analysis. Additionally, vitamin D receptor (VDR: NR1H1) was evaluated.

The X-ray crystal structure of PR, AR and VDR of Petit-Topin, He and Moras complexes were used, these were obtained from Protein Data Bank (PDB) codes: 3D90, 1XQ3 and 1S19 respectively. PR (A/B chains) was co-crystallized with 13-β-ethyl-17-α-ethynyl-17β-hydroxygon-4-en-3-one [24], AR was co-crystallized with (17β)-17-hydroxy-17-methylestra-4,9,11-trien-3-one [25], and the VDR was co-crystallized with calcipotriol at the active site [26].

The geometry optimizations of these compounds were submitted by Molecular Mechanics using the MMFF94x force-field as implemented in the Spartan 10 program (Wave-function Inc. Irvine, CA), this optimized the structure conformers and the minimum energy of each compound were filtered. The torsional root and branches of the ligands were chosen utilizing MGLTools 1.5.4. Docking calculations were performed with AutoDock 4.2 [27] and Glide 5.7 softwares [28]. To perform Glide docking the ligands and the receptors were prepared with Maestro v9.8. [29].

A three-dimensional grid box of size 70Å × 70Å × 70Å, with 0.375Å spacing and centered at the amino acid GLN725 in PR, GLN711 in the AR and SER278 in VDR was performed to establish the possible interaction of the compounds with each receptor.

The parameters used in the docking study were: number of GA runs (25), the population (150), the energy evaluations (2,500,000), and the maximum number of top individuals that automatically survive (27,000). The best binding mode of each molecule was selected based on the lowest free binding energy. All molecular graphics figures were prepared with PyMOL [30].

3. Results

3.1. Chemistry

The synthetic pathways for the preparation of T-OH and I-OH are outline in Fig. 2. Commercially available 16-dehydropregnenolone acetate (1) was treated with hydrogen peroxide and sodium hydroxide 4 N to form the 16β,17β-epoxy compound 2 with a 71% yield. The hydroxyl group at C-3 was protected with 3,4-dihydro-

Table 1
Probes and primers used to the qPCR.

Gen/accession number	L-primer	R-primer	Probe number ^a
CCND1/NM_053056.2	ga agatcgtcgcca cctg	gacctctcctcgsccttct	67
CCNE1/NM_001238.1	ggcca aatcgacaggac	gggtctgcacaga ctgcat	36
Ki-67/X65550.1	ggtgtgcagaaa atcca aaga	actgtccatgactcttggtg	73
EAG1/AF078741.1	ctdggaggtgatcca aga tg	ccaa acacgtctcttttc	49
BIM/AY305716.1	gctgtggagcctga atcc	tcggctctggta atata tc	63
Survivin/AB154416.1	gccagtg tttcttctgctt	aaccggacgaa tgcctttta	11
CYP24A1/NM_000782.3	catcatggccatcaa aacaa	gcagctcga ctgga gtaga c	88
β-actin/NM_001101.3	ccaaccgcgaga agatga	ccagagcgtaca gtagatag	64

^a From the universal probe library (Roche).

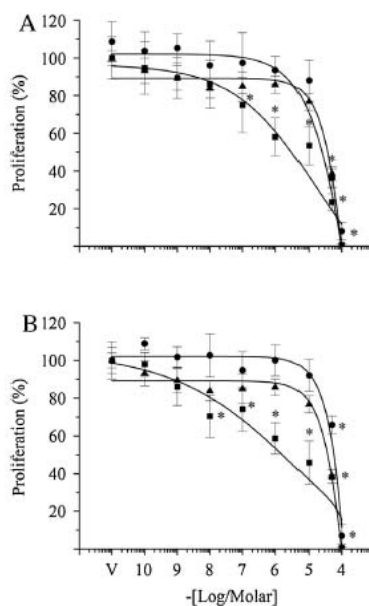


Fig. 3. Effects of **T-OH** and **I-OH** on proliferation of three different cancer cell lines. PC-3 (■), MCF7 (●) and SK-LU-1 (▲) were incubated with different concentrations of **T-OH** (A) and **I-OH** (B) during 4 days. Cell growth assays by the XTT colorimetric method were performed. Results are the mean \pm S.D. of sextuplicate and represented at least three different experiments. The vehicle (V) data were normalized to 100% for each experiment. * $P < 0.01$ vs. V.

2H-pyran and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate in dichloromethane to provide compound **3** with a 65% yield.

The oxidation of **3** with (diacetoxyiodo) benzene and sodium hydroxide in methanol generated the alcohol in C-21 thus affording compound **4** with a regular yield of 65%.

Treatment of **4** with thionyl chloride gave chlorinated compound **5** (80%). Similarly, it has been reported others methods to perform this same reaction [16,31].

Compound **6a** with a triazole ring at C-21, and **6b**, with an imidazole ring at C-21, were prepared in 73% and 78% respectively from **5** potassium carbonate or cesium carbonate and 1,2,4-triazole or imidazole, respectively in DMF 80 °C for 5 h. The 16 β ,17 β -epoxy elimination and C-3 hydrolysis were carried out with chromium chloride (II), hydrochloric acid and acetic acid affording **T-OH** and **I-OH** with 77% and 73% yield, respectively.

All synthesized compounds were isolated and the melting points showed a maximum of two degree difference. The desired compounds and intermediates were characterized by IR, ¹H NMR, ¹³C NMR and mass spectrometry.

3.2. Cytotoxic and metabolic effect

In this study, using SRB method was determined the cytotoxic effect of 16-dehydropregnenolone acetate and **I-OH** at 50 μ M concentration and compared with Ketoconazole and **T-OH** previously reported [16]. Similarly to Ketoconazole, **I-OH** showed a high cytotoxic activity in the three cancer cell lines: PC-3, MCF7 and SK-LU-1 compared with the precursor that had a weak effect. Likewise, **I-OH** was more effective than **T-OH** in PC-3 and MCF7 cells (data not shown).

Interestingly, using XTT method the compounds inhibited in a concentration-dependent manner the cell cancer growth (Fig. 3). As can be seen in Table 2, the IC₂₀ and IC₅₀ were calculated and the

order to inhibition by **T-OH** and **I-OH** was: PC-3 > MCF7 > SK-LU-1. Nevertheless, PC-3 cells were more sensitive to **I-OH** antiproliferative effect compared with **T-OH**, whereas in MCF7 and SKLU-1 cell lines, an equipotential effect was observed.

3.3. Effects of **I-OH** on different genes involved in proliferation or apoptosis

Since **I-OH** had better antiproliferative effect than **T-OH** gene expression studies were performed with **I-OH** for CCND1, CCNE1, Ki-67, EAG1, BIM, and survivin on three cell lines.

As depicted in Fig. 4, the gene expression of CCND1 and CCNE1 decreased in a concentration-dependent manner both in PC-3 and MCF7 line cells whereas Ki-67, EAG1, BIM and survivin gene expression was not affected significantly by **I-OH** (data not shown). In SK-LU-1 cell line a significant response on these genes was not observed (data not shown).

3.4. Molecular docking

The biological importance of pregnane derivatives lies on their structural similarities with P₄, and, at the same time, with some androgen derivatives, giving them progestogenic and androgenic

Table 2
Inhibitory concentrations (IC₂₀ and IC₅₀) values of **T-OH** and **I-OH** on a panel cancer cell lines studied.

Compound	IC	PC-3 (mol/L)	MCF7 (mol/L)	SK-LU-1 (mol/L)
T-OH	20	3.1 \times 10 ⁻⁷	4.1 \times 10 ⁻⁵	1.1 \times 10 ⁻⁴
	50	1.7 \times 10 ⁻⁵	3.6 \times 10 ⁻⁴	2.3 \times 10 ⁻⁴
I-OH	20	4.3 \times 10 ⁻⁹	4.1 \times 10 ⁻⁵	1.3 \times 10 ⁻⁴
	50	2.0 \times 10 ⁻⁶	1.9 \times 10 ⁻⁵	1.8 \times 10 ⁻⁴

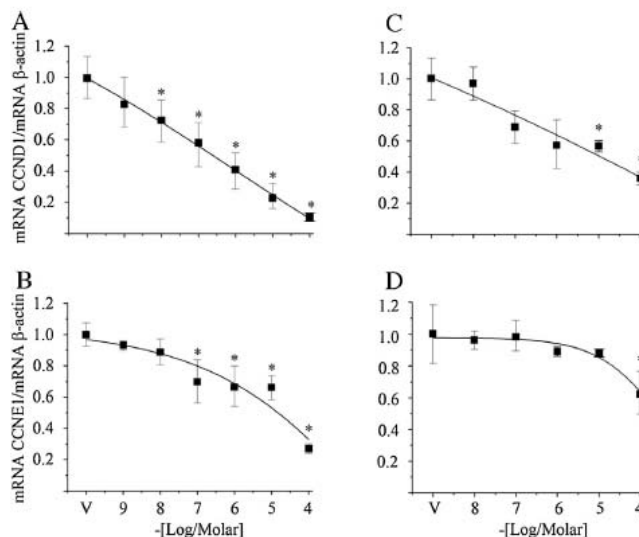


Fig. 4. Regulation of CCND1 and CCNE1 gene expression by I-OH. The PC-3 (A, B) and MCF7 (C, D) cells were incubated with different concentrations of I-OH. The mRNA was extracted and the qPCR was performed. Data are expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments per triplicate. Values were normalized by β -actin mRNA as housekeeping gene. Data were normalized to 1 for vehicle-treated cells (V). * $P < 0.01$ vs. V.

properties. In order to rationalize and visualize at molecular level the importance of the structural features of T-OH and I-OH and their implication in ligand-protein interaction, both compounds were docked into PR, AR and VDR model. The VDR was included because the synthesized compounds in this work also share a geometry, hydrogen bonding, binding free energy and structural chemical similitudes with the calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃), the hormonally active form of vitamin D [32].

In Table 3 is presented the lowest binding energy and cluster size conformation using AutoDock and Glide Score of the compounds and the natural ligands of each receptor.

As expected, the binding energies for P₄, 5 α -DHT and calcitriol showed highly affinity for their specific receptors as previously was reported [33,34] but not for the others compounds. Likewise, the Glide was a more effective tool to visualize and compare the binding energies between the natural ligands with its receptor.

Generally, T-OH and I-OH into PR, AR and VDR had similar energy but minor clusters size compared with P₄, 5 α -DHT and calcitriol, respectively. The Fig. 5 shows the proposed binding models for these binding energies. The results suggested that the compounds induce conformational changes on PR and these modifications possibly block P₄ interactions with the GLN725 amino acid in the B chain [25]. On the other hand, none compound binds suitably in the binding pocket of the AR.

Interestingly, the analyses using VDR demonstrated that both compounds were docked into the VDR ligand binding domain, with similar interactions that the calcitriol. The interactions observed are based in hydrogen bonds with TYR 143, HIS 305 and HIS 397 residues. Strong interactions are considered those with less than 4 angström (Å) between atoms, suggesting an interaction with the VDR in live systems.

3.5. Transfection studies on HeLa cell line

To address the question as to whether I-OH elicits agonistic or antagonistic actions comparable to those previously observed for P₄ and 5 α -DHT or RU486 and FLUT respectively, we used *in vitro* reporter gene assays. In general, results showed that I-OH did not stimulate reporter gene transcription, which discarded the progestagenic (Fig. 6A) and androgenic activity by I-OH (data not shown). However, I-OH partially inhibited the P₄ effect on the transcriptional activity indicated an antiprogestagenic effect (Fig. 6B) whereas no effect of I-OH was observed upon reporter gene activation induced by 5 α -DHT (data not shown). These results indicated that I-OH did not act as antiandrogenic compound.

Unfortunately, we do not have VDR plasmid, therefore gene CYP24A1 expression was evaluated which is a gene highly induced

Table 3
Binding energies and cluster size of T-OH and I-OH in the PR, AR and VDR model.

Compound	PR			AR			VDR		
	Glide score ΔG_{bind} (Kcal/mol)	AutoDock ΔG_{bind} (Kcal/mol)	Cluster size	Glide score ΔG_{bind} (Kcal/mol)	AutoDock ΔG_{bind} (Kcal/mol)	Cluster size	Glide score ΔG_{bind} (Kcal/mol)	AutoDock ΔG_{bind} (Kcal/mol)	Cluster size
P ₄	-12.2	-9.42 ^a	17	-5.8	-6.94 ^a	5	-8.1	-9.28 ^a	11
5 α -DHT	-5.8	-6.86 ^a	4	-10.8	-8.99 ^a	21	-7.5	-8.68 ^a	11
Calcitriol	-5.2	-6.25 ^a	3	-5.1	-6.21 ^a	3	-13.3	-9.91 ^a	17
T-OH	-7.3	-8.45	7	-5.4	-6.37 ^a	9	-9.8	-10.63 ^a	8
I-OH	-7.4	-7.47	6	-7.4	-8.23 ^a	8	-8.5	-9.61 ^a	7

^a Lowest energy conformation for each compound.

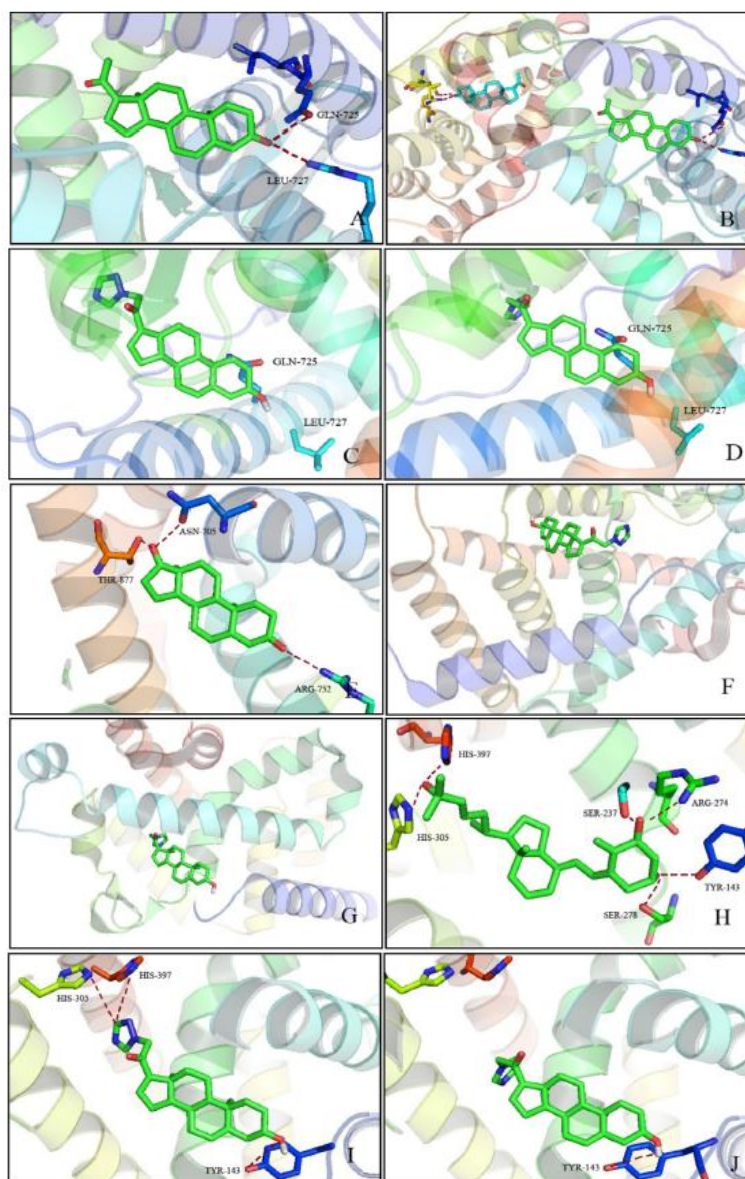


Fig 5. Molecular docking studies that show binding interactions of **T-OH** and **I-OH** with hormonal receptors. PR: A) P₄, B) P₄ on chain A and chain B of PR, C) **T-OH** and D) **I-OH** on PR in B chain; AR: E) 5 α -DHT, F) **T-OH** and G) **I-OH**; VDR: H) Calcitriol, I) **T-OH**, J) **I-OH**. A, D and G were the natural ligands used as controls to compare the energies and the spatial distribution.

by calcitriol. However, **I-OH** was incapable to induce the mRNA of this enzyme (data not shown).

4. Discussion

Over the last years, a large number of molecules have been modified and synthesized as potential inhibitors of proliferative

process to be used as anticancer treatment, and the steroids are not the exception [10–17,35–37]. Particularly, Bratoeff E, et al., showed that a synthetic compound from dehydroepiandrosterone with an ester moiety at C-3 and an imidazole group at C-17 (16-formyl-17-(1*H*-imidazol-1-yl) androsta-5,16-diene-3 β -yl) inhibited both the biological activity of 5 α -reductase type 1 as well as cell proliferation of the human prostate cancer cell line; PC-3 [15].

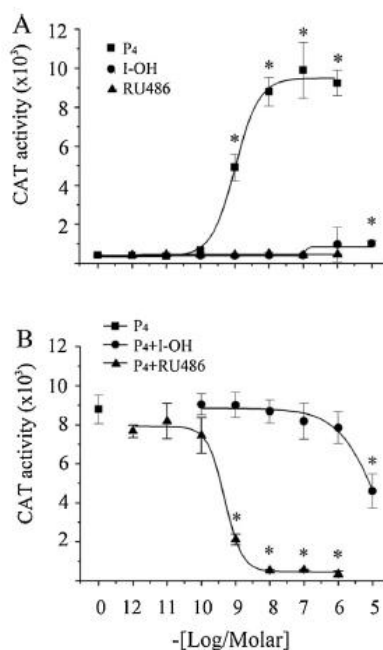


Fig. 6. Antiprogesteragenic activity of **I-OH**. HeLa cells transfected were incubated in absence or presence of different concentrations of **I-OH**, **P₄** and RU486 (A). Cells were treated with **P₄** (1×10^{-8} M) alone or plus increased concentration of **I-OH** or RU486 (B). The results are the mean \pm S.D. of the transactivation of PR-B of three independent experiments per triplicate. * $P \leq 0.01$ vs. 0.

Similarly, Banday A. et al., reported a series of novel D-ring substituted 1,2,3-triazolyl 20-keto pregnenane derivatives. Among these compounds 21-[4-[(4-acetylphenoxy) methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-3-hydroxypregn-5-en-20-one was the most active, especially against proliferation of DU-145 and PC-3 cell lines [17]. Recently, was reported the synthesis and biological activity of new 16-dehydropregnenolone derivatives with a triazole moiety at C-21 [16]. Herein, we compared two compounds that contain each one a triazole and imidazole moiety at C-21, respectively. As expected, these compounds showed antiproliferative effects on PC-3, MCF-7 and SK-LU-1 cancer cell lines. Interestingly, **I-OH** compound had higher antiproliferative activity than **T-OH**, showing a preferential inhibition upon PC-3 cells. These results show that the imidazole moiety into the molecular structure of the steroid improved its biological activity.

In addition, we demonstrated that CCND1 and CCNE1 gene were downregulated by **I-OH** treatment in PC-3 and MCF7 cells. These cyclins are key components of the core cell cycle machinery; CCND1 is a key positive regulator of the G1-S phase transition and its overexpression is implicated in genesis and progression of some neoplasms [38]. Likewise, it has been reported that upregulation CCND1 might be related to the evolution of androgen-independent disease in prostate cancer [39,40]. In the same way, the CCNE1 protein is tightly related as an endpoint of several regulatory pathways that are critical for growth control and frequently are altered in cancer cells. CCNE1 in conjunction with its kinase subunit Cdk2 regulates essential processes at the G1-S phase boundary of the cell cycle. CCNE1 gene is undetectable in G0 and G1 phases of the cell cycle, but it rises sharply during of time that precedes each entry into S phase [41,42].

On the basis of these findings, we suggest that **I-OH** avoids the accumulation and activity of cyclin dependent kinase 4 (Cdk4)/

CCND1 complex, and hyperphosphorylation of the retinoblastoma protein as well as affects the regulation of the progression through the restriction point R at the end of the G1-phase to allow cells to enter S-phase [43,44]. On the other hand, Ki-67, EAG1, BIM and survivin genes were not significantly altered, which indicates that these proteins are not involved in the antiproliferative effect by **I-OH**. Collectively, this study proposes that **I-OH** affects directly the cell cycle progression of both MCF7 and PC-3 cells. In the case of SK-LU-1, none gene studied was significantly modified, thus others molecular targets deserve further investigation to this cell type.

Lastly, to elucidate the potential interaction between **T-OH** and **I-OH** with hormonal receptors we use molecular docking simulations. Results suggest that these synthetic compounds bind to the hormone binding pocket into PR and induce conformational changes to interfere with natural agonist activity by competitive binding and thus have antagonist action [45]. Indeed, the experimental results from transfection assays with the PR in HeLa cells showed weak antiprogesteragenic properties by **I-OH**. The functional significance of this is unknown but has been showed that **P₄** and some synthetic derivatives had a proliferative action in some cancers and inducing the gene CCND1 expression. In fact, in the progression from normal to malignant breast cells, the expression of the two PR isoforms (A and B) is altered, and more aggressive breast cancers are associated with a predominance of either one of isoforms [46]. Contrary to **P₄**, some synthetic pregnane derivatives abolished the hyper-proliferative process and downregulated the cyclins expressions. It is possible that **T-OH** and **I-OH** act as antagonist of PR blocking cyclins activation during cancer, which deserves further study.

Conversely, the transfection assays with the AR, **I-OH** did not have androgenic or antiandrogenic effect compared with 5 α -DHT or FLUT respectively. These results demonstrated that effect of **I-**

OH is AR-independent pathway and this corresponds with the effect observed in the PC-3 cells that is lacking of AR and was the most sensitive cell line for this treatment.

Considering, that the synthesized compounds also share structural and chemical similarities with the calcitriol, a hormone with antiproliferative effects, that use VDR signaling to affect target genes in multiple cancer cells. Additionally, we complete docking study using the VDR. Although the cluster size is lower, these values indicated a possible interaction with the pocket domain into VDR. Nonetheless, the experimental result showed that I-OH was not able to induce the mRNA expression of CYP24A1, a gene highly inducible by calcitriol via VDR, which discards totally, that the antiproliferative effect uses the VDR pathway. Taken together, these data are consistent with previous computer-based quantitative structure-activity relationship studies of ligand-receptor interactions [33,34].

It is worth to mention that antiproliferative activity of these compounds can also be attributed to the nature of the azole groups [10,12,47]. These groups are highly soluble in water and are classified as aromatic compounds because have a sextet of π -electrons, these characteristics given to the azol group a higher nucleophilic character [48]. Therefore, these groups allowed strong hydrogen bonds formation of the steroidal compound with polar active groups in the cells and as a result of this [49], a stronger cytotoxic effect.

On the other hand, it has been reported that a number substituted imidazoles act as selective inhibitors of nitric oxide synthase and Heme oxygenases, crucial enzymes that are involved in the proliferative process [50,51]. Alternatively, the biological activities of the imidazole pharmacophore are related to the downregulation of intracellular Ca^{++} and K^+ fluxes that as consequence interference with translation initiation [50,52]. This last part showed some interesting possibilities that deserve more research to understand its mechanism biological.

In summary, results presented herein show that the 16-dehydropregnenolone derivatives were successfully synthesized and had antiproliferative activity upon three cancer cell lines. Interestingly, the PC-3 cells were more sensitive to I-OH antiproliferative effect. In addition, we also demonstrated that I-OH downregulated the mRNA expression of two cyclins key to cell cycle machinery both in PC-3 and MCF7, suggesting that antiproliferative effect of T-OH and I-OH involved the inhibition of CCND1 and CCNE1 in these cells. On the other hand, the experimental results demonstrated that I-OH had an antagonist effect upon PR and discard completely the AR or VDR pathways as possible action mechanism upon antiproliferative process. Nevertheless, the modification of structure steroidal by imidazole and triazole moieties suggests that these compounds use alternative routes to inhibit this process which deserve further investigation. As a concluding remark, these steroidal molecules, could offer a therapeutic alternative for patients with cancer.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the National Council of Science and Technology, CONACYT Mexico (grant number 165049; 154215) and DGAPA project IN 211312 (UNAM), thank for their generous financial support.

A.V. Silva-Ortiz is a Ph.D. Student from Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM, under a fellowship (No. 258067) from CONACYT, México.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.013>.

References

- [1] A.H. Payne, D.B. Hales, Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones, *Endocr. Rev.* 25 (2004) 947–970.
- [2] P.M. Yen, Classical nuclear hormone receptor activity as a mediator of complex biological responses: a look at health and disease, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29 (2015) 517–528.
- [3] M.A. Craig, G.A. Beppler, C. Santos, R.B. Raffa, A second (non-genomic) steroid mechanism of action: possible opportunity for novel pharmacotherapy? *J. Clin. Pharm. Ther.* 30 (2005) 305–312.
- [4] S.R. Denmeade, J.T. Isaacs, A history of prostate cancer treatment, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 389–396.
- [5] E. Frank, G. Schneider, Synthesis of sex hormone-derived modified steroids possessing antiproliferative activity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 137 (2013) 301–315.
- [6] D.Q. Li, Z.B. Wang, J. Bai, J. Zhao, Y. Wang, K. Hu, Y.H. Du, Effects of mifepristone on proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 in vitro, *World J. Gastroenterol.* 10 (2004) 2628–2631.
- [7] R. Minorics, N. Bozsity, J. Wollfing, E. Merynyak, G. Schneider, A. Markó, G. Falkay, I. Ocsosvzki, I. Zupko, Antiproliferative effect of normal and 13-epi-D-homoestrone and their 3-methyl ethers on human reproductive cancer cell lines, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132 (2012) 168–175.
- [8] T. Nishiyama, Androgen deprivation therapy in combination with radiotherapy for high-risk clinically localized prostate cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 129 (2012) 179–190.
- [9] S.T. Pearce, V.C. Jordan, The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 50 (2004) 3–22.
- [10] M. Ibrahim-Ouali, L. Rocheblave, Recent advances in azasteroids chemistry, *Steroids* 73 (2008) 375–407.
- [11] G.A. Elmegeed, W.K. Khalil, R.M. Mohareb, H.H. Ahmed, M.M. Abd-Elhalim, G. H. Elsayed, Cytotoxicity and gene expression profiles of novel synthesized steroid derivatives as chemotherapeutic anti-breast cancer agents, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 6860–6872.
- [12] S. Aggarwal, S. Thareja, A. Verma, T.R. Bhardwaj, M. Kumar, An overview on 5 α -reductase inhibitors, *Steroids* 75 (2010) 109–153.
- [13] G. Szaloki, A. Pantzou, K.C. Prousis, O. Mavrofydi, P. Papazafiri, T. Calogeropoulou, Design and synthesis of 21-alkynylaryl pregnenolone derivatives and evaluation of their anticancer activity, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6980–6988.
- [14] M. Zhang, X. Li, C. Xiang, Y. Qin, J. He, B.C. Li, P. Li, Cytotoxicity of pregnane glycosides of *Cynandrum otophyllum*, *Steroids* (2015).
- [15] E. Bratoeff, M. Garrido, T. Ramirez-Apan, Y. Heuze, A. Sanchez, J. Soriano, M. Cabeza, Effect of dehydroepiandrosterone derivatives on the activity of 5 α -reductase isoenzymes and on cancer cell line PC-3, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6233–6241.
- [16] A.V. Silva-Ortiz, E. Bratoeff, T. Ramirez-Apan, Y. Heuze, A. Sanchez, J. Soriano, M. Cabeza, Synthesis and activity of novel 16-dehydropregnenolone acetate derivatives as inhibitors of type 15 α -reductase and on cancer cell line SK-LU-1, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23 (2015) 7535–7542.
- [17] A. Banday, M. Verma, S. Srikakulam, B. Gupta, S. Kumar, D-ring substituted 1,2,3-triazolyl 20-keto pregnenanes as potential anticancer agents: synthesis and biological evaluation, *Steroids* 75 (2010) 801–804.
- [18] H. Vanden Bossche, Inhibitors of P450-dependent steroid biosynthesis: from research to medical treatment, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43 (1992) 1003–1021.
- [19] S. Wilkinson, G. Chodak, An evaluation of intermediate-dose ketoconazole in hormone refractory prostate cancer, *Eur. Urol.* 45 (2004) 581–584; discussion 585.
- [20] C.F. Rochlitz, L.E. Damon, M.B. Russi, A. Geddes, E.C. Cadman, Cytotoxicity of ketoconazole in malignant cell lines, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 21 (1988) 319–322.
- [21] N. Santos-Martinez, L. Diaz, D. Ordaz-Rosado, J. Garcia-Quiroz, D. Barrera, E. Avila, A. Halhali, H. Medina-Franco, M.J. Ibarra-Sanchez, J. Esparza-Lopez, J. Camacho, F. Larrea, R. Garcia-Becerra, Calcitriol restores antiestrogen responsiveness in estrogen receptor negative breast cancer cells: a potential new therapeutic approach, *BMC Cancer* 14 (2014) 230.
- [22] R. Garcia-Becerra, D. Ordaz-Rosado, G. Noe, B. Chavez, A.J. Cooney, F. Larrea, Comparison of 7 α -methyl-19-nortestosterone effectiveness alone or combined with progestins on androgen receptor mediated-transactivation, *Reproduction* 143 (2012) 211–219.
- [23] F. Larrea, R. Garcia-Becerra, A.E. Lemus, G.A. Garcia, G. Perez-Palacios, K.J. Jackson, K.M. Coleman, R. Dace, C.L. Smith, A.J. Cooney, A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER alpha, *Endocrinology* 142 (2001) 3791–3799.
- [24] I. Petit-Topin, N. Turque, J. Fagart, M. Fay, A. Ulmann, E. Gainer, M.E. Rafestín-Oblin, Met909 plays a key role in the activation of the progesterone receptor and also in the high potency of 13-ethyl progestins, *Mol. Pharmacol.* 75 (2009) 1317–1324.

- [25] B. He, R.T. Gampe Jr., A.J. Kole, A.T. Hnat, T.B. Stanley, G. An, E.L. Stewart, R.I. Kalman, J.T. Minges, E.M. Wilson, Structural basis for androgen receptor interdomain and coactivator interactions suggests a transition in nuclear receptor activation function dominance, *Mol. Cell* 16 (2004) 425–438.
- [26] G. Tocchini-Valentini, N. Rochel, J.M. Wurtz, D. Moras, Crystal structures of the vitamin D nuclear receptor liganded with the vitamin D side chain analogues calcipotriol and seocalcitol, receptor agonists of clinical importance. Insights into a structural basis for the switching of calcipotriol to a receptor antagonist by further side chain modification, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1956–1961.
- [27] M.F. Sanner, Python: a programming language for software integration and development, *J. Mol. Graphics Modell.* 17 (1999) 57–61.
- [28] Glide, version 5.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011.
- [29] Maestro, version 9.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014.
- [30] The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.3, Schrödinger, LLC. <http://www.pymol.org>.
- [31] N.K. Girdhar, M.P. Ishar, Facile C21 functionalization through a novel functional group transfer reaction in 16 α ,17 α -epoxy-3 β -hydroxypregn-5-en-20-one and its applications, *Chem. Commun.* 18 (2002) 2102–2103.
- [32] A.V. Krishnan, D. Feldman, Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51 (2011) 311–336.
- [33] T.N. Hasan, B. LeenaGrace, T.A. Masoodi, G. Shafi, A.A. Alshatwi, P. Sivashanmugham, Affinity to estrogens for human progesterone receptor A and B monomers and risk of breast cancer: a comparative molecular modeling study, *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* 4 (2011) 19–36.
- [34] H.E. Smith, R.G. Smith, D.O. Toft, J.R. Neergaard, E.P. Burrows, B.W. O'Malley, Binding of steroids to progesterone receptor proteins in chick oviduct and human uterus, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 5924–5932.
- [35] M. Garrido, M. Cabeza, F. Cortes, J. Gutierrez, E. Bratoeff, Cytotoxic effect of novel dehydroepiandrosterone derivatives on different cancer cell lines, *Eur. J. Med. Chem.* 68 (2013) 301–311.
- [36] V.M. Moreira, T.S. Vasaitis, Z. Guo, V.C. Njar, J.A. Salvador, Synthesis of novel C17 steroidal carbamates. Studies on CYP17 action, androgen receptor binding and function, and prostate cancer cell growth, *Steroids* 73 (2008) 1217–1227.
- [37] V.C. Njar, K. Kato, I.P. Nnane, D.N. Grigoryev, B.J. Long, A.M. Brodie, Novel 17-azolyl steroids, potent inhibitors of human cytochrome 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase (P450(17) α): potential agents for the treatment of prostate cancer, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 902–912.
- [38] V. Baldin, J. Lukas, M.J. Marcote, M. Pagano, G. Draetta, Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1, *Genes Dev.* 7 (1993) 812–821.
- [39] M. Drobnjak, I. Osman, H.I. Scher, M. Fazzari, C. Cordon-Cardo, Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1891–1895.
- [40] K.M. Kaukonen, H.E. Rauhala, M. Scaravilli, L. Latonen, M. Annala, R.L. Vessella, M. Nykter, T.L. Tammela, T. Visakorpi, Epigenetically altered miR-193b targets cyclin D1 in prostate cancer, *Cancer Med* 4 (2015) 1417–1425.
- [41] J.M. Gudas, M. Payton, S. Thukral, E. Chen, M. Bass, M.O. Robinson, S. Coats, Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 612–622.
- [42] T. Moroy, C. Geisen, E. Cyclin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 1424–1439.
- [43] R.G. Pestell, New roles of cyclin D1, *Am. J. Pathol.* 183 (2013) 3–9.
- [44] S. Lim, P. Kaldis, Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation, *Development* 140 (2013) 3079–3093.
- [45] P. Yen, Classical nuclear hormone receptor activity as a mediator of complex biological responses: a look at health disease, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29 (2015) 517–528.
- [46] O.T. Hernandez-Hernandez, I. Camacho-Arroyo, Regulation of gene expression by progesterone in cancer cells: effects on cyclin D1 EGFR and VEGF, *Mini Rev. Med. Chem.* 13 (2013) 635–642.
- [47] S. Aggarwal, S. Thareja, A. Verma, T.R. Bhardwaj, M. Kumar, An overview on 5 α -reductase inhibitors, *Steroids* 75 (2016) 109–153.
- [48] A.R. Katritzky, C.A. Ramsden, J.A. Joule, V.V. Zhdankin, *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, third ed., Elsevier, UL: Kidlington Oxford, 2010, pp. 87–98.
- [49] G.M. Cooper, R.E. Hausman, *The Cell: A Molecular Approach*, second ed., Sinauer Associates, Sunderland (MA), 2000.
- [50] R.G. Bogle, G.S. Whitley, S.C. Soo, A.P. Johnstone, P. Vallance, Effect of anti-fungal imidazoles on mRNA levels and enzyme activity of inducible nitric oxide synthase, *Br. J. Pharmacol.* 111 (1994) 1257–1261.
- [51] L. Salerno, V. Pittala, G. Romeo, M.N. Modica, A. Marrasso, M.A. Siracusa, V. Sorrenti, C. Di Giacomo, L. Vanella, N.N. Parayath, K. Greish, Novel imidazole derivatives as heme oxygenase-1 (HO-1) and heme oxygenase-2 (HO-2) inhibitors and their cytotoxic activity in human-derived cancer cell lines, *Eur. J. Med. Chem.* 96 (2015) 162–172.
- [52] T. Castano, A. Encinas, C. Perez, A. Castro, N.E. Campillo, C. Gil, Design, synthesis, and evaluation of potential inhibitors of nitric oxide synthase, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 6193–6206.

De: Kim Janda (Bioorganic & Medicinal Chemistry) [mailto:EviseSupport@elsevier.com]

Enviado el: jueves, 12 de enero de 2017 06:02 p. m.

Para: marisa@correo.xoc.uam.mx

Asunto: Your manuscript BMC_2016_449_R1 has been accepted

Ref: BMC_2016_449_R1

Title: Synthesis of new derivatives of 21-imidazolyl-16-dehydropregnenolone as inhibitors of 5 α -reductase 2 and with cytotoxic activity in cancer cells

Journal: Bioorganic & Medicinal Chemistry

Dear Dr. Cabeza,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. My own comments as well as any reviewer comments are appended to the end of this letter. Now that your manuscript has been accepted for publication it will proceed to copy-editing and production.

Thank you for submitting your work to Bioorganic & Medicinal Chemistry. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Kim Janda
Regional Editor
Bioorganic & Medicinal Chemistry

Synthesis of new derivatives of 21-imidazolyl-16-dehydropregnenolone as inhibitors of 5 α -reductase 2 and with cytotoxic activity in cancer cells

Aylin Viviana Silva-Ortiz^a, Eugene Bratoeff[†], Teresa Ramírez-Apan^b, Yvonne Heuze^c, Juan Soriano^d, Isabel Moreno^c, Marisol Bravo^c, Lucero Bautista^c, and Marisa Cabeza^{c*}

† RIP

^a Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Copilco Universidad, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, CDMX México

^b Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Copilco Universidad, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, CDMX México

^c Departamento de Sistemas Biológicos y de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100. Col. Villa Quietud, 04960 Ciudad de México. CDMX México

^d Departamento de Patología, Hospital General de México, Dr. Balmis 148, México, CDMX

ASO: aylinsilva@hotmail.es
TRA: mtrapan@unam.mx
YH: ymheuze@gmail.com
JS: juansorianor@hotmail.com
IM: catrina_04@hotmail.com
MB: braru27@gmail.com
LB: guci_luz01@hotmail.com
MC: marisa@correo.xoc.uam.mx

***Address correspondence to:**

Marisa Cabeza Ph.D.
Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
Calzada Del Hueso No. 1100
México, CDMX, C.P. 04960, México
Phone: [011-52-55] 5483-72-60
Fax: [011-52-55] 5483-72-60
E-mail: marisa@correo.xoc.uam.mx

Abstract

The aim of this study was to synthesize several 16-dehydropregnenolone derivatives containing an imidazole ring at C-21 and a different ester moiety at C-3 as inhibitors of 5 α -reductase 1 and 2 isoenzymes. Their binding capacity to the androgen receptor (AR) was also studied.

Additionally, we evaluated their pharmacological effect in a castrated hamster model and their cytotoxic activity on a panel of cancer cells (PC-3, MCF7, SK-LU-1).

The results showed that only the derivatives with an alicyclic ester at C-3 showed 5 α -R2 enzyme inhibition activity, the most potent of them being 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclohexanecarboxylate with an IC₅₀ of 29 nM. This is important because prostatic benign hyperplasia is directly associated with the presence of 5 α -R2. However, all the derivatives failed to inhibit 5 α -R1 or bind to the AR. These alicyclic ester derivatives decreased the weight and size of androgen-dependent glands in the hamster, indicating they are very active *in vivo* and are not toxic. In addition, the 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-acetate derivative showed the highest cytotoxic activity on the three cancer cell lines studied.

It is therefore important in the synthesis of steroidal compounds to consider the size of the ester moiety at C-3 of the steroid skeleton, which is key in obtaining biological activity, as observed in this experiment.

Key words

16-dehydropregnenolone acetate derivatives, alicyclic ester moiety at C-3 of the steroidal skeleton, 5- α -reductase, cytotoxic activity, cell lines: PC-3, MCF7, SK-LU-1.

1. Introduction

Prostate cancer (PC) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are two of the major conditions that currently affect the male population over 45 years old. PC is the second leading cause of cancer death, and BPH is the second cause of surgery in some countries; for example the United States [1]. Both diseases are directly related to an excess of androgens in the body.

The main androgens produced by the body are testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT). Testosterone, the best known androgen, is converted to DHT, a more potent androgen, by the action of 5α -reductase isoenzymes. The activity of these isoenzymes in androgen-dependent tissues has long been known; DHT is responsible for sending a signal to induce prostate growth, which in pathological conditions produces the development of both diseases [2]. The three 5α -reductase isoenzymes are expressed in different human tissues [3]. Type 1 isoenzyme (5α -R1) is expressed in prostate epithelial cells and is directly related to prostate cancer. Type 2 (5α -R2) is associated with development of benign prostatic hyperplasia [4] and is found mostly in the prostate, seminal vesicles and genital skin. Type 3 (5α -R3) is related to hormone-refractory prostate cancer (HRPC) and is found in the brain and pancreas [5-6]. Unfortunately, these three isoenzymes have not been purified and crystallized, due to their unstable nature, and as a result, the 5α -R inhibitors have been designed based on structure-activity studies. Two of these compounds are finasteride and dutasteride. Both are 4-azasteroids currently used in CP and BPH with undesirable secondary antiandrogen effects such as impotence, muscle growth impairment, and gynecomastia [7]. Also, their use for long periods can have a potential hepatotoxic effect [8]. Many different compounds are currently being studied with

the aim of decreasing these unwanted effects and enhancing the therapeutic effect for a successful prostate cancer treatment.

Nowadays a variety of many drugs used in the treatment of different steroid-dependent and independent diseases, have a heterocyclic group in their structure, for example the aminoglutethimide and its derivatives; esters of 4-pyridineacetic acid; bis-chlorophenyl-pyrimidine analogues; as well as imidazole and triazole derivatives, such as, liarozole, fadrozole, CGS 18320 B, vorozole and CGS 20267 [9-10]. In particular, various biological studies have demonstrated that some pregnane 21 and 16-derivatives have interesting activity, such as an antiproliferative effect, on different cancer cell lines and 5α -reductase inhibition. [9-21].

On this basis, we synthesized and determined the biological activity of a novel series of 21-(1*H*-imidazole)-5-16-pregnadiene-20-one-2-yl derivatives (**8a–j**; see below) as inhibitors of type 1 and 2 5α -reductase isoenzymes. We determined their androgen receptor (AR) binding capacity and their antiproliferative effect on the following cancer cell lines: PC-3 (prostate), MCF7 (breast) and SK-LU-1 (lung). The pharmacological effect was evaluated in a hamster model.

These experiments were designed to complement a previously reported study of a molecule with a triazole group at C-21 on a pregnane skeleton [12, 15] and to compare the importance of the azole group on the biological activity.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Reagents and solvents were purchased from commercial sources and were used without further purification. Melting points (uncorrected) were determined on a Fisher Johns melting point apparatus. Infrared spectra (IR) were recorded on a Perkin-Elmer 200 spectrometer (Perkin-Elmer Life and Analytical Science, Shelton CT, USA). ^1H and ^{13}C NMR were taken on a Varian VRX-400 spectrometer (MR resources NC, USA) operating at 400 (^1H) and 100 (^{13}C) MHz with tetramethylsilane (TMS) as internal standard ($\delta=0$) in CDCl_3 (the abbreviations of signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet). High resolution mass spectra (HRMS) were obtained with a Thermo DFS spectrometer by direct infusion and using the FAB^+ ionization mode (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA USA).

(1,2,6,7- ^3H) Testosterone [^3H] T specific activity: 95 Ci/mmol and Mibolerone (17 α -methyl- ^3H) [^3H] MIB 10 specific activity 70–87 Ci/mmol were provided by Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA).

Radioinert T, 5 α -DHT, and MIB were supplied by Steraloids (Wilton, NH, USA). Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) provided NADPH. Finasteride was obtained by extraction from Proscar[®] (Merck, Sharp & Dohme). The tablets were crushed, extracted with chloroform and the solvent was eliminated in vacuum; the crude product was purified by silica gel 60 (63–200 μm) column chromatography (Sigma–Aldrich) with ethyl acetate as eluent. The melting point of the isolated finasteride (252–254 $^\circ\text{C}$) was identical to that reported in the literature.

16-dehydropregnenolone acetate and ketoconazole used as a reference compound were purchased from Sigma Life Sciences.

2.2. Synthesis of 16-dehydropregnenolone derivatives (8a-j)

Steroids **8a-j** (Fig. 1) were prepared from the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate (**1**) with the synthesis of their intermediate compounds being previously reported by our group. [15] The synthetic pathways for the preparation of **8a-j** are briefly outlined in Fig. 1

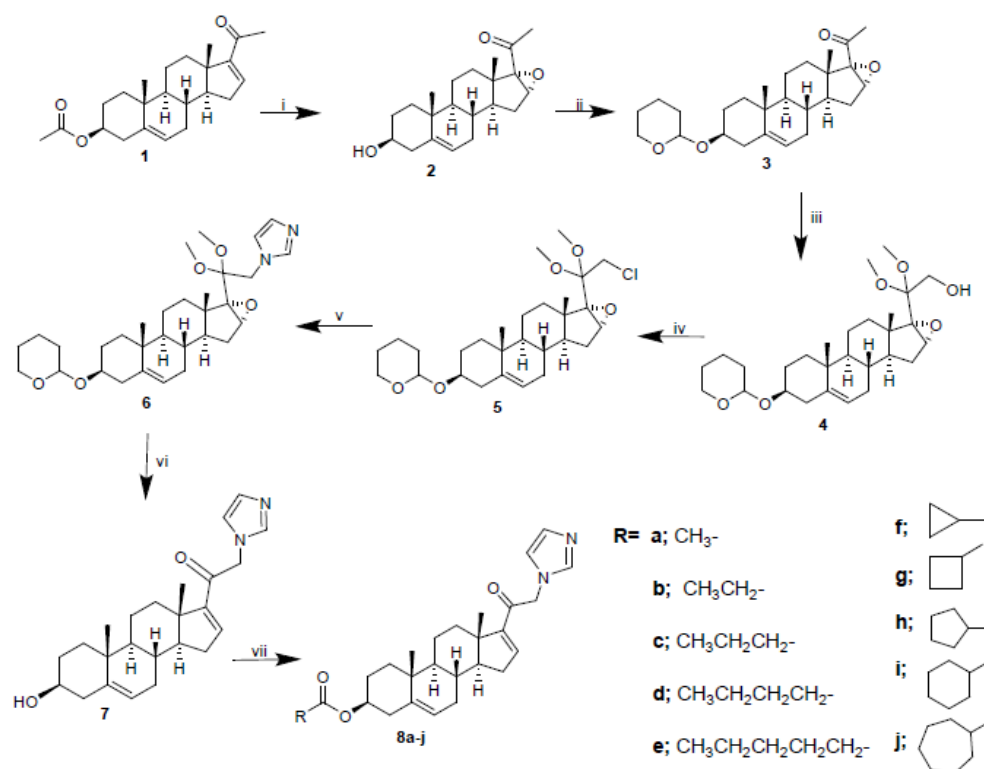


Figure. 1. Figure. 1. Reagents and conditions: (i) H₂O₂, NaOH 4N; (ii) DHP, p-toluensulphonic acid; CH₂Cl₂(iii) NaOH, C₆H₅I(OAc)₂, MeOH; (iv) SOCl₂, Py, CH₂Cl₂; (v) 1H-imidazole, Cs₂CO₃, 80 °C, 5 h; (vi) HCl, CrCl₂, CH₃COOH, 20 min.; (vii) a) acetic anhydride, Py; b-j) R-COOH, DCC, DMAP, CHCl₃.

Synthesis of 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl derivatives (8a–j in Fig. 1)

2.2.1.1. Preparation of 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-acetate (8a in Fig. 1).

The synthesis of this compound was carried out starting with a solution of steroid 7 [15] (0.1 g, 2.62 mmol) in pyridine (0.4 mL) and acetic anhydride (0.4 mL). This mixture was stirred at room temperature for 1 h. After, a solution of water and salt was added and the precipitate formed was filtered. The compound was washed with water 3 times.

Yield 0.10 g (90%), m.p. 105–108 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2937, 1729, 1236 and 1031. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.10 (s, H-18, 3H), 1.30 (s, H-19, 3H), 2.03 (t, ester-H-2', 3H), 3.90 (m, $J = 3.2$ Hz, H-3, 1H), 4.65–4.87 (ABq, $J = 16.4$ Hz, H-21, 2H), 5.35 (d, $J = 5.9$ Hz, H-6, 1H), 6.73 (s, $J = 6.7$, C-16, 1H), 7.04 (s, H-Het, 1H), 7.32 (s, H-Het, 1H), 7.69 (s, H-Het, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.40 (C-18), 20.30 (C-19), 21.0 (C-2' of ester), 65.60 (C-21), 74.07 (C-3), 121.96 (C-6), 140.03 (C-Het), 140.10 (C-5), 144.21 (C-Het), 147.20 (C-16), 152.04 (C-Het), 156.00 (C-17), 170.67 (ester carbonyl), 199.27 (C-20). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for 422.2569 $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$, found 422.2563.

2.2.1.2. Preparation of 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-propionate (8b) to 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cycloheptanecarboxylate (8j). To a solution of steroid 7 (0.1 g, 0.262 mmol), DCC (0.110 g, 0.524 mmol) and DMAP (0.064 g, 0.524 mmol) in chloroform (3 mL), the corresponding acid (0.6 mmol) was added. The resulting solution was stirred at room temperature for 2 h. Ethyl acetate (8 mL) was added and the precipitated dicyclohexyl urea formed was filtered. The organic phase was washed three times with 10% aqueous hydrochloric acid, 5%

aqueous sodium bicarbonate, and then water. This organic phase was then dried over anhydrous sodium sulfate. The crude ester was recrystallized from a mixture of chloroform and methanol.

Seven esters were obtained from this reaction: (3*S*)-21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-propionate (**8b**); (3*S*)-21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-butyrate (**8c**); (3*S*)-21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-pentanoate (**8d**), (3*S*)-21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-hexanoate (**8e**), (3*S*)-21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclopropanecarboxylate (**8f**), (3*S*)-21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclobutanecarboxylate (**8g**), (3*S*)-21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclopentanecarboxylate (**8h**), (3*S*)-21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclohexanecarboxylate (**8i**) and (3*S*)-21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cycloheptanecarboxylate (**8j**).

2.2.1.2.1. 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-propionate (8b** in Fig. 1).**

Yield 0.078 g (68%), m.p. 180–182 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2927, 1731, 1568, 1270 and 1087. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.90 (s, H-18, 3H), 1.20 (s, H-19, 3H), 1.10 (t, H-3' of ester, 3H), 3.90 (m, $J = 3.6$, H-3, 1H), 4.65–4.87 (ABq, $J = 16.4$ Hz, H-21, 2H), 5.35 (d, $J = 5.9$ Hz, H-6, 1H), 6.73 (s, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.04 (s, H-Het, 1H), 7.32 (s, H-Het, 1H), 7.69 (s, H-Het, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 11.30 (C-3' of ester), 15.30 (C-18), 21.30 (C-19), 65.35 (C-21), 71.54 (C-3), 121.01 (C-6), 141.21 (C-5), 144.21 (H-Het), 147.80 (C-16), 151.55 (C-Het), 157.09 (C-17), 194.64 (ester carbonyl), 206.09 (C-20). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for 436.2726 $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_3$, found 436.2732.

2.2.1.2.2. 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-butyrate (8c** in Fig. 1).**

Yield 0.071 g (60%), m.p. 184–187 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2929, 1729, 1574, 1270 and 1088. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.00 (t, ester-H-4', 3H), 1.10 (s, H-18, 3H), 1.30 (s, H-19, 3H), 3.90 (m, $J = 3.9$ Hz, H-3, 1H), 4.65–4.87 (ABq, $J = 16.4$ Hz, H-21, 2H), 5.35 (d, $J = 5.9$ Hz, H-6, 1H), 6.73 (s, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.04 (s, H-Het, 1H), 7.32 (s, H-Het, 1H), 7.69 (s, H-Het, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 12.30 (C-3' of ester), 15.01 (C-18), 23.40 (C-19), 65.30 (C-21), 71.54 (C-3), 121.01 (C-6), 141.21 (C-5), 141.26 (C-Het), 144.89 (C-Het), 148.44 (C-16), 151.55 (C-Het), 157.12 (C-17), 196.64 (ester carbonyl), 206.09 (C-20). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated 450.2882 $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3$, found 450.2878.

2.2.1.2.3. 21-(1H-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-pentanoate (8d in Fig. 1).

Yield 0.067 g (55%), m.p. 172–175 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2929, 1729, 1574, 1270 and 1087. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.90 (t, ester-H-5', 3H), 1.01 (s, H-18, 3H), 1.29 (s, H-19, 3H), 3.90 (m, $J = 3.2$ Hz, H-3, 1H), 4.65–4.87 (ABq, $J = 16.4$ Hz, H-21, 2H), 5.35 (d, $J = 5.9$ Hz, H-6, 1H), 6.73 (s, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.04 (s, H-Het, 1H), 7.32 (s, H-Het, 1H), 7.69 (s, H-Het, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 12.01 (C-5' of ester), 15.30 (C-18), 24.50 (C-19), 63.40 (C-21), 71.54 (C-3), 121.01 (C-6), 141.22 (C-Het), 144.89 (C-Het), 148.45 (C-16), 151.55 (C-Het), 155.71 (C-17), 196.64 (ester carbonyl), 206.09 (C-20). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for 464.3039 $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3$, found 464.3033.

2.2.1.2.4. 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-hexanoate (8e in Fig. 1).

Yield 0.067 g, (53%), m.p. 169–171 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2931, 1730, 1575, 1270 and 1087. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.67 (t, ester-H-6', 3H), 0.90 (s, H-18, 3H), 1.02 (s, H-19, 3H), 3.90 (m, $J = 3.9$ Hz, H-3, 1H), 4.65–4.87 (ABq, $J = 16.4$ Hz, H-21, 2H), 5.36 (d, $J = 5.8$ Hz, H-6, 1H), 6.73 (s, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.04 (s, H-Het, 1H), 7.32 (s, H-Het, 1H), 7.69 (s, H-Het, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 11.36 (C-6'), 15.30 (C-18), 22.13 (C-19), 62.31 (C-21), 71.54 (C-3), 121.01 (C-6), 141.21 (C-5), 141.22 (C-Het), 144.89 (C-Het), 148.19 (C-16), 151.55 (C-Het), 155.71 (C-17), 196.64 (ester carbonyl), 206.08 (C-20). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for 478.3195 for $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_3$, found 478.3189.

2.2.1.2.5. 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclopropanecarboxylate (8f in Fig. 1).

Yield 0.065 g, (55%), m.p. 187–189 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2926, 1726, 1624, 1570, 1270 and 1086. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.25 (s, H-18, 3H), 1.30 (s, H-19, 3H), 1.65 (m, ester-H-1', 1H), 3.47 (m, $J = 3.5$ Hz, H-3, 1H), 4.22–4.59 (ABq, $J = 16.4$ Hz, H-21, 2H), 5.35 (d, $J = 5.4$ Hz, H-6, 1H), 6.72 (s, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.11 (s, H-Het, 1H), 7.35 (s, H-Het, 1H), 7.51 (s, H-Het, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 10.10 (C-1' of ester), 13.253 (C-18), 15.00 (C-19), 62.45 (C-21), 73.82 (C-3), 119.23 (C-6), 139.99 (C-Het), 147.21 (C-16), 147.22 (C-Het), 157.00 (C-Het), 157.03 (C-17), 174.44 (ester carbonyl), 204.08 (C-20). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for 448.2726 for $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_3$, found 448.2730.

2.2.1.2.6. 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclobutanecarboxylate (8g in Fig. 1).

Yield 0.069 g, (57%), m.p. 101–103 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2928, 1723, 1624, 1572, 1270 and 1087. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.80 (s, H-18, 3H), 1.10 (s, H-19, 3H), 2.29 (m, ester-

H-1', 1H), 3.90 (m, $J = 3.7$ Hz, H-3, 1H), 4.65–4.87 (ABq, $J = 16.4$ Hz, H-21, 2H), 5.35 (d, $J = 5.4$ Hz, H-6, 1H), 6.73 (m, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.04 (s, H-Het, 1H), 7.34 (s, H-Het, 1H), 7.69 (s, H-Het, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 13.40 (C-18), 19.01 (C-19), 30.21 (C1' of ester), 62.32 (C-21), 73.54 (C-3), 121.91 (C-6), 124.60 (C-Het), 128.83 (C-Het), 140.23 (C-5), 144.00 (C-16), 156.99 (C-Het), 157.00 (C-Het), 175.09 (ester carbonyl), 190.36 (C-20). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for 462.2882 for $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3$, found 462.2886.

2.2.1.2.7. 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclopentanecarboxylate (8h in Fig. 1).

Yield 0.056 g, (45%), m.p. 91–93 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2928, 1724, 1625, 1574, 1270 and 1087. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.10 (s, H-18, 3H), 1.30 (s, H-19, 3H), 2.31 (m, ester-H-1', 1H), 3.47 (m, $J = 3.4$ Hz, H-3, 1H), 4.65–4.87 (ABq, $J = 16.4$ Hz, H-21, 2H), 5.33 (d, $J = 5.4$ Hz, H-6, 1H), 6.73 (m, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.04 (s, H-Het, 1H), 7.32 (s, H-Het, 1H), 7.69 (s, H-Het, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 13.01 (C-18), 19.00 (C-19), 30.10 (C1' of ester), 62.30 (C-21), 73.54 (C-3), 121.91 (C-6), 124.60 (C-Het), 128.83 (C-Het), 140.15 (C-5), 140.15 (C-5), 144.00 (C-16), 156.99 (C-Het), 157.09 (C-aromatic), 175.09 (ester carbonyl), 199.36 (C-20). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for 476.3039 for $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3$, found 476.3035.

2.2.1.2.8. 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cyclohexanecarboxylate (8i in Fig. 1).

Yield 0.071 g, (55%), m.p. 193–195 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2929, 1726, 1624, 1591, 1270 and 1080. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.24 (s, H-18, 3H), 1.40 (s, H-19, 3H), 2.30 (m, ester-H-1', 1H), 3.45 (m, $J = 3.7$ Hz, H-3, 1H), 4.62–4.82 (ABq, $J = 16.4$ Hz, H-21, 2H), 5.35 (d, $J = 5.4$ Hz, H-6, 1H), 6.73 (m, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.10 (s, H-Het, 1H), 7.35 (s, H-Het, 1H), 7.51 (s, H-Het, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 20.01 (C-18), 21.00 (C-19), 30.10 (C1' of ester), 62.21 (C-21), 73.91 (C-3), 121.02 (C-6), 141.21 (C-Het), 141.27 (C-5), 141.45 (C-16), 144.89 (C-Het), 154.41 (C-Het), 157.09 (C-17), 170.66 (ester carbonyl), 200.87 (C-20). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for 490.3195 for $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_3$, found 490.3199.

2.2.1.2.9. 21-(1*H*-imidazol-1-yl)-20-oxopregna-5,16-dien-3 β -yl-cycloheptanecarboxylate (8j in Fig. 1).

Yield 0.071 g, (53%), m.p. 180–182 °C, IR (KBr) cm^{-1} : 2917, 1725, 1626, 1564, 1260 and 1115. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.01 (s, H-18, 3H), 1.20 (s, H-19, 3H), 2.30 (m, ester-H-1', 1H), 3.49 (m, $J = 3.4$ Hz, H-3, 1H), 4.62–4.82 (ABq, $J = 16.4$ Hz, H-21, 2H), 5.35 (d, $J = 5.4$ Hz, H-6, 1H), 6.75 (m, $J = 6.7$ Hz, C-16, 1H), 7.10 (s, H-Het, 1H), 7.35 (s, H-Het, 1H), 7.51 (s, H-Het, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 19.40 (C-18), 20.00 (C-19), 30.11 (C1' of ester), 62.10 (C-21), 73.91 (C-3), 121.02 (C-6), 121.12 (C-Het), 141, 27 (C-5), 144.50 (C-16), 144.52 (C-Het), 154.51 (C-17), 157.09 (C-Het), 170.66 (ester carbonyl), 200.87 (C-20). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for 504.3352 for $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_3$, found 504.3358.

2.2. Animal and human tissues

2.2.1. Type 1 5 α -R isoenzyme isolated from rat liver

All procedures involving animals were approved by the Institutional Care and Use Committee of the Metropolitan University of Mexico (UAM, Xochimilco).

Two adult (8-month old) rats were obtained by the Metropolitan University in Xochimilco from Animal Care Facility, Mexico.

The adult rats weighing 500 g had been fasted overnight to decrease glycogen levels before their livers were extirpated for use as a source of 5 α -R1 [22]. To prepare microsomes, the livers (30 g) were minced in one volume of buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 6.5, containing 0.32 M sucrose, 0.1 mM DTT; Sigma-Aldrich, Mexico City, Mexico) with an IKA_A11 basic tissue mill (IKA Laboratory Equipment, Mexico City, Mexico). Unless otherwise specified, the following procedures were carried out at 4 °C.

The tissue was homogenized and the suspension was centrifuged (13,200 rpm; 20 min; 0 °C) (Beckman L70 K ultracentrifuge), and the pellet was discarded. The supernatant was filtered through a nylon mesh filter (pore size 11 μ m, distributed by OEM-Membrane Solution, Dallas TX) and centrifuged again (10,000 rpm; 60 min, 4 °C); the microsomal pellet was suspended in five volumes of buffer A with a homogenizer. The protein concentration was measured by the Bradford method [23].

The suspension was re-centrifuged (13,200 rpm; 20 min, 4 °C) and the pellet was suspended in buffer A to give a final concentration of 20 mg protein/mL. The microsomal suspension was stored at -70°C prior to the preparation of the sample steroid.

2.2.2. Type 2 5 α -R isoenzyme isolated from human prostate

Four hours after a 53-year-old patient had died from myocardial infarction, his normal prostate was extirpated in the Pathology Department of the Mexico City General Hospital. The Ethical Committee of the General Hospital in Mexico City approved this protocol.

Human prostate was used in this experiment because this tissue is an abundant source of 5α -R2, but not of 5α -R1; the AR study in this model is very complex.

The tissue was rinsed and immediately chilled in ice-cold 150 mM NaCl, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The frozen human prostate was thawed on ice, rinsed, and minced in buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 6.5, containing 0.32 M sucrose, 0.1 mM DTT; Sigma-Aldrich, Mexico City, Mexico) with an IKA[®] A11 basic tissue mill (IKA Laboratory Equipment, Mexico City, Mexico). Unless otherwise specified, the following procedures were carried out at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The human prostate tissue was homogenized in two volumes of buffer A with a tissue homogenizer Ultra-Turrax IKA, T18 basic (Wilmington, NC). The homogenates were centrifuged (1500g; 60 min) [24] in a SW 60 Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). The pellets were suspended in buffer A, and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. This suspension had a final concentration of 5 mg protein/mL, as determined by the Bradford method [23] and was used as source of 5α -R2 isozyme.

2.2.3. Rat prostate cytosol as source of AR

In this study we used rats because the prostate gland is bigger than that of the hamster and there is no difference in the binding activity of the AR between rat and hamster cytosol [25].

In order to evaluate the binding of steroids **8a–j** to the androgen receptor, the prostates of 50 adult rats (8 months old; 500 g) were removed, blotted, weighed and soaked

in cold TEMD (40 mM tris-HCl, 3 mM EDTA and 20 mM sodium molybdate, dithiothreitol 0.5 mM, 10% glycerol at pH 8) before use. All procedures were carried out in an ice bath at 0 °C. The tissues were homogenized with a tissue homogenizer (Teckmar, Cincinnati, OH) in one volume of buffer TEMD plus protease inhibitors (2 mM PMSF, 10 µg/mL antipain, 5 mM leupeptin) [26] in an ice bath with a tissue homogenizer; subsequently the homogenates were centrifuged (14,000 rpm, 60 min) [24] in a SW 60 Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). The cytosolic fraction obtained from the supernatant liquid of the rat prostate homogenate described above was stored at -70 °C. The protein concentration (6 mg of protein in 200 µL) was determined by the Bradford method.

2.2.4. *In vivo* experiments

For the experiments *in vivo*, adult male golden hamsters (2.5 months old; 150–200 g) were used. After gonadectomies had been performed on the hamsters under isoflurane anesthesia, the castrated hamsters were allowed to recover for 30 days prior to experimentation [25]. The castrated hamsters and a group of eight intact hamsters were housed in a room with controlled temperature (22 °C) and light-dark periods of 12 h; the hamsters were fed with food and water *ad libitum*. Thirty days post gonadectomy, the hamsters were separated into groups consisting of four animals per group. The hamsters were treated for six days, and thereafter sacrificed with CO₂ [24]. This experiment was carried out twice under the same conditions.

2.2.5. Cell line characteristics

The panel of cells used in this study was: PC-3 (human prostate cancer cell line), MCF7 (human breast cancer cell line), and SK-LU-1 (human lung cancer cell lines), supplied by the National Cancer Institute (USA).

2.3. Biological activity of 8a-j compounds

2.3.1. *In vitro* experiments

The effect of steroids 8a-j (Fig. 1) on the activity of 5 α -R1 and 5 α -R2 was evaluated by following the conversion of T to DHT, under the same conditions that we described previously [27].

The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 8a-j was determined using a range of concentrations (1×10^{-10} to 1×10^{-4} M) of each derivative. The transformation of T to DHT in the presence of 8a-j was calculated from radioactive compounds present in each sample, observed in the lanes of the chromatographic plate. The data were plotted using SigmaPlot software 12 inhibition curves [24].

2.3.2. *In vivo* experiments

2.3.3.1. Weight of the prostate, seminal vesicles and diameter of the pigmented spot

For six consecutive days, each of the steroid derivatives 8a-j (2 mg/kg body weight (BW)) dissolved in 200 μ L of sesame oil, together with 1 mg/kg (BW) of testosterone, was administered by subcutaneous (SC) injection to a group of gonadectomized hamsters (four animals per derivative). Three groups of gonadectomized animals were kept as control; the first group was injected SC with 200 μ L sesame oil, the second group with 1 mg/kg (BW) of testosterone, and the third group with 1 mg T plus 1 mg/kg (BW) of finasteride also

prepared in sesame oil. Additionally, one group of four intact hamsters was used as the intact control. On the seventh day, the animals were sacrificed with CO₂ and the diameters of the flank organs were measured using a Vernier Caliper; the prostate and seminal vesicles of each hamster were dissected and weighed.

Two separate experiments were performed for each group of steroid treated hamsters. The results were analyzed using one-way analysis of variance and Dunnett's method to compare means, using JMP IN 5.1 software (JMP, Statistical Discovery, and Cary, NC, USA).

2.3.3. Competitive studies on AR

The competitive studies of steroids **8a-j** on AR were carried out using the same procedure described by our group previously [28]. The IC₅₀ of each compound was calculated from plots of concentration versus percentage of binding using SigmaPlot 12. Mibolerone (MIB) was used as a positive control.

2.3.4. Cytotoxicity assay

Cytotoxic activity of the steroid derivatives (**8a-j**) on three cancer cell lines (PC-3, MCF7, and SK-LU-1) was evaluated. The procedure has been previously reported [29].

Cell growth inhibition was calculated according to the following expression:

$$\text{cell growth inhibition (\%)} = \frac{100 - (\text{sample absorbtion})}{\text{vehicle absorbtion}} \times 100$$

3. Results

3.1. Chemistry

The yield for the formation of **8a** from the reaction involving acetic anhydride and pyridine was 90%, while compounds **8b–j** were obtained in moderate yields of 45–68% using the Steglich esterification method [30].

8b–j were isolated and characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR and mass spectrometry. Also, results obtained from the melting point determination of each compound showed a maximum two degree difference, indicating that these steroids were pure.

3.2. Effect of derivatives as inhibitors of the activity of 5α -R isoenzymes

Table 1 shows the IC_{50} values for derivatives **8a–j** required to inhibit 50% of the activity of 5α -reductase isoenzymes.

These results showed that the chain derivative with the smallest ester at C-3 and alicyclic derivatives also present at C-3 of the steroidal skeleton showed greater selectivity as 5α -R2 inhibitors than the other derivatives studied. However their potency to inhibit this enzyme was lower than that of finasteride ($\text{IC}_{50} = 8.5$ nM) in all cases. None of the prepared compounds was able to inhibit the activity of the 5α -R1 enzyme.

3.3. Weight of the prostate, seminal vesicles and diameter of the pigmented spot

After castration, the weight of the hamster prostate and seminal vesicles decreased ($p < 0.05$) compared to the normal weight of the respective glands, as did the diameter of the pigmented spot. Treatment with vehicle did not change these effects. However, treatment with 1 mg/kg of T for 6 days significantly increased ($p < 0.05$) the weight of prostate, seminal vesicles and diameter of the pigmented spot as well as the weight of the prostate and seminal vesicles (Table 2). When T (1 mg/kg) and finasteride were injected

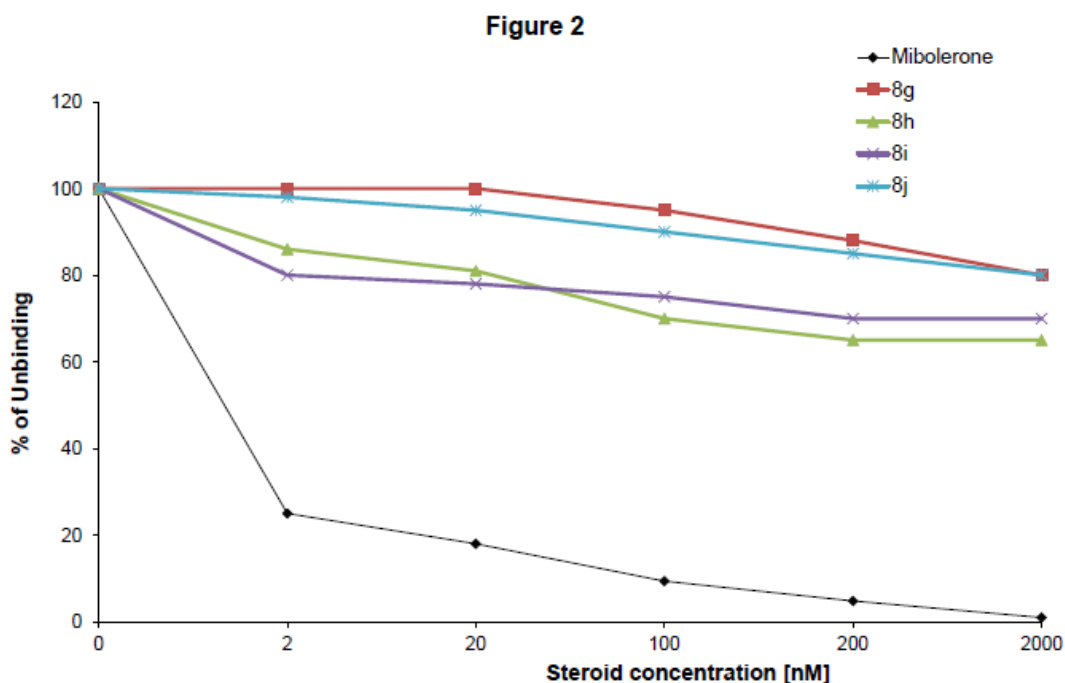
together, the weight of the prostate, seminal vesicles and diameter of the flank organs decreased significantly ($p < 0.05$) (Table 2). This reduction in the weight of these glands and diameter of the pigmented spot was comparable to that produced by finasteride (Table 2).

Table 2 shows that when T was administered together with finasteride or steroids **8g-j**, the weight of the prostate and seminal vesicles decreased significantly ($p < 0.05$). In addition, **8g-j** showed a significant ($p < 0.05$) reduction in diameter of the pigmented spot. The remainder of the compounds studied did not display any comparable effect (Table 2).

3.4. Competitive studies on AR

This study showed that compounds **8a-j** did not displace the tritium-labeled MIB from the AR. MIB is a very potent AR agonist and exhibited an IC_{50} value of 1 nM. Figure 2 below shows only the graphs of AR unbinding for compounds **8g-j** to illustrate the behavior of steroids that did not bind to this receptor.

These results show that the steroidal derivatives are not androgenic types and for this reason cannot bind on the active site of the AR.

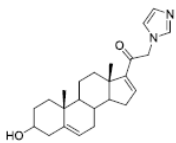
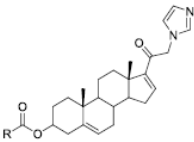







3.5. Cytotoxic activity on cancer cell lines (PC-3, MCF7 and SK-LU-1)

The effect of the synthesized compounds (**8a-j**) on the growth of three cancer cell lines; PC-3 (prostate), MCF7 (breast) and SK-LU-1 (lung), was determined using the SBR assay method. The values of the antiproliferative effect are shown in Table 1. Ketoconazole and 16-dehydropregnenolone acetate were used as controls in this study.

Ketoconazole was used as a positive control, because its interesting cytotoxic activity *in vitro* studies has been previously reported [16; 31-34]. Compounds **7** [12,15] and **8a** showed higher cytotoxic activity than 16-dehydropregnenolone acetate in the three cancer cell lines (Table 1). Furthermore, **8a** showed higher toxicity than **8b-j** in these three cancer cell lines. This may be because these steroids do not dissolve well in the culture medium containing a dimethyl sulfoxide (DMSO) concentration of 0.05%. This idea is supported by the calculated log P value for each one of these derivatives. (Table 1)

Table 1. Biological activity of novel derivate compounds on growth inhibition in human cancer cell lines at 50 μ M, IC₅₀ value on 5 α -R isoenzymes and AR binding assay.

Structure	Compound	R	LogP Calc ^a	PC-3	MCF-7	SKLU-1	5 α -R1 IC ₅₀ nM	5 α -R2 IC ₅₀ μ M	RBA AR %
Ketoconazole	–	–	–	88.48 \pm 3.9	95.16 \pm 4.8	73.39 \pm 1.6	–	–	–
Finasteride	–	–	4.00	NA	NA	NA	630	0.0085	NA
16-DHP	1	–	4.51	21.4 \pm 11.5	25.5 \pm 1.2	12.8 \pm 3.5	NA	NA	NA
	7	–	3.11	96.2 \pm 1.3	89.4 \pm 2.3	74.8 \pm 1.5	NA	118.8	NA
	8a	-CH ₃	3.82	79.6 \pm 8.7	77.9 \pm 0.8	96.7 \pm 1.3	NA	122	NA
	8b	-C ₂ H ₅	4.18	22.6 \pm 5.2	0	16.8 \pm 1.0	NA	NA	NA
	8c	-C ₃ H ₇	4.74	0	0	25.2 \pm 0.1	NA	NA	NA
	8d	-C ₄ H ₉	5.24	23.7 \pm 2.9	51.3 \pm 8.3	39.2 \pm 8.2	NA	NA	NA
	8e	-C ₅ H ₁₁	5.75	17.2 \pm 3.6	28.1 \pm 4.9	28.5 \pm 7.4	NA	NA	NA
	8f		4.48	NA	NA	NA	NA	0.711	NA
	8g		4.65	NA	NA	NA	NA	0.0764	NA
	8h		5.39	NA	NA	NA	NA	0.035	NA
	8i		5.90	NA	NA	NA	NA	0.0293	NA
	8j		6.40	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Results are expressed as a percentage of inhibition \pm standard error. NA: This compound was not active.

^a The LogP property was calculated by Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/>).

Table 2. Weight of prostate, seminal vesicle glands, and diameter of the pigmented spot of the flank organs \pm standard deviation from castrated hamsters receiving different treatments for 6 days.

Treatment	Weight of Prostate (mm) \pm standard error	Weight of Seminal Vesicles (mm) \pm standard error	Diameter of the Pigmented Spot (mm) \pm standard error
Control	50.4 \pm 9.9	96.11 \pm 12.5	2.03 \pm 0.63
T	98 \pm 12.6	200.6 \pm 55	5.65 \pm 1.12
T+F	69.6 \pm 21.2	161.4 \pm 44.5	3.57 \pm 0.89
T+8a	85.80 \pm 19.41	200.50 \pm 32.79	3.06 \pm 0.08
T+8b	88.40 \pm 16.10	231.70 \pm 25.08	1.80 \pm 0.38
T+8c	83.43 \pm 8.46	217.45 \pm 59.28	1.98 \pm 0.8
T+8d	80.93 \pm 6.06	198.33 \pm 22.20	2.94 \pm 0.99
T+8e	71.85 \pm 16.06	198.33 \pm 22.20	3.36 \pm 0.40
T+8f	77.1 \pm 17	160.9 \pm 15.8	3.4 \pm 0.47
T+8g	71.3 \pm 9*	145.2 \pm 32.1*	3.0 \pm 0.45*
T+8h	65.1 \pm 15.8*	143.7 \pm 50.66*	2.0 \pm 0.4*
T+8i	54.3 \pm 4.9*	143.68 \pm 50.7*	2.4 \pm 0.3*
T+8j	70.8 \pm 5.3	143.6 \pm 29.89*	2.8 \pm 0.5*

The control animals were treated with vehicle only.

* Statistically significant values.

4. Discussion

Our research group previously synthesized several steroidal derivatives with an ester moiety at C-3 and severalazole derivatives. These steroids demonstrated high antiproliferative activity on different cancer cell lines [28-29] and an inhibitory effect on 5α -reductase type 1 and 2 activity [35].

Recently, we also demonstrated that the presence of a triazole group at C-21 with a linear ester moiety at C-3 on the steroidal skeleton enhanced 5α -R1 inhibitory activity. In addition, compound 20-oxo-21-(1*H*-1,2,4-triazole-1-yl)pregna-5,16-dien-3 β -yl-acetate presented a high cytotoxic effect on the SK-LU-1 cancer cell line. Banday et al. similarly identified a series of novel D-ring substituted 1,2,3-triazolyl 20-keto pregnane derivatives as antiproliferative agents on DU-145 and PC-3 cancer cell lines [19].

This report serves as an extension of our earlier study where it was demonstrated that two pregnane derivatives with a triazole or imidazole moiety at C-21, inhibited the three studied cancer cell lines proliferation; [15] particularly the 3 β -hydroxy-21- (1*H*-imidazol-1-yl)pregna-5,16-dien-20one; **I-OH** (7) showed a good PC3 cells antiproliferative effect. However docking studies indicated this steroid is unable to binding to the pocket of the AR, so that this activity cannot explained by this way. In order to understand the action of imidazole derivatives in prostate tissue, here we report the *in vivo* and *in vitro* activity of ten different novel 16-dehydropregnenolone derivatives with an imidazole group at C-21 and a linear or alicyclic ester moiety at C-3.

Although all these novel steroidal derivatives (**8a-j**) have an ester moiety at C-3, they are noteworthy because they show a very different biological activity, allowing other

possible therapeutic applications. Interestingly, only **8a** shows higher activity on PC-3, which is satisfactory as the intent was to obtain specific compounds for each type of cancer.

Furthermore, only derivatives with an alicyclic ester at C-3 demonstrated 5α -R2 inhibitory activity, with compounds **8h** and **8i** showing the highest inhibitory activity on this isoenzyme. The pharmacological activity of the compounds was also demonstrated by a decrease in weight and size of the androgen-dependent glands studied. However, these derivatives with an aliphatic group at C-3 were unable to bind to the androgen receptor as docking studies had predicted, [15] hence the pharmacological effect observed was due to their activity as inhibitors of 5α -R2 activity. This is important because prostatic benign hyperplasia is directly associated with the presence of 5α -R2. [4, 7] In addition, the fact that these compounds were not able to bind the androgen receptor increases their therapeutic value by generating the possibility of only causing minor side effects. The overall data suggests that the size of the ester moiety could be related to the cytotoxic effect of these compounds.

The antiproliferative activity of these compounds can also be attributed to the nature of theazole group [36-37, 10]. This group has a sextet of μ -electrons, giving theazole a higher nucleophilic character [38] that enables formation of a strong hydrogen bond between the steroidal compound and active polar groups in the cells. Because of this, a stronger cytotoxic effect is produced [39].

In conclusion, the results presented here indicate that 16-dehydropregnenolone derivatives were successfully synthesized, and presented an inhibitory effect on 5α -R2, as well as an important pharmacological effect that was non-cytotoxic in the treatment-time. Furthermore, the compounds showed interesting cytotoxic activities on different cancer cell

lines, especially on PC-3, an androgen-independent prostate cancer cell line [40-41], showing therapeutic potential for cancer treatment.

Acknowledgements

We would like to thank DGAPA, project IN211312 (UNAM), CONACYT, and Project CB 2011/165049 for the financial support.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no real or perceived conflicts of interest arising from intellectual, personal, or financial circumstances of the research. Additionally, all authors are aware of, and approve the contents and order of authorship of the manuscript.

References

- 1 Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. *Cancer statistics CA*. **2016**, 66, 7.
- 2 Antognelli, C.; Del Buono, C. Baldracchini, F.; Talesa, V.; Cottini, E.; Brancadoro, C.; Zucchi, A.; Mearini, E. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, 6, 1880.
- 3 Thomas, L.N.; Lazier, C.B.; Gupta, R.; Norman, R.W.; Troyer, D.A.; O'Brien, S.P.; Rittmaster, R.S. *Prostate* **2005**, 63, 231.
- 4 Russell, D.W.; Wilson, J.D. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 25.
- 5 Ogishima, T.; Mitani, F.; Suematsu, M. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2008**, 111, 80.
- 6 Uemura, M.; Tamura, K.; Chung, S.; Honma, S.; Okuyama, A.; Nakamura, Y.; Nakagawa, H. *Cancer Sci.* **2008**, 99, 81.
- 7 Liang, T.; Cascieri, M. A.; Reynolds, G. F.; Rasmusson, G. H. *Endocrinology* **1985**, 117, 571.
- 8 Brandt, M.; Levy, M.A. *Biochemistry* **1989**, 28, 140.
- 9 Elmegeed, G.A.; Khalil, W.K.; Mohareb, R.M.; Ahmed, H.H.; Abd-Elhalim, M.M.; Elsayed, G.H. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 6860.
- 10 Elmegeed, G.A.; Yahya, S.M.M.; Abd-Elhalim, M.M.; Mohamed, M.S.; Mohareb, R.M.; Elsayed, G.H. *Steroids* **2016**, 115, 80.
- 11 Cabeza, M.; Sánchez-Márquez, A.; Garrido, M; Silva, A.; Bratoeff, E. *Curr. Med. Chem.* **2016**, 23, 792.
- 12 Silva-Ortiz, A.V.; Bratoeff, E.; Ramírez-Apan, T.; Heuze, Y.; Sánchez, A.; Soriano, J.; Cabeza, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 7535.

- 13 Cortés-Benítez, F.; Cabeza, M.; Ramírez-Apan, M.T.; Alvarez-Manrique, B.; Bratoeff, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 737.
- 14 Chavez-Riveros, A.; Bratoeff, E.; Heuze, Y.; Soriano, J.; Moreno, I.; Sanchez-Marquez, A.; Cabeza, M. *Arch. Pharm.* **2015**, *348*, 808.
- 15 Silva-Ortiz, A.V.; Bratoeff, E.; Ramirez-Apan, M.T.; Garcia-Becerra, R.; Ordaz-Rosado, D.; Noyola-Martinez, N.; Castillo-Bocanegra, R.; Barrera, D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *159*, 8.
- 16 Aggarwal, S.; Thareja, S.; Verma, A.; Bhardwaj, T.R.; Kumar, M. *Steroids* **2010**, *75*, 109.
- 17 Szaloki, G.; Pantzou, A.; Prousis, K.C.; Mavrofrydi, O.; Papazafiri, P.; Calogeropoulou, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6980.
- 18 Zhang, M.; Li, X.; Xiang, C.; Qin, Y.; He, J.; Li, B.C.; Li, P. *Steroids* **2015**, *104*, 49.
- 19 Banday, A.; Verma, M.; Srikakulam, S.; Gupta, B.; Kumar, S. *Steroids* **2010**, *75*, 801.
- 20 Elmegeed, G.A.; Khalil, W.K.; Mohareb, R.M.; Ahmed, H.H.; Abd-Elhalim, M.M.; Elsayed, G.H. *Bioorg Med Chem.* **2011**, *19*, 6860.
- 21 Elmegeed, G.A.; Yahya, S.M.M.; Abd-Elhalim, M.M.; Mohamed, M.S.; Mohareb, R.M.; Elsayed, G.H. *Steroids* **2016**, *115*, 80.
- 22 Levy, M. A.; Brandt, M.; Greway, A.T. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2080.
- 23 Bradford, M.M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
- 24 Bratoeff, E.; García, P.; Heuze, Y.; Soriano, J.; Mejía, A.; Labastida, A.M.; Valencia, N.; Cabeza, M. *Steroids* **2010**, *75*, 499.
- 25 Liang, T.; Heiss, C.E.; Cheung, A.H.; Reynolds, G.F.; Rasmusson, G.H. *JBC* **1984**, *259*, 734.

- 26 Hendry, W.J.; Danzo, B.J. *J. Steroid Biochem.* 1985, 23, 883.
- 27 Cabeza, M.; Heuze, Y.; Quintana, H.; Bratoeff, E. *J Anim. Vet. Adv.* 2010, 5, 202.
- 28 Bratoeff, E.; Garrido, M.; Ramírez-Apan, T.; Heuze, Y.; Sánchez, A.; Soriano, J.; Cabeza, M. *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22, 6233.
- 29 Garrido, M.; Cabeza, M.; Cortés, F.; Gutiérrez, J.; Bratoeff, E. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 68, 301.
- 30 Neises, B.; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1978, 17, 522.
- 31 Eichenberger, T.; Trachenbeig, J.; Chronis, P. *Am. J. Clin. Oncol.* 1988, 11, S104.
- 32 H. Vanden Bossche, Inhibitors of P450-dependent steroid biosynthesis: from research to medical treatment, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43 (1992) 1003-1021.
- 33 Wilkinson, S.; Chodak, G. *Eur. Urol.* 2004, 45, 581.
- 34 Rochlitz, C.F.; Damon, L.E.; Russi, M.B.; Geddes, A.; Cadman, E.C. *Chemother. Pharmacol.* 1988, 21, 319.
- 35 Arellano, Y.; Bratoeff, E.; Segura, T.; Mendoza, M.E.; Sánchez-Márquez, A.; Medina, Y.; Heuze, Y.; Soriano, J.; Cabeza, M. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2015, 1.
- 36 Ibrahim-Ouali, M.; Rocheblave, L. *Steroids* 2008, 73, 375.
- 37 Elmegeed, G.A.; Khalil, W.K.; Mohareb, R.M.; Ahmed, H.H.; Abd-Elhalim, M.M.; Elsayed, G.H. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 6860.
- 38 Katritzky, A.R.; Ramsden, C.A.; Joule, J.A.; Zhdankin, V.V. *Heterocyclic Chemistry*, 3th ed. UL: Kidlington Oxford, Elsevier; 2010:87-98.
- 39 Cooper, G.M.; Hausman, R.E. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. Sunderland (MA), Sinauer Associates; 2000.
- 40 Ghosh, A.; Heston, W.D.J. *Cell. Biochem.* 2004, 91, 528.
- 41 Alimirah, F.; Chen, J.; Basrawala, Z.; Xin, H.; Choubey, D. *FEBS Lett.* 2006, 580, 2294.