



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS ESTEROIDALES BASADOS EN EL
ESQUELETO DEL PREGNANO CON UN GRUPO ÉSTER DE ÁCIDO
NICOTÍNICO EN C-3 Y SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. CARLOS ANDRES ROJAS GONZALEZ

TUTOR: EUGENE ATHANAS BRATOEFF T.

FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. AGOSTO DEL 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Gustavo Alberto García de la Mora
VOCAL: Dra. Rosa Luisa Santillán Baca
VOCAL: Dr. Mariano Martínez Vázquez
VOCAL: Dr. Rene Miranda Ruvalcaba
SECRETARIO: Dr. José Fausto Rivero Cruz

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO

- Laboratorio 125, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección del Dr. Eugene A. Bratoeff.



AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su aporte científico y humano me han colaborado en la realización de este trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas por su apoyo decidido, generoso y desinteresado durante mis estudios de Maestría, por abrir sus puertas y brindarme el invaluable tesoro del conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero para la realización de este proyecto (CVU/Becario: 477994/ 273430).

A mi director de tesis, el Dr. Eugene A. Bratoeff, por su presencia incondicional, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación.

A la M. en C. Maria Teresa Obdulia Ramírez Apan por su apoyo en la realización de las pruebas biológicas y al personal de la USAI por la realización de los espectros de IR, UV, RMN y MASAS presentada en este trabajo.

A la Dra. Mariana Garrido González por su amistad, colaboración y asesoría en la elaboración de este trabajo.

A los miembros del jurado por sus observaciones y correcciones que permitieron enriquecer el presente trabajo.



AGRADECIMIENTOS

Han sido ya casi dos años llenos de esfuerzos y sacrificios, pequeña pero grandiosa etapa de mi vida, en la que solo me queda agradecer principalmente a Dios por permitirme llegar a esta instancia del camino. Agradezco todo su amor y fidelidad brindada, y espero nunca soltarme de su mano.

A Martha y Juley, las dos mejores madre y hermana con quienes Dios y la vida me pudo premiar, quienes desde la lejanía me han brindado su apoyo continuo e incondicional que me mantuvo firme en mis convicciones para llegar, mantenerme y culminar este proceso.

A mi esposa Jessica, a ella especialmente le dedico esta Tesis. Por su compañía, por su paciencia, por su comprensión, por su apoyo incondicional, por su amor, por ser tal y como es. Realmente ella me llena y me da todo lo que necesito para conseguir un equilibrio que me permite dar el máximo de mí. Nunca le podré estar suficientemente agradecido.

A todos ellos,

muchas gracias de todo corazón.

**ÍNDICE**

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	1
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	2
Capítulo 2. ANTECEDENTES	5
2.1. El cáncer.	5
2.2. El cáncer: un problema de salud mundial.	7
2.2.1. Cáncer de próstata.	7
2.2.1.1. Factores de riesgo.	10
2.2.1.2. Etapas del cáncer.	11
2.2.1.3. Tratamiento.	12
2.2.1.4. Terapia hormonal.	12
2.2.2. Cáncer de mama.	14
2.2.2.1. Exámenes de laboratorio en tejido del seno.	15
2.2.2.2. Etapas del cáncer.	16
2.2.2.3. Tratamiento.	18
2.2.2.4. Terapia hormonal.	18
2.3. Esteroides.	19
2.3.1. Funciones.	20
2.3.2. Uso de derivados esteroidales para tratamiento del cáncer.	21
2.4. Heterociclos con actividad biológica.	23
2.5. Desarrollo de fármacos.	23
2.6. El ácido nicotínico.	25
Capítulo 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
3.2.1. Objetivo general.	27



3.2.2. Objetivos específicos.	27
Capítulo 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	28
4.1. Metodología química.	28
4.1.1. Ruta de síntesis.	30
4.1.2. Numeración de los esqueletos carbonados presentes en este trabajo.	31
4.1.3. Síntesis de compuestos 2-5 .	32
4.1.3.1. Purificación y caracterización de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).	32
4.1.3.2. Síntesis y caracterización de la 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).	33
4.1.3.3. Síntesis y caracterización de la 3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregnan-16-en-6,20-diona (3).	34
4.1.3.4. Síntesis y caracterización de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).	35
4.1.3.5. Síntesis y caracterización de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5).	36
4.1.4. Compuestos 6-10 , obtenidos por esterificación de Steglich.	37
4.1.4.1. Síntesis y caracterización de la 3 β -piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6).	38
4.1.4.2. Síntesis y caracterización de la 3 β -(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7).	39
4.1.4.3. Síntesis y caracterización de la 3 β -(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8).	40
4.1.4.4. Síntesis y caracterización de la 3 β -(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (9).	40
4.1.4.5. Síntesis y caracterización de la 3 β -(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (10).	41
4.1.5. Compuesto 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona.	42
4.1.5.1. Síntesis y caracterización de la 3 β -benzoiloxipregna-	42



4,16-dien-6,20-diona (11).	
4.2. Metodología biológica.	43
4.2.1. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.	43
Capítulo 5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	47
5.1. Análisis de resultados químicos.	47
5.2. Análisis de resultados biológicos.	50
CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	62

**ÍNDICE DE FIGURAS**

N°	Nombre	Pág.
1	Fármacos antineoplásicos.	4
2	Cáncer de mama.	5
3	Próstata.	8
4	Próstata normal (a) y con HPB (b).	10
5	Lobulillos, conductos dentro del seno y ganglios linfáticos cercanos al seno.	15
6	Sistema de esterano o ciclopentanoperhidrofenantreno.	20
7	Cortisol (hidrocortisona).	21
8	Versiones sintéticas de la hormona cortisol.	22
9	Estructura del ácido nicotínico.	26
10	Ruta de síntesis.	30
11	Sustituyente R en ácido nicotínico.	31
12	Numeración de compuestos 1 a 5 .	31
13	Numeración de compuestos 6 a 10 .	31
14	Numeración de la 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (11).	32
15	Estructura de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).	32
16	Reacción de epoxidación 1 a 2 .	33
17	Reacción de oxidación 2 a 3 .	34
18	Reacción de eliminación 3 a 4 .	35
19	Reacción de hidrólisis 4 a 5 .	36
20	Reacción de esterificación de 5 a 6 .	38
21	Reacción de esterificación de 5 a 7 .	39
22	Reacción de esterificación de 5 a 8 .	40
23	Reacción de esterificación de 5 a 9 .	40
24	Reacción de esterificación de 5 a 10 .	41



25	Reacción de esterificación de 5 a 11 .	42
26	Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.	51
27	Conversión de 4-pregneno a 5 α -pregnano por la acción de la enzima 5 α -reductasa.	52
28	$-\log (1/\%IPC)$ en MDA-MB231 Vs ClogP.	54



ÍNDICE DE TABLAS

N°	Nombre	Pág.
1	Diez tipos de cáncer más importantes para los nuevos casos estimados y de muertes de cáncer por género, Estados Unidos, 2014.	3
2	Sustituyentes en la posición 4' del ácido nicotínico.	30
3	Densidad de inóculo que se deposita en cada micropozo.	43
4	Análisis de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.	46
5	Tabla comparativa entre las líneas celulares de cáncer de mama.	52
6	Resumen de compuestos sintetizados.	63



ÍNDICE DE ANEXOS

N°	Nombre	Pág.
1	Resumen de compuestos sintetizados.	63
E1	Espectro IR de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).	66
E2	Espectro de UV de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).	66
E3	Espectro de RMN- ¹³ C de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).	67
E4	Espectro de RMN- ¹ H de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).	67
E5	Espectro de masas de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).	68
E6	Espectro IR de la 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).	69
E7	Espectro de UV de la 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).	69
E8	Espectro de RMN- ¹³ C de la 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).	70
E9	Espectro de RMN- ¹ H de la 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).	70
E10	Espectro de masas de la 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).	71
E11	Espectro IR de la 3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3).	72
E12	Espectro de UV de la 3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregnan-16-en-6,20-diona (3).	72
E13	Espectro de RMN- ¹³ C de la 3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3).	73
E14	Espectro de RMN- ¹ H de la 3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3).	73
E15	Espectro de RMN- ¹ H con D ₂ O de la 3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3).	74



E16	Espectro de masas de la 3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3).	74
E17	Espectro IR de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).	75
E18	Espectro de UV de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).	75
E19	Espectro de RMN- ¹³ C de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).	76
E20	Espectro de RMN- ¹ H de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).	76
E21	Espectro de masas de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).	77
E22	Espectro IR de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5).	78
E23	Espectro de UV de la 3 β -hidroxipregnan-4,16-dien-6,20-diona (5).	78
E24	Espectro de RMN- ¹³ C de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5).	79
E25	Espectro de RMN- ¹ H de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5).	79
E26	Espectro de masas de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5).	80
E27	Espectro IR de la 3 β -piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6).	81
E28	Espectro de UV de la 3 β -piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6).	81
E29	Espectro de RMN- ¹³ C de la 3 β -piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6).	82
E30	Espectro de RMN- ¹ H de la 3 β -piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6).	82
E31	Espectro de masas de la 3 β -piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6).	83
E32	Espectro IR de la 3 β -(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-	84



	dien-6,20-diona (7).	
E33	Espectro de UV de la 3 β -(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7).	84
E34	Espectro de RMN- ¹³ C de la 3 β -(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7).	85
E35	Espectro de RMN- ¹ H de la 3 β -(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7).	85
E36	Espectro de masas de la 3 β -(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7).	86
E37	Espectro IR de la 3 β -(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8).	87
E38	Espectro de UV de la 3 β -(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8).	87
E39	Espectro de RMN- ¹³ C de la 3 β -(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8).	88
E40	Espectro de RMN- ¹ H de la 3 β -(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8).	88
E41	Espectro de masas de la 3 β -(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8).	89
E42	Espectro IR de la 3 β -(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (9).	90
E43	Espectro de UV de la 3 β -(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (9).	90
E44	Espectro de RMN- ¹³ C de la 3 β -(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (9).	91
E45	Espectro de RMN- ¹ H de la 3 β -(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (9).	91
E46	Espectro de masas de la 3 β -(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (9).	92
E47	Espectro IR de la 3 β -(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-	93



	dien-6,20-diona (10).	
E48	Espectro de UV de la 3 β -(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (10).	93
E49	Espectro de RMN- ¹³ C de la 3 β -(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (10).	94
E50	Espectro de RMN- ¹ H de la 3 β -(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (10).	94
E51	Espectro de masas de la 3 β -(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (10).	95
E52	Espectro IR de la 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (11).	96
E53	Espectro de UV de la 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (11).	96
E54	Espectro de RMN- ¹³ C de la 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (11).	97
E55	Espectro de RMN- ¹ H de la 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (11).	97
E56	Espectro de masas de la 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (11).	98
E57	Espectro de masas de la matriz utilizada en EM-FAB (Alcohol nitrobencílico (ANB: PM = 153 uma).	98

**ABREVIATURAS**

Ar	aromático
ANB	alcohol nitrobenílico
HPB	hiperplasia prostática benigna
CCF	cromatografía en capa fina
cm	centímetros
DCC	diciclohexilcarbodimida
DCU	diciclohexilurea
DHT	dihidrotestosterona
DMAP	dimetilaminopiridina
DMSO	dimetil sulfoxido
EM	espectrometría de masas
FAB	Fast Atom Bombardment (bombardeo con átomos rápidos)
g	gramo
h	hora
Hz	hertz
HER₂	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 / Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano
IR	infrarrojo
J	constante de acoplamiento
CLogP	coeficiente de partición calculado
LogP	coeficiente de partición (agua/octanol)
m	múltiple
mCPBA	ácido <i>meta</i> -cloroperoxibenzóico
mg	miligramo
mL	mililitro
min	minutos
m/z	relación masa / carga en espectrometría de masas
nM	nanomolar



nm	nanómetros
PF	punto de fusión
ppm	partes por millón
RE	receptor de estrógeno
RMN¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RP	receptor de progesterona
rpm	revoluciones por minuto
SRB	sulforodamina B
TCA	ácido tricloro acético
Tris	tris(hidroximetil)aminometano, (HOCH ₂) ₃ CNH ₂
uma	unidad de masa atómica (u)
UV	ultravioleta
s	señal simple RMN ¹ H
d	señal doble RMN ¹ H
t	señal triple RMN ¹ H
m	señal multiplete RMN ¹ H
δ	desplazamiento químico
μL	microlitro
μM	micromolar
%IPC	porcentaje de inhibición de la proliferación celular
[M+H]⁺	ión pseudomolecular (ión molecular + un proton)



RESUMEN

Una de las enfermedades que afecta a cualquier grupo social sin importar la raza, el sexo, la edad o el nivel socio-económico, es el cáncer. Al respecto, se han descrito más de un centenar de tipos diferentes de cáncer, la causa exacta del desarrollo de esta enfermedad es aún desconocida, aunque se tienen evidencias de algunos factores de riesgo que la favorecen, entre los que se encuentran la edad, el sexo, los factores genéticos, además de los hormonales, nutricionales, ocupacionales y ambientales.

El presente trabajo está enfocado en el cáncer de próstata (PC-3) y dos tipos de cáncer de mama: MCF-7, RE+/RP+ y MDA-MB231 RE-/RP-, debido a que son los cánceres con mayor incidencia en la población según la Organización Mundial de la Salud y la Sociedad Americana del Cáncer.

En esta tesis se presentan y discuten los resultados correspondientes a la síntesis de una serie de moléculas derivadas del núcleo del pregnano con grupos éster en C-3 (derivados del ácido nicotínico) y un carbonilo α,β no saturado en C-6. Complementariamente, se describe la caracterización física y espectroscópica de las moléculas obtenidas.

Finalmente, se discute el efecto inhibitorio de los compuestos sintetizados sobre la proliferación de células cancerígenas humanas anteriormente mencionadas, encontrándose que solo tres de los compuestos sintetizados (4, 5 y 6), muestran una alta actividad anticancerígena en los estudios *in vitro* realizados (análisis biológico preliminar). Además, se muestra una comparación y análisis del carácter lipofílico y el % IPC, donde se encontró que el valor óptimo del LogP para el tipo de moléculas sintetizadas es 2.75.

Con los resultados obtenidos se concluyó que la 3 β -piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6**), es un nuevo derivado esteroidal con amplias perspectivas en estudios *in vivo*, para el posible tratamiento del cáncer de mama que no responde a estrógenos ni a progesterona.



CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades que afecta a cualquier grupo social sin importar la raza, el sexo, la edad o el nivel socio-económico. Al respecto, se han descrito más de un centenar de diferentes tipos de cáncer, entre los de mayor incidencia se encuentran: cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer de estómago, entre otros. La causa exacta del desarrollo de esta enfermedad no se conoce a ciencia cierta, aunque se tienen bien identificados algunos factores de riesgo que de alguna manera u otra la favorecen. Entre estos factores se encuentran la edad, el sexo, los genéticos; además de los hormonales y nutricionales, sin dejar de lado los ocupacionales y los ambientales.

A nivel mundial, este padecimiento es responsable de un número importante de muertes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en 2008, fallecieron 7.6 millones de personas que corresponde aproximadamente al 13% del total de fallecimientos por esta causa; se estima que para el 2030, aumentará a 13.1 millones (OMS, 2013). En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es la tercera causa de muerte y estima que cada año son detectados 128 mil casos nuevos (Secretaría de Salud [SSA], Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud [SPPS], 2013).^{1,2}

La tasa de letalidad hospitalaria más alta en la población menor de 20 años en 2011, se observa entre los jóvenes de 15 a 19 años (5.1 de cada 100 hombres y 5.7 de cada 100 mujeres). Durante el 2012, el cáncer de mama fue la segunda causa de muerte entre las mujeres con cáncer de 20 años y más (15.38 de cada 100 mil mujeres de esa edad).^{1,2}

El informe anual de estadísticas de cáncer de la “Sociedad Americana del Cáncer” calcula que habrá 1,665,540 nuevos casos de cáncer y 585,720 muertes por cáncer en



los Estados Unidos en 2014. Entre los hombres la próstata, el pulmón y el cáncer de colon representarán aproximadamente la mitad de todos los nuevos cánceres diagnosticados, con el cáncer de próstata por sí sola representa aproximadamente uno de cada cuatro casos. Entre las mujeres, los tres tipos de cáncer más comunes en 2014 serán *de mama, pulmón* y colon, que en conjunto representan la mitad de todos los casos, esperandose que el cáncer de mama sea un 29% de todos los nuevos casos de cáncer entre las mujeres. De las 585.720 muertes por cáncer estimados para el 2014, 1.600 corresponden para cada día. Cánceres de pulmón, colon, próstata, mama siguen siendo las causas más frecuentes de muerte por cáncer.³

Nuevos Casos estimados

	Hombres		Mujeres		
Próstata	233.000	27%	232.670	29%	Mama
Pulmón y Bronquios	116.000	14%	108.210	13%	Pulmón y Bronquios
Colon	71.830	8%	65.000	8%	Colon
Vejiga Urinaria	56.390	7%	52.630	6%	Uterino
Melanoma de la piel	43.890	5%	47.790	6%	Tiroides
Riñón	39.140	5%	32.530	4%	Linfoma non-Hodgkin
Linfoma non-Hodgkin	38.270	4%	32.210	4%	Melanoma de la piel
Cavidad oral y Faringe	30.220	4%	24.780	3%	Riñón
Leucemia	30.100	4%	22.890	3%	Páncreas
Hígado	24.600	3%	22.280	3%	Leucemia
Todos los sitios	855.220	100%	810.320	100%	Todos los sitios

Tabla 1. Diez tipos de cáncer más importantes para los nuevos casos estimados y de muertes de cáncer por género, Estados Unidos, 2014.³

De estos nuevos casos, se estima un promedio de muerte en el hombre, por cáncer de próstata del 10 % (29.480) y un 15 % (40.000) en mujeres por cáncer de mama; lo cual indica que estos dos tipos de cáncer son los de mayor incidencia en la población.³

Es por esto que el desarrollo de nuevos modelos moleculares anticancerígenos con marcada selectividad farmacológica, bajo costo, además de un menor número de reacciones adversas, ha forzado el diseño de un sin número de moléculas, las cuales

puedan actuar a través de diferentes mecanismos sobre las células tumorales. También, es conveniente mencionar que, al llevar a cabo un diseño racional de moléculas las cuales puedan ser empleadas como fármacos, se deben de tener en consideración una serie de factores físicoquímicos y estructurales, los cuales de una manera u otra pueden influenciar la respuesta biológica esperada; por lo que se hace necesario conocer sus propiedades físicas y químicas así como la contribución que los sustituyentes puedan estar aportando a las mismas.

Por otra parte, un número importante de fármacos que se emplean en la clínica para el tratamiento de enfermedades son estructuras heterocíclicas, particularmente en el campo de la terapia oncológica, moléculas útiles como la: isofosfamida, dacarbazina, temozolomida, 5-fluoroacilo, capecitabina, mercaptopurina, fludarabina, entre otros, tienen como estructura fundamental un sistema heterocíclico (Figura 1).⁴

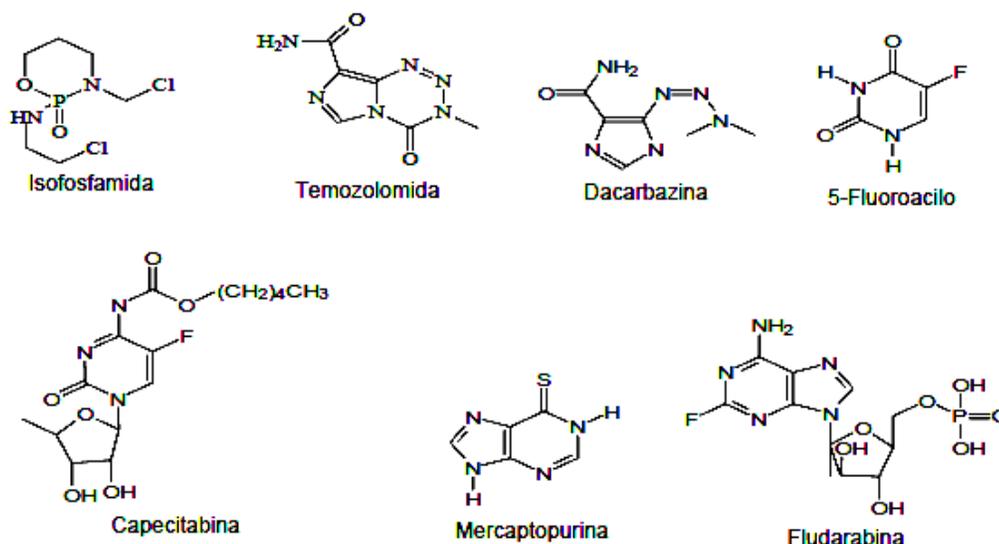


Figura 1. Fármacos antineoplásicos.

Es por todo esto, que el objetivo de este trabajo fue sintetizar y evaluar biológicamente, nuevos compuestos esteroidales con núcleo del pregnano y la incorporación de heteroátomos como lo es el caso del ácido nicotínico y sus derivados, con miras a ser usados en tratamientos contra el cáncer de próstata y mama para el mejoramiento de la calidad de vida de las personas con dichos padecimientos.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. El cáncer.

El cáncer parece ser una enfermedad tan antigua como lo es la vida en nuestro planeta. Son testimonio de ello los tumores encontrados en los huesos de fósiles de dinosaurios o en las momias humanas descubiertas en Egipto y Perú. Su estudio y tratamiento ha sido objeto de gran interés desde épocas remotas en distintas culturas, lo cual ha quedado asentado en documentos en los que se describe el avance del conocimiento, que nos hacen ver el talento y capacidad de observación y deducción de nuestros antepasados. Documentos que datan de 2000 a 1500 años a.C., como el Ramayana de la India o el papiro egipcio Ebers, por ejemplo, hacen referencia a este padecimiento. En tanto que su nombre, cáncer, se inspiró en la observación de los tumores de mama, que al crecer, toman la forma de un cangrejo, según explica Galeno (131-203 d.C.) en su tratado *Definitiones Medicae* (Figura 2).⁵



Figura 2. Cáncer de mama.⁵

También existe información escrita sobre el tratamiento de un paciente con cáncer del año 1600 a.C. y se trata de un papiro egipcio que relata la primera operación quirúrgica para la extracción de un tumor sólido.⁶ Se han descrito más de cien formas



distintas de cáncer de acuerdo con el órgano o tejido en el que se originan y el tipo de célula a partir del cual se forman. Los más frecuentes son los llamados carcinomas, que constituyen cerca del 90% de los cánceres y que se generan en los epitelios o capas celulares que recubren la superficie de nuestro cuerpo. Por lo general éstos son tumores que ocurren a edad avanzada y cuya frecuencia puede incrementarse hasta mil veces entre los veinte y los sesenta años de edad. Entre ellos, los más comunes son los que afectan la próstata, pulmón, al intestino grueso, a las mamas y al cuello uterino,^{5, 6} pero la causa exacta de esta enfermedad aun no se conoce. Sin embargo, se tienen bien identificados algunos factores de riesgo que pueden desencadenar la enfermedad. Dentro de éstos se encuentran la edad, sexo y predisposición genética, entre otros.

Sin embargo, hay otras circunstancias como las hormonales, nutricionales (dietas altas en grasa, alimentos ahumados, alcohol), ocupacionales (radiólogos), ambientales (radiaciones ionizantes) o el estilo de vida que pueden ser eliminadas minimizadas o controladas, permitiendo de esta manera prevenir el cáncer.^{6, 7}

La neoplasia (que en latín significa “nuevo crecimiento”) es una anormalidad en la diferenciación, maduración y control del crecimiento celular. Por lo común, las neoplasias se reconocen por la formación de masas de tejido anormal (tumores). El término “tumor” se puede aplicar a cualquier hinchazón y en este contexto, uno de los síntomas principales es la inflamación, pero se emplea con más frecuencia para denotar una neoplasia sospechada. Las neoplasias pueden ser benignas o malignas dependiendo de varias características, principalmente por la capacidad de las neoplasias malignas de propagarse a partir del sitio de origen. Las neoplasias benignas crecen pero permanecen localizadas. Al respecto, el cáncer denota una neoplasia maligna.⁸ Como se mencionó anteriormente, el cáncer es una enfermedad que se presenta indistintamente en cualquier persona, por lo que en México se considera un serio problema y todos los esfuerzos encaminados a la generación de nuevas moléculas antineoplásicas cobra singular importancia.



2.2. El cáncer: un problema de salud mundial.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2012 causó 8,2 millones de defunciones.⁹ Los que más muertes causan cada año son los cánceres de pulmón, hígado, estómago, colon y mama.

Los tipos de cáncer más frecuentes son diferentes en el hombre y en la mujer. Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol.

Más del 60 % de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Estas regiones representan el 70 % de las muertes por cáncer en el mundo, se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán en las próximas dos décadas.⁹

El problema: El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial.⁹ Los principales tipos de cáncer son los siguientes: pulmonar (1,59 millones de defunciones), hepático (745,000 defunciones), gástrico (723,000 defunciones), mamario (521,000 defunciones).

2.2.1. Cáncer de próstata.

El cáncer de próstata es el segundo tipo más común de cáncer entre los hombres de este país. Solamente el cáncer de piel es más común. De cada tres hombres diagnosticados con cáncer cada año, uno es diagnosticado con cáncer de próstata.

La próstata es parte del sistema reproductor del hombre. Está ubicada enfrente del recto y debajo de la vejiga, rodea la uretra (el tubo por el que fluye la orina). Una próstata sana es casi del tamaño de una nuez. Esta produce una parte del fluido seminal, así, durante la eyaculación, el fluido seminal ayuda a transportar los

espermatozoides hacia afuera del cuerpo del hombre como parte del semen.

Las hormonas masculinas (*andrógenos*) hacen que crezca la próstata. Los testículos son la fuente principal de hormonas masculinas, incluyendo la testosterona. Las glándulas suprarrenales también producen testosterona aunque en pequeñas cantidades. Si la próstata crece demasiado, comprime la uretra. Esto puede causar problemas urinarios, al hacer lento o detener el flujo de la orina desde la vejiga al pene.¹⁰ (Figura 3)

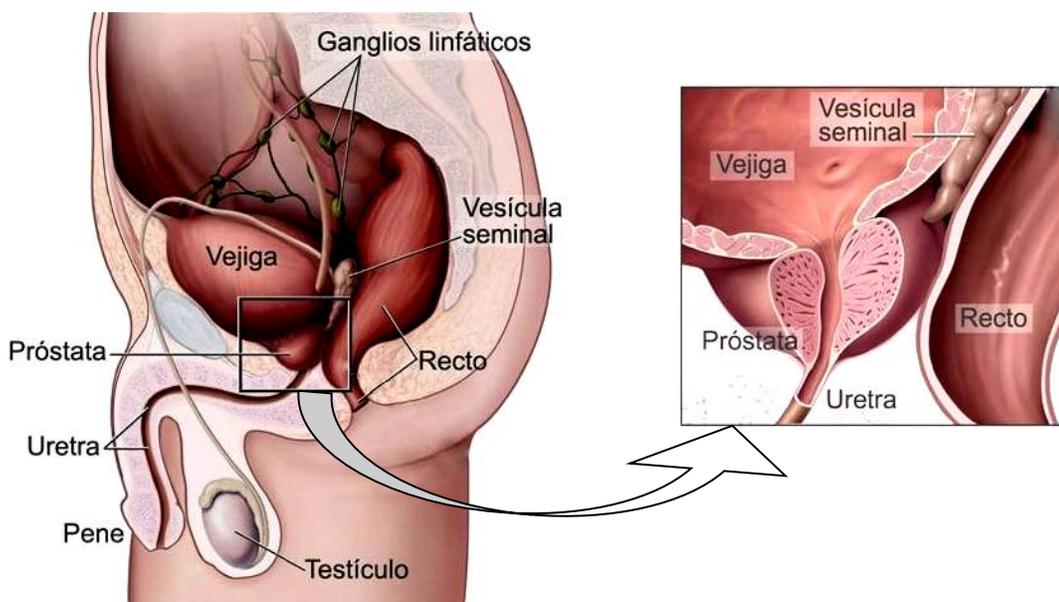


Figura 3. Próstata.¹⁰

El cáncer empieza en las células, las cuales son las unidades básicas que forman los tejidos. Normalmente, las células crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células envejecen, mueren y células nuevas las reemplazan; algunas veces este *proceso ordenado se descontrola*. Células nuevas se siguen formando cuando el cuerpo no las necesita y las células viejas no mueren cuando deberían morir. Estas células adicionales forman una masa de tejido, que es lo que se llama *tumor*.

Los tumores pueden ser *benignos* o *malignos*:

**Los tumores benignos no son cancerosos:**

- Los tumores benignos rara vez ponen la vida en peligro.
- Generalmente, los tumores benignos se pueden operar y pocas veces vuelven a crecer.
- Las células de tumores benignos no invaden los tejidos en su alrededor.
- Las células de tumores benignos no se diseminan a otras partes del cuerpo.

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es el crecimiento anormal de células benignas de la próstata. La próstata crece más y presiona contra la uretra. Esto obstruye el flujo normal de orina (Figura 4). La HPB es un problema muy común, en Estados Unidos, la mayoría de los hombres mayores de 50 años tienen síntomas de HPB. Para algunos hombres, los síntomas pueden ser suficientemente graves como para requerir tratamiento.

Los tumores malignos son cancerosos:

- Los tumores malignos generalmente pueden extirparse, pero frecuentemente pueden volver a crecer.
- Las células de estos tumores pueden invadir y dañar tejidos y órganos cercanos.
- Las células de tumores malignos pueden diseminarse a otras partes del cuerpo desprendiéndose del tumor original (primario) y entran en el torrente de la sangre o en el sistema linfático invadiendo otros órganos y formando tumores nuevos que dañan estos órganos. Cuando el cáncer se disemina, se llama *metástasis*.

Cuando el cáncer se disemina desde su sitio original a otra parte del cuerpo, el nuevo tumor tiene el mismo tipo de células anormales y el mismo nombre que el tumor primario. Por ejemplo, si el cáncer de próstata se disemina a los huesos, las células cancerosas en los huesos son en realidad células cancerosas de próstata. La enfermedad es cáncer metastático de próstata; no es cáncer de huesos. Por esa razón, se trata como cáncer de próstata, no de hueso. Los médicos llaman al tumor nuevo enfermedad "distante" o metastática.¹⁰

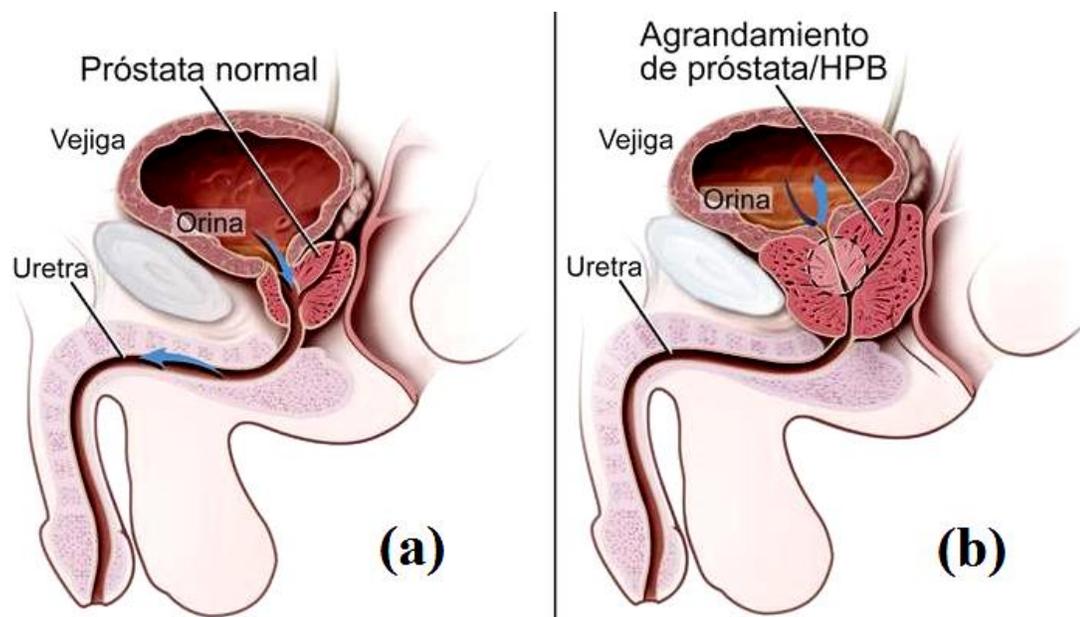


Figura 4. Próstata normal (a) y con HPB (b).¹⁰

2.2.1.1. Factores de riesgo.

No se conocen las causas exactas del cáncer de próstata. Los médicos pueden rara vez explicar por qué un hombre sí padece cáncer de próstata y otro hombre no. Sin embargo, sabemos que el cáncer de próstata no es contagioso. La investigación ha mostrado que hombres con ciertos factores de riesgo tienen más probabilidad que otros de padecer cáncer de próstata.

Los estudios han encontrado los siguientes factores de riesgo de cáncer de próstata:

Edad: La edad es el factor de riesgo principal del cáncer de próstata, es raro en hombres menores de 45 años y las probabilidades de padecerla aumentan considerablemente al envejecer.

Antecedentes familiares: el riesgo de un hombre es mayor si su padre o hermano tuvo esta enfermedad.



Raza: es más común en hombres afroamericanos que en hombres blancos, incluyendo hombres blancos hispanos. Es menos común en hombres asiáticos o en indígenas americanos.

Dieta: Algunos estudios sugieren que los hombres que comen una dieta alta en grasa animal o carne pueden tener un riesgo mayor de presentar cáncer de próstata. Los hombres que tienen una dieta rica en frutas y verduras pueden mostrar un riesgo menor.

Los científicos también han estudiado si la obesidad, el fumar, un virus transmitido sexualmente o la falta de ejercicio pueden aumentar el riesgo de cáncer de próstata.

2.2.1.2. Etapas del cáncer.

En el cáncer de próstata existen estadios (etapas) que se deben tener en cuenta y son los siguientes:

- **Estadio I:** el cáncer no se puede sentir durante un examen rectal. Se encuentra por casualidad cuando se hace una operación por otra razón, generalmente por hiperplasia prostática benigna. El cáncer está localizado sólo en la próstata.
- **Estadio II:** el cáncer más avanzado, pero no se ha diseminado fuera de la próstata.
- **Estadio III:** el cáncer se ha diseminado fuera de la próstata. Se puede encontrar en las vesículas seminales, pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos.
- **Estadio IV:** el cáncer puede estar en los músculos u órganos vecinos (además de las vesículas seminales). Se puede haber diseminado a los ganglios linfáticos y es posible que se haya diseminado a otras partes del cuerpo.
- **Cáncer recurrente** es el que ha regresado (recurrido) después de un tiempo durante el cual no podía ser detectado. Puede recurrir en la próstata o cerca de ella. También puede recurrir en cualquier otra parte del cuerpo, tal como los huesos.



2.2.1.3. *Tratamiento.*

- ✓ Cirugía.
- ✓ Radioterapia.
- ✓ Quimioterapia.
- ✓ Terapia hormonal.
- ✓ Espera vigilante.
- ✓ Criocirugía (Crioterapia).
- ✓ Orquiectomía (Castración).

Aunque existe una gran diversidad de tratamientos para este padecimiento, para fines de este trabajo nos enfocaremos en la síntesis de compuestos con posible uso en la terapia hormonal.

2.2.1.4. *Terapia hormonal.*

Las hormonas sexuales masculinas son conocidas como andrógenos y su nombre se deriva del griego *andros* que significa hombre y *gennan* que significa producir. Los andrógenos son los principales esteroides sexuales del hombre y son los responsables del desarrollo fenotípico masculino durante la embriogénesis y la maduración sexual en la pubertad.¹¹ El principal andrógeno circulante en el hombre es la testosterona^{11, 12} pero su metabolito más activo es la DHT,^{11, 13} la que participa en varios procesos biológicos, dentro de los que se incluyen el desarrollo normal del pene, del escroto, de los testículos, de las glándulas sexuales accesorias y de la presencia de las características sexuales secundarias en la pubertad.^{11, 14-16}

Del 90 al 95 % de los andrógenos son producidos en las células de Leydig en el testículo siendo los más importantes la testosterona, la DHT y la androstendiona, de éstas tres hormonas la testosterona es sintetizada en mayor concentración, por lo que es considerada como el principal andrógeno testicular, representando el 95 % de la testosterona presente en el plasma de hombres sanos.^{17, 18}



La terapia hormonal impide que las células cancerosas obtengan las hormonas masculinas (andrógenos) que necesitan para crecer. Los testículos son los productores principales de la hormona masculina testosterona en el cuerpo, además la glándula suprarrenal produce otras hormonas masculinas y una cantidad pequeña de testosterona.

La terapia hormonal usa fármacos o cirugía:

Fármacos: El médico puede sugerir un fármaco que puede bloquear las hormonas naturales producidas por su cuerpo.

- **Agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante** (luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonists, en inglés). Estos fármacos pueden impedir que los testículos produzcan testosterona. *Ej:* son la leuprolide y la goserelina.
- **Antiandrógenos:** Estos fármacos pueden bloquear la acción de las hormonas masculinas. *Ej:* son la flutamida, la bicalutamida y la nilutamida.
- **Otros fármacos:** Algunos fármacos pueden impedir que las glándulas suprarrenales produzcan testosterona. *Ej:* el ketoconazol y la aminoglutetimida.

Cirugía: La operación para extirpar los testículos se llama orquiectomía.

Después de la orquiectomía o del tratamiento con un agonista de la hormona liberadora de hormona luteinizante, el cuerpo ya no obtiene testosterona de los testículos. Las glándulas suprarrenales todavía producen pequeñas cantidades de las hormonas masculinas, así que es posible que le den un antiandrógeno para bloquear la acción de las hormonas masculinas que quedan. Esta combinación de tratamientos se conoce como *bloqueo total de andrógenos*.



2.2.2. Cáncer de mama.

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más común en las mujeres. Aunque la tasa de curación del cáncer de mama ha aumentado durante las últimas décadas, esto se debe principalmente a la detección temprana del cáncer de mama. La eficacia de la quimioterapia no se ha incrementado sustancialmente y los efectos secundarios no deseados siguen siendo inaceptablemente altos, esto subraya claramente la necesidad de desarrollar nuevos agentes quimioterapéuticos para tratamientos contra el cáncer más efectivos.^{19, 20}

El cáncer de mama es el cáncer más común entre las mujeres, solo en los Estados Unidos (con excepción del cáncer de piel) y solo en 2013, más de 230,000 mujeres recibieron un diagnóstico de cáncer.

El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal, este cáncer empieza en las células que revisten los conductos del mama. (Figura 5). Casi 7 de cada 10 mujeres con cáncer de mama tienen carcinoma ductal. El segundo tipo más común es el carcinoma lobulillar. Este cáncer empieza en un lobulillo del mama y casi una de cada 10 mujeres con cáncer de mama tiene carcinoma lobulillar.

Otras mujeres tienen una mezcla de los tipos de carcinoma ductal y lobulillar o tienen un tipo menos común de cáncer de mama.

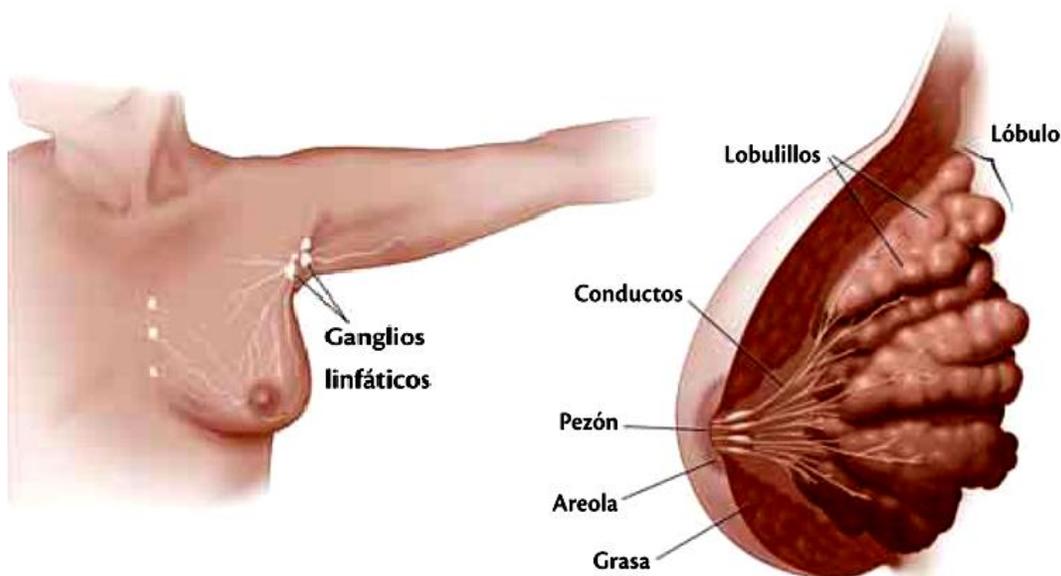


Figura 5. Lobulillos, conductos dentro del seno y ganglios linfáticos cercanos al seno.¹⁰

2.2.2.1. Exámenes de laboratorio en tejido del mama.

- **Pruebas de receptores de hormonas:** Algunos cánceres de mama necesitan hormonas para crecer. Estos cánceres tienen receptores hormonales de estrógeno (RE) y para la progesterona (RP), o para ambas. Si las pruebas de receptores de hormonas muestran que el tumor del seno tiene estos receptores, entonces la terapia hormonal suele recomendarse como parte del plan de tratamiento.
- **Prueba HER₂:** Algunos tumores de seno tienen grandes cantidades de una proteína llamada HER₂ (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 / Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano), la cual ayuda a que crezcan esos tumores, esta prueba muestra si el tumor del seno de una mujer tiene una gran cantidad de proteína HER₂, si es así, entonces la terapia dirigida contra la proteína HER₂ puede ser una opción de tratamiento.



2.2.2.2. Etapas del cáncer.

Al igual que en el cáncer de próstata en cáncer de mama también existen estadios o etapas que dependen del tamaño del tumor del mama y si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos o a otras partes del cuerpo.

Los médicos describen los estadios del cáncer de mama mediante el uso de los números romanos 0, I, II, III y IV y de las letras A, B y C.

Un cáncer en estadio I es cáncer de mama en etapa inicial y un cáncer en estadio IV es cáncer avanzado que se ha diseminado a otras partes del cuerpo, como al hígado. El estadio, por lo general, no se conoce sino hasta después de la extirpación del tumor en el seno y uno o más ganglios linfáticos bajo el brazo (axilares).¹⁰

- **Estadio 0:** es un carcinoma *in situ*. En el carcinoma ductal *in situ* (CDIS), hay células anormales en el revestimiento de un conducto del seno, pero las células anormales no han invadido el tejido de seno cercano ni se han diseminado fuera del conducto.
- **Estadio IA:** El tumor del seno no tiene más de 2 centímetros (no mide más de 3/4 de pulgada) de un lado a otro. El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos. Un tumor que mide 2 centímetros tiene aproximadamente el tamaño de un cacahuete y un tumor que mide 5 centímetros tiene aproximadamente el tamaño de una lima.
- **Estadio IB:** El tumor no tiene más de 2 centímetros de un lado a otro y se encontraron células cancerosas en los ganglios linfáticos.
- **Estadio IIA:** El tumor no tiene más de 2 centímetros de un lado a otro y el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos de la axila, o el tumor tiene de 2 a 5 centímetros (de 3/4 de pulgada a 2 pulgadas) de un lado a otro, pero el cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos de la axila.
- **Estadio IIB:** El tumor tiene de 2 a 5 centímetros de un lado a otro, y el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos de la axila, o el tumor tiene más de 5



centímetros de un lado a otro, pero el cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos de la axila.

- **Estadio IIIA:** El tumor del seno no tiene más de 5 centímetros de un lado a otro y el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos de la axila que están conectados unos con otros o con tejidos del alrededor o, el cáncer puede haberse diseminado a los ganglios linfáticos detrás del esternón, o el tumor tiene más de 5 centímetros de un lado a otro. El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos bajo el brazo que pueden estar conectados unos con otros o con tejidos cercanos, o el cáncer puede haberse diseminado a los ganglios linfáticos detrás del esternón, pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos de la axila.
- **Estadio IIIB:** El tumor del seno puede tener cualquier tamaño, y ha crecido dentro de la pared del tórax o de la piel del seno. El seno puede estar hinchado o la piel del seno puede tener bultos. El cáncer puede haberse diseminado a los ganglios linfáticos bajo el brazo, y esos ganglios pueden estar conectados unos con otros o con tejido cercano, o el cáncer puede haberse diseminado a los ganglios linfáticos detrás del esternón.
- **Estadio IIIC:** El tumor del seno puede tener cualquier tamaño y se ha diseminado a los ganglios linfáticos detrás del esternón y bajo el brazo, o el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos arriba o abajo de la clavícula.
- **Estadio IV:** El tumor puede tener cualquier tamaño, y las células cancerosas se han diseminado a otras partes del cuerpo, como a los pulmones, al hígado, a los huesos o al cerebro.

Cáncer inflamatorio de mama es un tipo poco común que se presenta en casi una mujer de cada 100 mujeres que padecen cáncer invasor de mama.

Los senos se ven rojos e hinchados porque las células cancerosas bloquean los vasos linfáticos en la piel del seno. Cuando un médico diagnostica un cáncer inflamatorio de seno, se trata por lo menos de **estadio IIIB**, pero podría ser más avanzado.¹⁰



2.2.2.3. Tratamiento.

Las mujeres con cáncer de seno tienen muchas opciones de tratamiento. Las opciones de tratamiento son:

- ✓ Cirugía
- ✓ Radioterapia
- ✓ Terapia hormonal
- ✓ Quimioterapia
- ✓ Terapia dirigida

El tratamiento que es mejor para una mujer puede no ser el mejor para otra. El tratamiento que es correcto para una mujer depende principalmente de:

- El estadio del cáncer de mama.
- Si el tumor tiene (o no) receptores de hormonas.
- Si el tumor tiene (o no) altos niveles de proteína HER₂.
- Su estado general de salud

Además, el plan de tratamiento depende de:

- El tamaño del tumor en relación con el tamaño del seno.
- Si ha pasado (o no) por la menopausia.¹⁰

Al igual que en el cáncer de próstata, también existen varios tratamientos contra el cáncer de mama, para fines de este trabajo nos enfocaremos en la síntesis de compuestos con posible uso en la terapia hormonal.

2.2.2.4. Terapia hormonal.

La terapia hormonal puede también llamarse tratamiento anti-hormonal. Si los análisis de laboratorio indican que sus células cancerosas del seno tienen receptores de hormonas, entonces la terapia hormonal puede ser una opción. Esta terapia



hormonal impide que las células cancerosas obtengan las hormonas naturales (estrógeno y progesterona) que necesitan para proliferar (inhibiendo la biosíntesis de las hormonas o impidiendo su unión con su respectivo receptor).

Si la mujer no ha pasado por la menopausia, las opciones para la terapia hormonal son las siguientes:

- Un fármaco que bloquea la actividad del estrógeno en el cuerpo, es decir, que funcione como un antagonista del receptor de estrógenos (tamoxifeno).
- Cirugía para extirpar los ovarios (los cuales producen estrógeno).
- Un fármaco que reduce la cantidad de estrógeno producido por los ovarios (agonista LH-RH).

Si ya ha pasado por la menopausia, las opciones son las siguientes:

- Un fármaco que impide que el cuerpo produzca estrógeno (inhibidor de aromataasa).
- Tamoxifeno.

Los efectos secundarios de la terapia hormonal dependen del tipo de tratamiento; dentro de los más comunes son los bochornos y sofocos, secreción vaginal y náuseas.

2.3. Esteroides.

Los esteroides forman un grupo de compuestos estructuralmente relacionados, ampliamente distribuido en la naturaleza y poseen un amplio espectro de actividades biológicas. Los derivados sintéticos de los esteroides también han atraído una gran atención para desarrollar compuestos para el tratamiento de varias enfermedades. En particular, la síntesis de nuevos derivados esteroidales que comprenden heterociclos han recibido mucha atención, ya que han demostrado que tienen importantes propiedades farmacológicas.²¹ Este tipo de compuestos orgánicos son derivados del



núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano que se compone de carbono e hidrógeno formando cuatro anillos fusionados, tres con seis átomos de carbono (A, B, C) y uno con cinco (D); posee en total 17 átomos de carbono. En los esteroides esta estructura básica se modifica por adición de diversos grupos funcionales, como carbonilos e hidroxilos (hidrófilos) o cadenas hidrocarbonadas (hidrófobas).

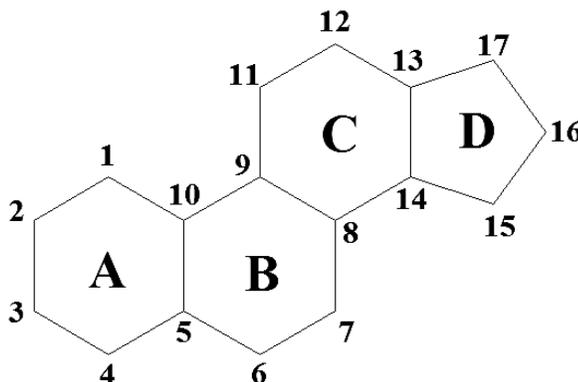


Figura 6. Sistema de esterano o ciclopentanoperhidrofenantreno.

2.3.1. Funciones

En los mamíferos, como el ser humano, cumplen importantes funciones:

- **Reguladora:** Algunos regulan los niveles de sal y la secreción de bilis.
- **Estructural:** El colesterol es un esteroide que forma parte de la estructura de las membranas de las células junto con los fosfolípidos. Además, a partir del colesterol se sintetizan los demás esteroides.
- **Hormonal:** Las hormonas esteroides son:

Corticoides: glucocorticoides y mineralocorticoides. Existen múltiples fármacos con actividad corticoide, como la prednisona (Figura 8).

Hormonas sexuales masculinas: son los andrógenos, como la testosterona y sus derivados, los anabolizantes androgénicos esteroides (AE); estos últimos llamados simplemente esteroides.

Hormonas sexuales femeninas: Estrógenos, progestágenos.

Vitamina D y sus derivados.

Todas las hormonas esteroidales son derivadas del colesterol. Además, todas las hormonas, con la excepción de la vitamina D, contienen el mismo anillo de ciclopentanofenantreno y utilizan la misma numeración atómica que el colesterol. Los esteroides con 21 átomos de carbono se conocen sistemáticamente como pregnanos, mientras que los que contienen 19 y 18 átomos de carbonos se conocen como androstanos y estranos, respectivamente.

2.3.2. Uso de derivados esteroidales para tratamiento del cáncer.

Al escuchar la palabra "esteroides" es posible que se piense automáticamente en los fisicoculturistas con músculos redondeados y los riesgos de salud que implica el abuso de los esteroides anabólicos (fármacos que se pensaron inicialmente para tratar los trastornos del crecimiento, los bajos niveles de testosterona y otros problemas de salud).

Si a una persona le han recetado esteroides para el cáncer, puede estar seguro de que no estará recibiendo esteroides anabólicos, sino *corticosteroides*. Los corticosteroides están hechos a partir de un esteroide natural presente en el cuerpo humano que se conoce como "cortisol".

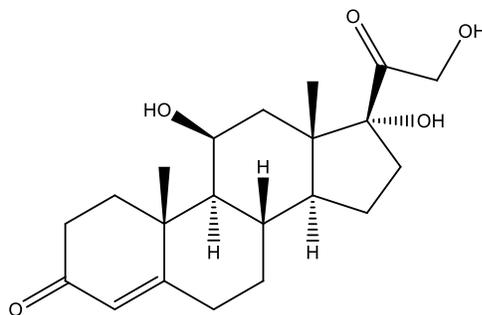


Figura 7. Cortisol (Hidrocortisona).

El cortisol es una hormona (igual que la testosterona o el estrógeno) que puede tener

efectos terapéuticos en el organismo. Las versiones sintéticas de la hormona (incluida la cortisona, la hidrocortisona, la prednisona, la metilprednisolona y la dexametasona) se recetan para ayudar a lograr lo siguiente:

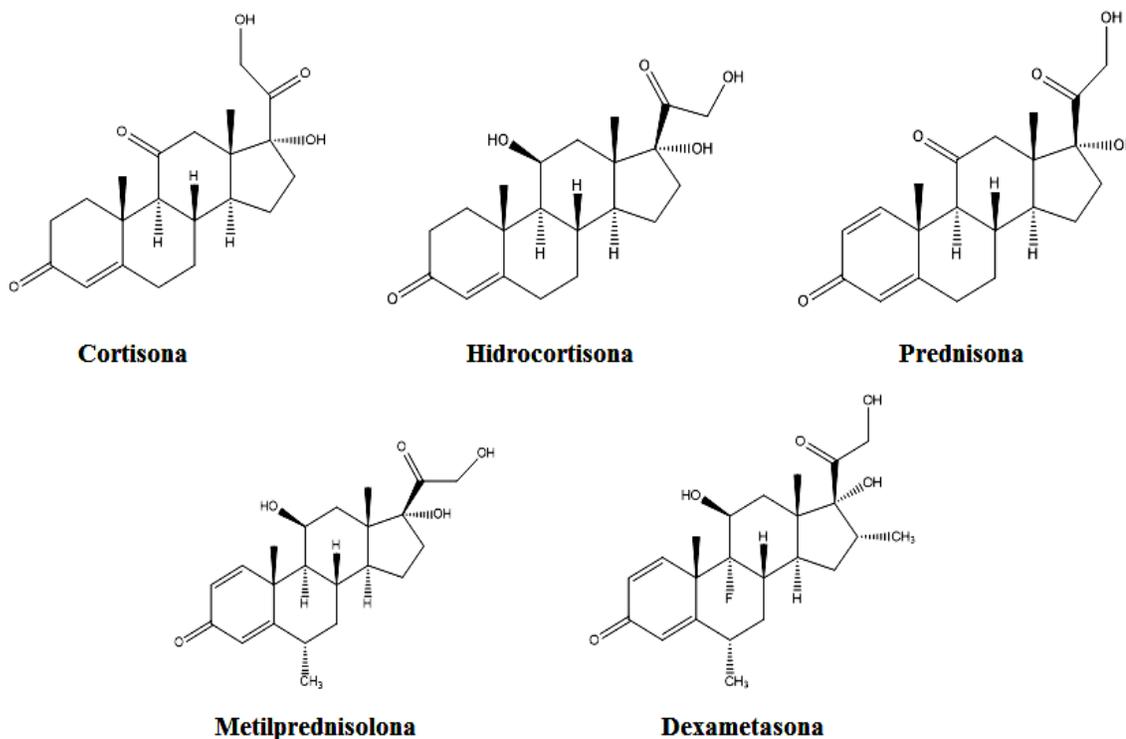


Figura 8. Versiones sintéticas de la hormona cortisol.

- Reducir las náuseas asociadas con la quimioterapia o la radiación.
- Matar las células cancerosas y reducir los tumores como parte de la quimioterapia.
- Reducir la inflamación.
- Reducir las reacciones alérgicas (por ejemplo, antes de las transfusiones de sangre).
- Aliviar los dolores de cabeza provocados por tumores cerebrales.

Los esteroides a veces se inyectan o se administran por vía intravenosa, pero también es posible tomarlos en forma de líquido o píldora, o aplicarlos en forma de crema. Es por esto que se ha comprobado que los esteroides son de amplio uso médico y por lo tanto son blanco en nuevos modelos moleculares para uso como anticancerígenos.²²



2.4. Heterociclos con actividad biológica.

Un número importante de fármacos que se emplean en la clínica para el tratamiento de enfermedades son estructuras heterocíclicas; asimismo, este tipo de sistemas desempeñan un papel determinante en la economía celular, basta decir que en la naturaleza sistemas heterocíclicos como las purinas y pirimidinas forman parte fundamental del DNA. Particularmente, en el campo de la terapia oncológica moléculas útiles como la: isofosfamida, dacarbazina, temozolomida, 5-fluoroacilo, capecitabina, mercaptopurina, fludarabina, entre otros, tienen como estructura fundamental un sistema heterocíclico (Figura 1).

Al respecto, en la literatura especializada existe un variado número de informes que hacen referencia a nuevas moléculas, las cuales han presentado actividad apoptótica.⁴

23-25

2.5. Desarrollo de fármacos.

Uno de los primeros pasos en el desarrollo de nuevos medicamentos es el descubrimiento o síntesis de una molécula con fines médicos potenciales y la correlación de dicha molécula con un blanco biológico determinado, la aplicación repetida de este sistema permite identificar compuestos con mayor potencia y selectividad.

La obtención de un fármaco se lleva a cabo a través de distintas estrategias como:

- ✓ Identificación de nuevos fármacos modelos.
- ✓ Diseño racional de fármacos basado en la comprensión de mecanismos biológicos, estructura receptora del fármaco, estructura del fármaco, propiedades fisicoquímicas del fármaco.
- ✓ Modificación química de una molécula conocida.



- ✓ Investigación de la actividad biológica de abundantes productos naturales, bancos de entidades químicas ya descubiertas y grandes bibliotecas de información sobre péptidos y ácidos nucleicos y otras moléculas orgánicas.
- ✓ Biotecnología y clonación de genes para producir proteínas y péptidos más grandes de interés biológico.

Cualquiera que sea la estrategia empleada para obtener un fármaco, se debe de contar con un bioensayo que permita la detección de un gran número de compuestos bioactivos durante el cernimiento.

Una metodología que es comúnmente empleada en la detección de un fármaco potencial, es el cernimiento primario y secundario.²⁶ En el primero de ellos se requiere un bioensayo de gran sensibilidad que permita detectar una gran cantidad de moléculas potencialmente activas. Por otro lado, en el cernimiento secundario se detectan moléculas con actividad específica. Sin embargo, las estrategias de búsqueda o detección se han diversificado de acuerdo a las tecnologías con las que se cuenta y la filosofía del pensamiento del grupo de investigación.

El ejemplo más importante de investigación de nuevos fármacos antineoplásicos, lo constituye el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (INC). El INC cuenta con una colección de compuestos superior a los 600,000.

La estrategia de búsqueda que se emplea por el INC sigue los siguientes pasos:

- ✓ La evaluación preliminar de la actividad citotóxica de un compuesto se prueba a una concentración en tres diferentes líneas celulares cancerosas.²⁷
- ✓ La evaluación en 60 líneas celulares de cáncer de la actividad citotóxica del compuesto a evaluar en al menos cinco concentraciones diferentes. Este esquema de trabajo permite determinar una especificidad relativa para ciertos tipos de tumores debido a la cantidad y diversidad de líneas celulares que se utilizan.
- ✓ La comparación del perfil farmacológico del compuesto de prueba con el



perfil mostrado por agentes antineoplásicos de mecanismos de acción conocido. Esto se realiza con el fin de postular un posible mecanismo de acción del compuesto a evaluar.

- ✓ La evaluación *in vivo* mediante el uso de modelos de tumores murinos y tumores humanos transplantados en ratones atímicos (ratón desnudo).

Esta metodología plantea ventajas y desventajas en la búsqueda de potenciales fármacos antineoplásicos, sobre todo debido a la elevada cantidad de recursos y personal capacitado.²⁸

Por otro lado, el conocimiento de la estructura, las propiedades físicas y químicas de los posibles agentes farmacológicos, es una metodología empleada en muchos laboratorios de investigación para el cernimiento de moléculas con una actividad biológica potencial, las cuales conducen a la propuesta de moléculas capaces de atravesar la membrana celular debido a sus propiedades de lipofilicidad expresada en términos de qué tanto se distribuyen en n-octanol/agua (LogP).

2.6. El ácido nicotínico.

La niacina (vitamina B-3, ácido nicotínico), es un compuesto con un heteroátomo de nitrógeno, el cual ha sido estudiado en el campo médico por sus beneficios a la salud. Entre estos, se ha utilizado para una variedad de condiciones como:

- La ansiedad y la depresión
- Artritis
- Diabetes.
- Dolor de cabeza.
- El síndrome premenstrual (SPM).
- Vértigo.²⁹

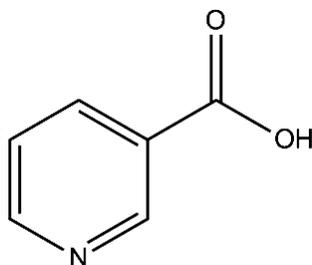


Figura 9. Estructura del ácido nicotínico.

Se ha observado que el tratamiento de pacientes con cáncer considerando dietas especiales que incluyen niacina (50 mg de 8 a 10 veces por día), muestran regresión de tumores cancerígenos; sin embargo el mecanismo de acción aun no ha sido elucidado.³⁰

Con base en esto, se sugiere que derivados de la niacina podrían ofrecer una alternativa terapéutica para la inhibición la proliferación de células cancerosas.



CAPÍTULO 3.

HIPÓTESIS

Debido a la alta actividad biológica descrita para diversos derivados esteroidales, especialmente los que pertenecen a la familia del pregnano³¹ contra el cáncer de próstata y mama, se espera que las moléculas sintetizadas en este trabajo muestren una inhibición de la proliferación de líneas celulares cancerosas de próstata (PC-3), mama RE+/RP+ (MCF-7) y mama RE-/RP- (MDA-MB231), debido a la presencia de centros electrofílicos en su estructura y de diferentes ésteres aromáticos (con nitrógeno) en la posición 3 del esqueleto esteroidal.

OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo general:

Sintetizar compuestos esteroidales derivados de la 16-dehidropregnenolona con una función éster en C-3, un carbonilo α,β no saturado en C-6 y evaluar su posible actividad biológica en líneas de cáncer.

3.2.2. Objetivos específicos:

- ✓ Sintetizar los intermediarios:
 - 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).
 - 3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3).
 - 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).
 - 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5).

- ✓ Sintetizar los cinco compuestos esteroidales (con una función éster en C-3), purificarlos y caracterizarlos por técnicas espectroscópicas y espectrométricas para su identificación (compuestos 6-10).

- ✓ Determinar y comparar la actividad biológica mediante ensayos *in vitro* de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas (PC-3, MCF-7 y MDA-MB231).



CAPÍTULO 4.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental que se realizó en el presente trabajo se dividió en dos partes. La parte química, donde se llevó a cabo la síntesis, caracterización física y espectroscópica de los intermediarios y de los compuestos finales con ácido nicotínico y la parte biológica que involucró la evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados en diferentes líneas celulares de cáncer.

4.1. Metodología química.

En esta parte, se realizó la purificación y el análisis físico y espectroscópico de los compuestos sintetizados.

Los puntos de fusión de los compuestos sintetizados se determinaron en un equipo Fisher-Johns. La pureza de los compuestos y el avance de las reacciones se siguieron por cromatografía en capa fina, utilizando cromatoplasmas de gel de sílice MN Kieselgel 60 y un sistema de elución hexano-acetato de etilo 6:4 y Cloroformo-Acetona 95:5. Para visualizar las placas se empleó lámpara de luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) y una solución de CoCl_2 al 2% en H_2SO_4 .

Los equipos utilizados para la caracterización de los intermediarios y compuestos finales fueron:

- Para la espectrofotometría de absorción en el infrarrojo (IR) se utilizó un espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer modelo 1605 utilizando la técnica de pastilla de bromuro de potasio (KBr).
- Para la técnica de espectrofotometría de absorción en el ultravioleta (UV) se empleó el espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer modelo Lambda 2 y se



utilizó como disolvente metanol (CH_3OH)

- Para la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) e hidrógeno (RMN ^1H), se utilizaron los equipos Inova Varian, de 400 MHz, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm referentes al tetrametilsilano (TMS); las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hz.
- Finalmente para la espectrometría de masas (EM) se empleó un espectrómetro de masas Termo-Electron, modelo DFS (Double Focus Sector) con un analizador másico de doble sector (magnético y eléctrico, geometría inversa), mediante la técnica FAB con bombardeo de iones de cesio (Cs^+) a una temperatura de cámara menor a $50\text{ }^\circ\text{C}$ mediante detección de iones positivos, utilizando como matriz alcohol nitrobencílico (ANB). Ver anexo E57

4.1.1. Ruta de síntesis.

La síntesis de los nuevos derivados fue realizada de acuerdo a la siguiente ruta.

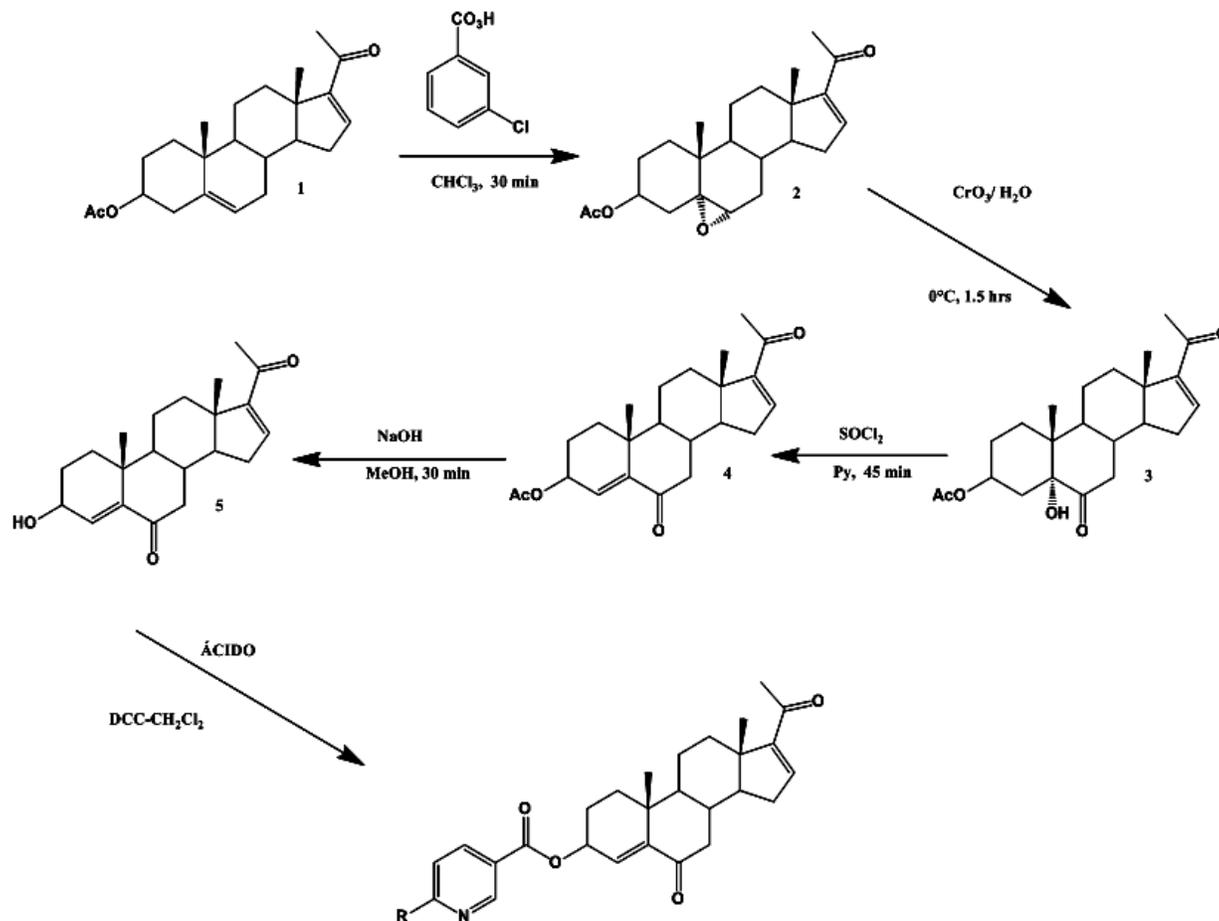


Figura 10. Ruta de síntesis.

Tabla 2. Sustituyentes en la posición 4' del ácido nicotínico.

R	Compuesto
H	6
Cl	7
Br	8
CH ₃	9
CH ₃ O	10

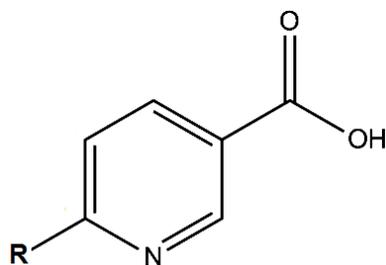


Figura 11. Sustituyente R en ácido nicotínico.

4.1.2. Numeración de los esqueletos carbonados presentes en este trabajo.

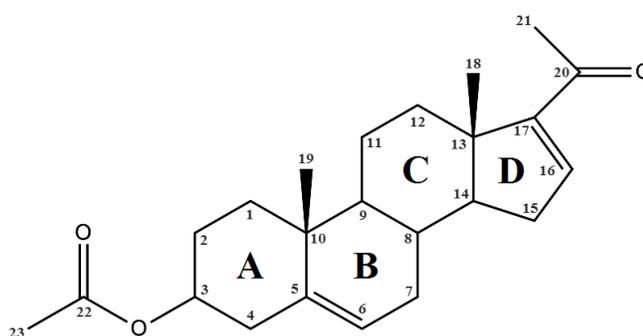


Figura 12. Numeración de compuestos 1 a 5.

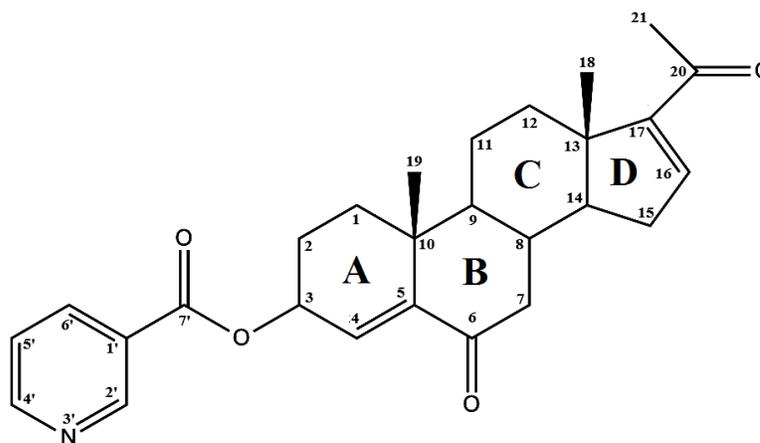


Figura 13. Numeración de compuestos 6 a 10.

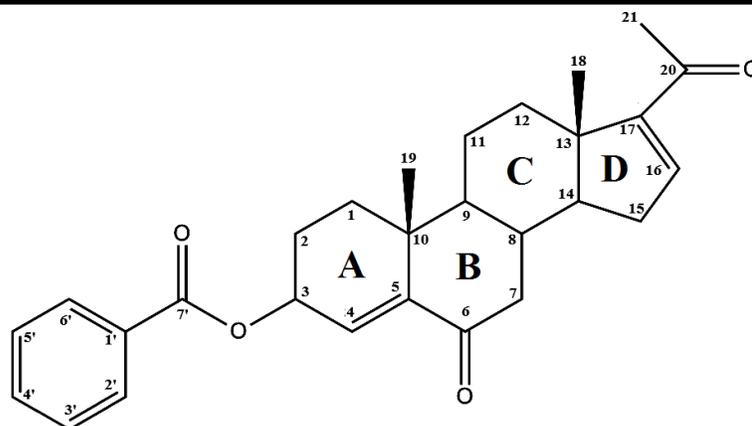


Figura 14. Numeración de la 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**11**).

4.1.3. Síntesis de compuestos 2-5.

4.1.3.1. Purificación y caracterización de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona

(**1**).

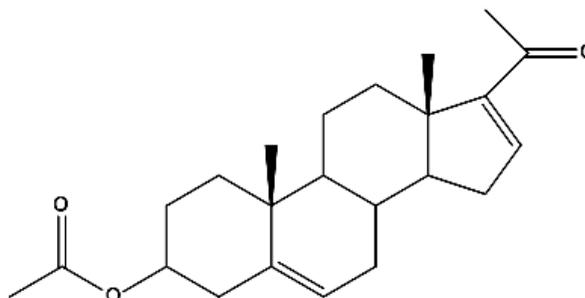


Figura 15. Estructura de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (**1**).

Para la caracterización de la materia prima se llevó a cabo una recrystalización en metanol. Los cristales en forma de aguja obtenidos después de esta purificación presentaron las siguientes características.

FM: C₂₃H₃₂O₃. **PM:** 356.24 uma. **PF:** 174-175 °C. **IR (KBr) cm⁻¹:** 2942, 1728, 1660. **UV (nm):** 237. **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 15.7 (C-18), 19.2 (C-19), 21.4 (C-23, -CO₂-CH₃), 27.7 (C-21, -O=C-CH₃), 73.9 (C-3), 121.9 (C-6), 140.3 (C-5), 144.34 (C-16, vinílico), 155.4 (C-17, vinílico), 170.5 (C-22, C=O), 196.8 (C-20, C=O). **¹H-RMN (CDCl₃) δ :** 0.93 (3H,s, H-18), 1.07 (3H,s, H-19), 2.04 (3H,s, H-23, -CO₂-

CH_3), 2.27 (3H,s, H-21, $-\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$), 4.61 (1H,m, H-3), 5.39 (1H,d, $J = 4$ Hz, H-6), 6.71 (1H,d, $J = 1.2$ Hz, H-16). EM-FAB m/z : 357 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Ver anexos: Figuras E1 a E5.

4.1.3.2. Síntesis y caracterización de la 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).

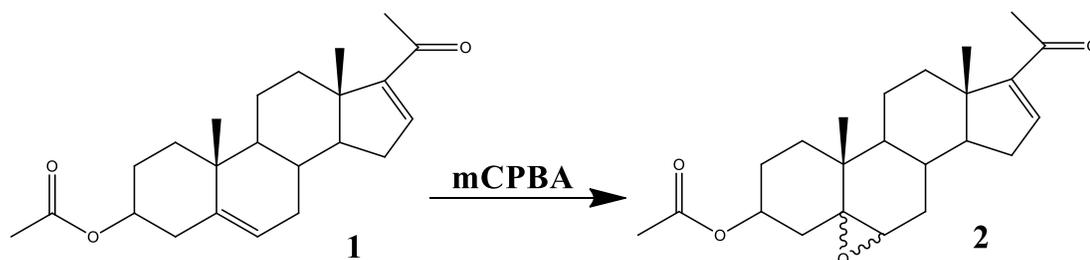


Figura 16. Reacción de epoxidación 1 a 2.

En un matraz bola de 100 mL se colocó un gramo del esteroide **1** (2.82 mmol) y ácido *meta* cloroperoxibenzoico (mCPBA = 1.62 g) en cloroformo (50 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos.

Una vez concluida la epoxidación se adicionó una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (84 mL) que contenía bisulfito de sodio (1 g). El producto se extrajo con cloroformo (3 \times 50 mL), la fase orgánica se lavó con agua destilada (3 \times 50 mL), posteriormente se secó con sulfato de sodio anhidro y se puso en el rotaevaporador para retirar el exceso de disolvente. El producto crudo se recrystalizó en metanol obteniéndose cristales blancos con un rendimiento del **92%** y un punto de fusión de 172-173 °C. No se separaron los isómeros α y β del epóxido, estando en mayor proporción el isómero α .

A continuación se muestran las señales características del compuesto **2**.

FM: $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$. **PM:** 372.23 uma. **Rendimiento:** 92%. **PF:** 172-173 °C. **IR (KBr)** cm^{-1} : 2937, 1731, 1658; **UV (nm):** 237. **^{13}C -RMN (CDCl_3) δ :** 15.62 (isómero α , C-18), 15.68 (isómero β , C-18), 16.9 (isómero α , isómero β , C-19), 21.33 (isómero α , C-

23, -CO₂-CH₃), 21.39 (isómero β, C-23, -CO₂-CH₃), 27.12 (isómero α, C-21, -O=C-CH₃), 27.15 (isómero β, C-21, -O=C-CH₃), 63.20 (isómero β, C-6), 63.27 (isómero α, C-6), 65.16 (isómero β, C-5), 65.34 (isómero α, C-5), 71.20 (isómero β, C-3), 71.24 (isómero α, C-3), 144.13 (isómero α, C-16, vinílico), 144.17 (isómero β, C-16, vinílico), 155.08 (isómero α, C-17, vinílico), 155.20 (isómero β, C-17, vinílico), 170.18 (isómero α, C-22, C=O), 170.51 (isómero β, C-22, C=O), 196.67 (isómero β, C-20, C=O), 196.70 (isómero α, C-20, C=O). ¹H- RMN (CDCl₃) δ: 0.85 (3H,s, isómero α, H-18), 0.87 (3H,s, isómero β, H-18), 1.12 (3H,s, isómero α, H-19), 1.04 (3H,s, isómero β, H-19), 2.02 (3H,s, isómero α, H-21, -O=C-CH₃), 2.03 (3H,s, isómero β, H-21, -O=C-CH₃) 2.25 (6H,s, isómero α, isomero β, H-23, -CO₂-CH₃), 2.92 (1H,d, J = 4.0 Hz, isómero α, H-6), 3.11 (1H,d, J = 4.0 Hz, isómero β, H-6), 4.77 (1H,m, isómero β, H-3), 4.95 (1H,m, isómero α, H-3), 6.68 (2H,d, J = 1.2 Hz, isómero α, isomero β, H-16). **EM-FAB m/z:** 373 [M+H]⁺. **Ver anexos:** Figuras E6 a E10.

4.1.3.3. Síntesis y caracterización de la 3β-acetoxi-5α-hidroxipregnan-16-en-6,20-diona (3).

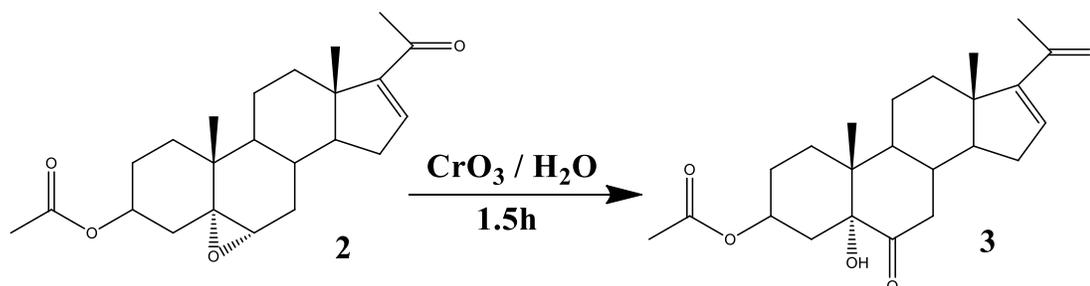


Figura 17. Reacción de oxidación 2 a 3.

En un matraz bola se adicionó un gramo del esteroide **2** (2.68 mmol) y 25 mL de acetona y se dejó en agitación hasta que se disolvió por completo. Se adicionó una solución de óxido de cromo (VI) en agua (2.3 g de óxido de cromo (VI) en 12 mL de agua) en tres tiempos divididos en 30 min. Al término de la reacción se adicionó 150 mL de hielo y se dejó precipitar el producto, se filtró y se lavó con agua hasta que el compuesto quedó completamente blanco. El producto se recristalizó en metanol obteniéndose cristales blancos con un rendimiento del **77 %** y un punto de fusión de

248-249 °C.

A continuación se muestran las señales características del compuesto **3**.

FM: C₂₃H₃₂O₅. **PM:** 388.22 uma. **Rendimiento:** 77 %. **PF:** 248-249 °C. **IR (KBr) cm⁻¹:** 3356, 2943, 1700, 1733, 1651. **UV (nm):** 236. **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 13.9 (C-18), 15.8 (C-19), 21.4 (C-23, -CO₂-CH₃), 27.1 (C-21, -O=C-CH₃), 35.5 (C-4), 70.8 (C-3), 80.2 (C-5), 143.1 (C-16, vinílico), 155.0 (C-17, vinílico), 171.2 (C-22, C=O), 96.8 (C-20, -O=C-CH₃), 212.1 (C-6, C=O). **¹H- RMN (CDCl₃) δ:** 0.86 (3H,s, H-18), 1.00 (3H,s, H-19), 2.01 (3H,s, H-23, -CO₂-CH₃), 2.26 (3H,s, H-21, -O=C-CH₃), 3.69 (1H,s, OH), 5.03 (1H,m, H-3), 6.69 (1H,d, J = 1.2 Hz, H-16). **EM-FAB m/z:** 389 [M+H]⁺. **Ver anexos:** Figuras E11 a E16.

4.1.3.4. Síntesis y caracterización de la 3β-acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**4**).

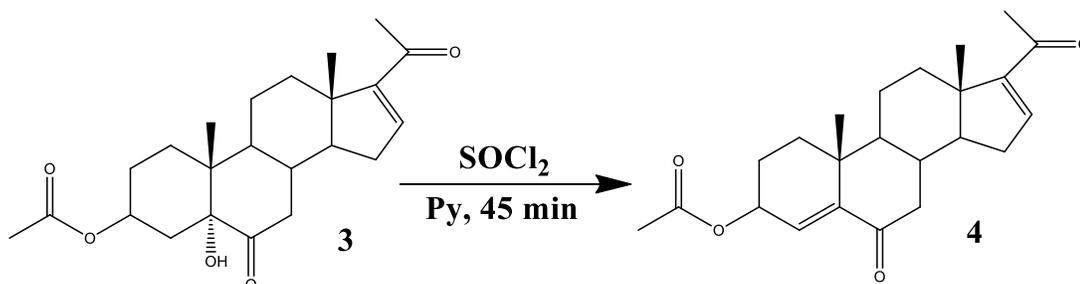


Figura 18. Reacción de eliminación **3** a **4**.

En un matraz bola de 50 mL se disolvió 1 gramo del esteroide **3** (2.57 mmol) en 8 mL de CHCl₃ seco y se puso bajo atmósfera inerte con N₂, luego se agregó 0.8 mL de piridina recientemente destilada. Luego de unos minutos de agitación, se enfrió en un baño de hielo y se adicionó 0.2 mL de cloruro de tionilo (SOCl₂), la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 2 horas.

Concluida la reacción (la cual se siguió por CCF) se agregó 10 mL de una solución acuosa de HCl (50:50) y se dejó en agitación por 30 minutos más. Se separó la fase

orgánica, se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (en fracciones 3×50 mL), finalmente se lavó con agua destilada (3×50 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró en rotavapor. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando como fase móvil hexano-acetato de etilo (80:20) y fase estacionaria florisil. Se obtuvieron cristales blancos con un rendimiento de **78 %** y un punto de fusión de 204-205°C.

A continuación se muestran las señales características del compuesto **4**.

FM: C₂₃H₃₀O₄. **PM:** 370.2 uma. **Rendimiento:** 78 %. **PF:** 204-205 °C. **IR (KBr) cm⁻¹:** 2942, 1733, 1679, 1657. **UV (nm):** 236. **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 15.8 (C-18), 19.6 (C-19), 24.0 (C-23, -CO₂-CH₃), 27.1 (C-21, -O=C-CH₃), 69.2 (C-3), 129.0 (C-4, vinílico), 143.8 (C-16, vinílico), 147.9 (C-5, vinílico), 154.8 (C-17, vinílico), 170.7 (C-22, C=O), 196.6 (C-20, C=O), 201.8 (C=O de C-6). **¹H- RMN (CDCl₃) δ:** 0.93 (3H,s, H-18), 1.06 (3H,s, H-19), 2.07 (3H,s, H-23, -CO₂-CH₃), 2.28 (3H,s, H-21, -O=C-CH₃), 5.33 (1H,m, H-3), 6.10 (1H,s, H-4), 6.71 (1H,d, J = 1.6 Hz, H-16). **EM-FAB m/z:** 371 [M+H]⁺. **Ver anexos:** Figuras E17 a E21.

4.1.3.5. Síntesis y caracterización de la 3β-hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5).

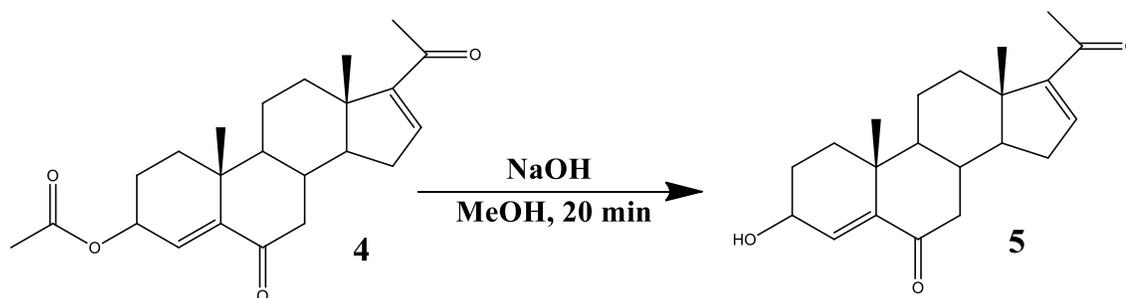


Figura 19. Reacción de hidrólisis **4** a **5**.

En un matraz bola de 250 mL se adicionó 1 gramo del esteroide **4** (2.7 mmol) junto con 150 mL de metanol, se dejó en agitación hasta disolución completa, luego se adicionó 10 mL de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 2%.



Al finalizar la reacción (aprox. 20 min), la mezcla de reacción obtenida se secó con corriente de aire hasta un 40% del volumen inicial, se adicionó 200 mL de agua fría (lo cual induce la precipitación del compuesto **5**), el sólido se lavó con agua destilada (3×50 mL) para eliminar los residuos de NaOH.

El producto obtenido se purificó por columna cromatográfica usando como fase móvil hexano-acetato de etilo (85:15) y como fase estacionaria gel de sílice, obteniéndose un polvo blanco con un rendimiento del **81%** y con un punto de fusión de 168-169 °C.

A continuación se muestran las señales características del compuesto **5**.

FM: C₂₁H₂₈O₃. **PM:** 328 uma. **Rendimiento:** 81 %. **PF:** 168-169 °C. **IR (KBr) cm⁻¹:** 3421, 2940, 1677, 1650. **UV (nm):** 237. **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 15.8 (C-18), 19.8 (C-19), 27.1 (C-21, -O=C-CH₃), 67.2 (C-3), 133.2 (C-4, vinílico), 143.9 (C-16, vinílico), 146.5 (C-5, vinílico), 154.8 (C-17, vinílico), 196.7 (C-20, C=O), 202.4 (C=O de C-6). **¹H- RMN (CDCl₃) δ:** 0.89 (3H,s, H-18), 1.00 (3H,s, H-19), 2.24 (3H,s, H-21, -O=C-CH₃), 3.21 (1H,s, OH), 4.21 (1H,m, H-3), 6.18 (1H,s, H-4), 6.67 (1H,s, H-16). **EM-FAB m/z:** 329 [M+H]⁺. **Ver anexos:** Figuras E22 a E26.

4.1.4. *Compuestos (6 -10), obtenidos por esterificación de Steglich.*

Los siguientes compuestos fueron obtenidos por medio de la esterificación de Steglich, la cual consta del siguiente procedimiento:

En un matraz bola de 250 mL se disolvió 5 equivalentes del ácido carboxílico correspondiente en 35 mL de CHCl₃ y se agregó 3.145 g de DCC, esta mezcla se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos, luego se adicionó 1.86 g de DMAP y se dejó en agitación durante 2.5 horas, pasado este tiempo se adicionó 1 gramo del esteroide **5** (3.05 mmol) y se dejó en agitación durante 8 horas, tiempo en el cual se culminó la reacción.

Terminada la reacción, se adicionó 175 mL de hexano, se dejó precipitar la DCU en refrigeración y se filtró a gravedad. El filtrado se evaporó en rotavapor hasta unos 50mL se solución, luego la fase orgánica se lavó con una solución acuosa de HCl al 10% (3×50 mL), después con una solución saturada de bicarbonato de sodio (3×50 mL) y finalmente con agua destilada (3×50 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró en un rotavapor.

El producto obtenido se recrystalizó en 100 mL de solución MeOH:CHCl₃ 80:20 y luego se purificó mediante cromatografía en columna usando como fase móvil hexano-acetato de etilo (80:20) y se obtuvo un polvo blanco de todos los compuestos esterificados.

El análisis espectroscópico y rendimientos de los diferentes compuestos esterificados obtenidos se presentan a continuación.

4.1.4.1. Síntesis y caracterización de la 3β-piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6).

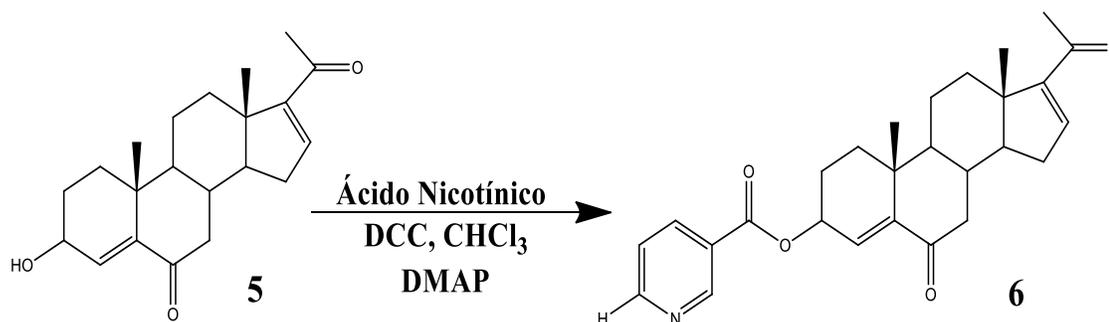


Figura 20. Reacción de esterificación de **5** a **6**.

A continuación se muestran las señales características del compuesto **6**.

FM: C₂₇H₃₁NO₄. **PM:** 433 uma. **Rendimiento:** 68 %. **PF:** 219-220 °C. **IR (KBr) cm⁻¹:** 3036, 2943, 1714, 1686, 1656. **UV (nm):** 228. **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 15.8 (C-

18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21, -O=C-CH₃), 70.4 (C-3 base de oxígeno), 123.2 (C-5'), 125.9 (C-1'), 128.4 (C-4, vinílico), 137.1 (C-6'), 143.7 (C-16 vinílico), 148.4 (C-5, vinílico), 151.0 (C-2'), 153.5 (C-4'), 154.8 (C-17 vinílico), 164.8 (C-7', C=O), 196.5 (C-20, C=O α,β -insaturado), 201.6 (C-6, C=O α,β -insaturado). **¹H- RMN (CDCl₃) δ :** 0.95 (3H,s, H-18), 1.12 (3H,s, H-19), 2.28 (3H,s, H-21, -O=C-CH₃), 5.62 (1H,m, H-3), 6.22 (1H,s, H-4), 6.71 (1H,d, J = 1.2 Hz, H-16), 7.40 (1H,s, H-Ar), 8.29 (1H,m, H-Ar), 8.78 (1H,d, J = 4 Hz, H-Ar), 9.24 (1H,s, H-Ar). **EM-FAB m/z :** 434 [M+H]⁺. **Ver anexos:** Figuras E27 a E31.

4.1.4.2. Síntesis y caracterización de la 3 β -(6-cloropiridil-3 carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7).

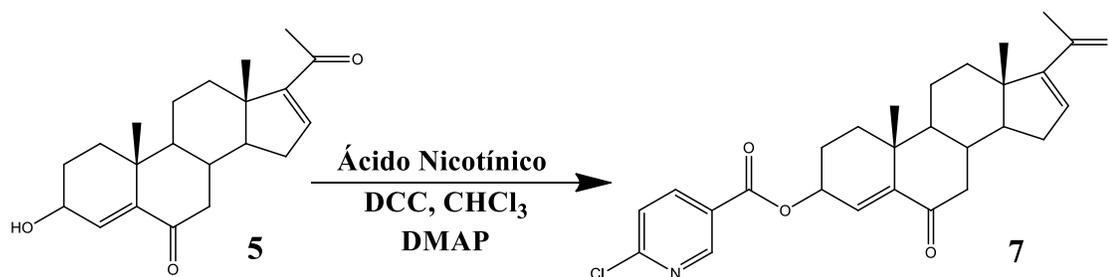


Figura 21. Reacción de esterificación de 5 a 7.

A continuación se muestran las señales características del compuesto 7.

FM: C₂₇H₃₀ClNO₄. **PM:** 467.5 uma. **Rendimiento:** 53 %. **PF:** 228-229 °C. **IR (KBr) cm⁻¹:** 3048, 2944, 1711, 1687, 1660. **UV (nm):** 233. **¹³C-RMN (CDCl₃) δ :** 15.8 (C-18), 19.5 (C-19), 27.1 (C-21, -O=C-CH₃), 70.8 (C-3 base de oxígeno), 124.1 (C-5'), 124.9 (C-1'), 128.1 (C-4, vinílico), 139.6 (C-6'), 143.7 (C-16, vinílico), 148.5 (C-5, vinílico), 151.3 (C-2'), 154.8 (C-4'), 155.8 (C-17, vinílico), 164.0 (C-7', C=O), 196.5 (C-20, C=O α,β -insaturado), 201.7 (C-6, C=O α,β -insaturado). **¹H- RMN (CDCl₃) δ :** 0.95 (3H,s, H-18), 1.11 (3H,s, H-19), 2.28 (3H,s, H-21, -O=C-CH₃), 5.61 (1H,m, H-3), 6.19 (1H,s, H-4), 6.71 (1H,d, J = 1.2 Hz, H-16), 7.43 (1H,s, H-Ar), 8.24 (1H,m, H-Ar), 9.00 (1H,s, H-Ar). **EM-FAB m/z :** 468 [M+H]⁺. **Ver anexos:** Figuras E32 a E36.

4.1.4.3. Síntesis y caracterización de la 3β-(6-bromo)piridil-3 carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8).

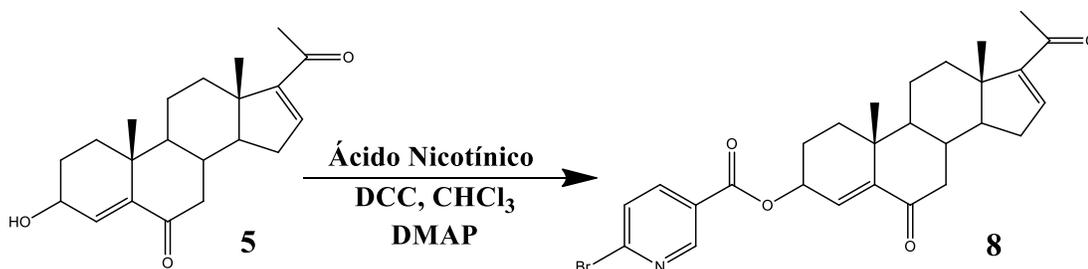


Figura 22. Reacción de esterificación de **5** a **8**.

A continuación se muestran las señales características del compuesto **8**.

FM: C₂₇H₃₀BrNO₄. **PM:** 511.9 uma. **Rendimiento:** 54 %. **PF:** 225-226 °C. **IR (KBr) cm⁻¹:** 3041, 2944, 1712, 1687, 1659. **UV (nm):** 236. **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 15.8 (C-18), 19.5 (C-19), 27.1 (C-21, -O=C-CH₃), 70.8 (C-3 base de oxígeno), 125.2 (C-1'), 128.0 (C-5'), 137.2 (C-6'), 139.2 (C-4, vinílico), 143.8 (C-16, vinílico), 147.0 (C-4'), 148.5 (C-5, vinílico), 151.5 (C-2'), 154.8 (C-17, vinílico), 164.2 (C-7', C=O), 196.5 (C-20, C=O α,β-insaturado), 201.7 (C-6, C=O α, β-insaturado). **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.94 (3H,s, H-18), 1.11 (3H,s, H-19), 2.28 (3H,s, H-21, -O=C-CH₃), 5.60 (1H,m, H-3), 6.19 (1H,s, H-4), 6.71 (1H,m, H-Ar), 7.58 (1H,m, H-Ar), 8.13 (1H,s, H-Ar), 8.97 (1H,s, H-Ar). **EM-FAB m/z:** 512 [M+H]⁺. **Ver anexos:** Figuras E37 a E41.

4.1.4.4. Síntesis y caracterización de la 3β-(6-metil)piridil-3 carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (9).

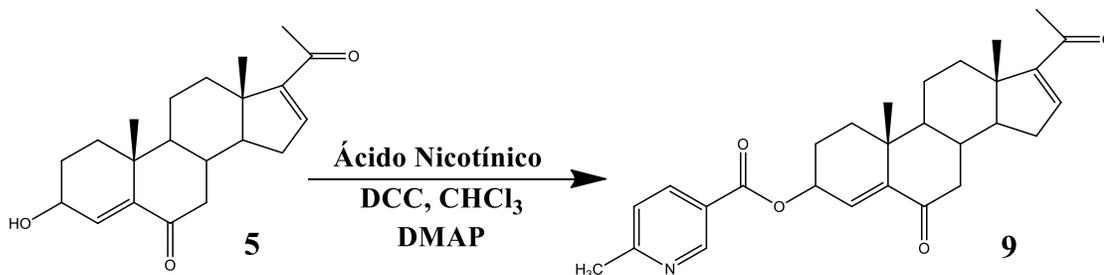


Figura 23. Reacción de esterificación de **5** a **9**.

A continuación se muestran las señales características del compuesto **9**.

FM: C₂₈H₃₃NO₄. **PM:** 447 uma. **Rendimiento:** 72 %. **PF:** 232-233 °C. **IR (KBr) cm⁻¹:** 3034, 2948, 1707, 1688, 1656. **UV (nm):** 231. **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 15.8 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21, -O=C-CH₃), 70.2 (C-3 base de oxígeno), 122.9 (C-5'), 128.7 (C-4, vinílico), 137.4 (C-6'), 143.8 (C-16, vinílico), 148.3 (C-5, vinílico), 150.6 (C-2'), 154.9 (C-17, vinílico), 163.3 (C-4'), 165.1 (C-7', C=O), 196.6 (C-20, C=O α,β-insaturado), 201.8 (C-6, C=O α,β-insaturado). **¹H- RMN (CDCl₃) δ:** 0.95 (3H,s, H-18), 1.11 (3H,s, H-19), 2.28 (3H,s, H-21, -O=C-CH₃), 2.63 (3H,s, H-8', R= CH₃), 5.60 (1H,m, H-3), 6.22 (1H,s, H-4), 6.71 (1H,d, J = 1.6 Hz, H-16), 7.25 (1H,d, J = 8 Hz, H-Ar), 8.17 (1H,m, H-Ar), 9.10 (1H,s, H-Ar). **EM-FAB m/z:** 448 [M+H]⁺. **Ver anexos:** Figuras E42 a E46.

4.1.4.5. Síntesis y caracterización de la 3β-(6-metoxi)piridil-3 carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**10**).

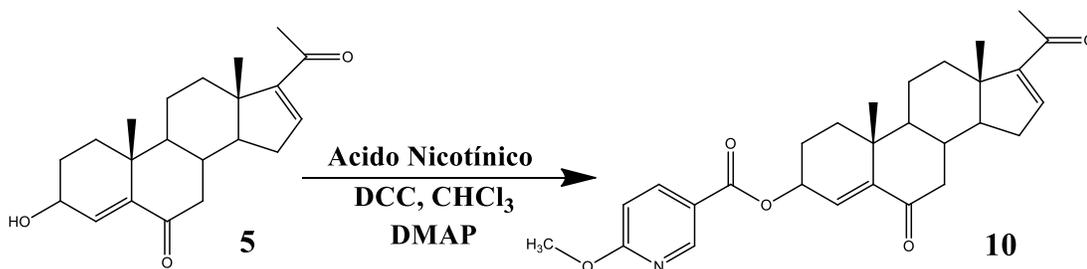


Figura 24. Reacción de esterificación de **5** a **10**.

A continuación se muestran las señales características del compuesto **10**.

FM: C₂₈H₃₃NO₅. **PM:** 463 uma. **Rendimiento:** 77 %. **PF:** 227-228 °C. **IR (KBr) cm⁻¹:** 3048, 2949, 1710, 1689, 1664. **UV (nm):** 242. **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 15.8 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21, -O=C-CH₃), 70.4 (C-3 base de oxígeno), 123.2 (C-5'), 125.9 (C-1'), 128.4 (C-4, vinílico), 137.1 (C-6'), 143.7 (C-16, vinílico), 148.4 (C-5, vinílico), 151.0 (C-2'), 153.5 (C-4'), 154.8 (C-17, vinílico), 164.8 (C-7', C=O), 196.5 (C-20 C=O α,β-insaturado), 201.6 (C-6 C=O α,β-insaturado). **¹H- RMN (CDCl₃) δ:**

0.95 (3H,s, H-18), 1.11 (3H,s, H-19), 2.28 (3H,s, H-21), 4.00 (3H,s, H-8' R= CH₃O), 5.57 (1H,m, H-3), 6.21 (1H,s, H-4 vinílico), 6.75 (1H,s, H-16), 6.77 (1H,d, J = 8 Hz, H-Ar), 8.14 (1H,d, J = 8Hz, H-Ar), 8.84 (1H,s, H-Ar). **EM-FAB m/z:** 464 [M+H]⁺.
Ver anexos: Figuras E47 a E51.

4.1.5. Compuesto *3β-benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona*.

Para una comparación de los resultados de esterificación con ácido nicotínico, se sintetizó y analizó el éster derivado con ácido benzoico, el cual ha sido previamente reportado.³¹

4.1.5.1. Síntesis y caracterización de la *3β-benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona* (**11**).

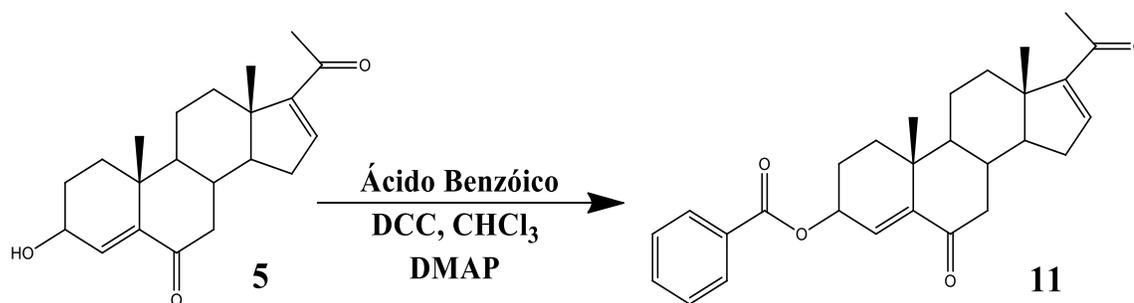


Figura 25 Reacción de esterificación de **5** a **11**.

A continuación se muestran las señales características del compuesto **11**.

FM: C₂₈H₃₂O₄. **PM:** 432.55 uma. **Rendimiento:** 76 %. **PF:** 222-223 °C. **IR (KBr) cm⁻¹:** 3070, 2944, 1719, 1687, 1665. **UV (nm):** 233. **¹³C-RMN (CDCl₃) δ:** 15.8 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21, -O=C-CH₃), 69.8 (C-3, base de oxígeno), 128.3 (C-3' y 5' Ar), 129.1 (C-4, vinílico), 129.7 (C-2' y 6' Ar), 130.0 (C-1' Ar), 133.0 (C-4' Ar), 143.8 (C-17, vinílico), 147.1 (C-5, vinílico), 154.9 (C-16, vinílico), 166.1 (C-7', C=O), 196.5 (C-20, C=O α,β-insaturado), 201.8 (C-6, C=O α, β-insaturado). **¹H-RMN (CDCl₃) δ:** 0.94 (3H,s, H-18), 1.11 (3H,s, H-19), 2.28 (3H,s, H-21, -O=C-



CH₃), 5.59 (1H,m, H-3), 6.23 (1H,s, H-4), 6.70 (1H,m, H-16), 7.44 (1H,m, H-Ar), 7.56 (1H,m, H-Ar), 8.06 (2H,m, H-Ar). **EM-FAB m/z:** 433 [M+H]⁺. **Ver anexos:** Figuras E52 a E56.

4.2. Metodología biológica.

4.2.1. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.

Para analizar la citotoxicidad de los compuestos **1** al **11**, Se utilizaron 3 líneas celulares cancerosas humanas (próstata, de mama (MCF-7) y mama (MDA-MB231)) que fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI).

Procedimiento del bioensayo empleando sulforodamina B (SRB): Los efectos citotóxicos se determinaron mediante un protocolo basado en SRB.^{32, 33}

Las líneas celulares utilizadas, fueron adaptadas al medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino (10 %), una mezcla de antibióticos-antimicóticos al 10 % y 2 mM de glutamina. A estas líneas se les caracterizó el tiempo de duplicación y con ello se estableció la densidad de inóculo que se depositó en cada micropozo, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Densidad de inóculo que se deposita en cada micropozo.

Línea celular	Órgano de origen	Tiempo duplicación (h)	Células/pozo	Concentración TCA (%)
PC-3	próstata	28.7	7.500	50
MCF-7	mama	25.6	5.000	50
MDA-MB231	mama	29.0	10.000	50

(TCA: ácido tricloroacético).

Las líneas celulares se adhirieron a las botellas de cultivo y para cosecharlas se



adicionó 1 mL de 0.05 % de tripsina-EDTA. Enseguida que las células se desprendieron del sustrato plástico, se les adicionó de 5-10 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión se depositaron en tubos cónicos y centrifugaron por 3 min, ya formado el paquete celular se le agregó medio de cultivo para resuspender dichas células. De la suspensión se tomó 0.05 mL del inóculo y se resuspendió en 0.45 mL de azul de tripano (colorante que permite contar a las células vivas). Determinando el número de células por mL, se realizaron los ajustes necesarios para depositar el inóculo en un volumen de 100 μL /pozo a la densidad ya antes mencionada. Cada placa se inoculó con dos líneas celulares por triplicado y se preincubó por 24 h a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO_2 y 100 % de humedad relativa, para favorecer la estabilidad de éstos antes de adicionar las sustancias a probar. Para un cernimiento primario de un compuesto puro se probó la concentración más alta permitida 50 μM . Todas las muestras fueron solubilizadas en dimetil sulfoxido (DMSO) 100 veces más concentradas que la concentración a probada. Inmediatamente después de la preparación de las muestras en solución se agregó 100 μL , siendo el volumen final del pozo de 200 μL .

Nuevamente la microplaca se incubó por 48 h bajo las condiciones antes mencionadas. Al finalizar el periodo de incubación de los compuestos con las células, fueron precipitadas (o fijadas) *in situ* añadiendo 50 μL de una solución de ácido tricloro acético (TCA) frío al 50 % e incubadas a 4°C por 60 min. Se desechó el sobrenadante y las placas se lavaron 5 veces con agua desionizada y se secaron al ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo se realizó con 100 μL de una solución al 0.4 % de Sulforodamina B (SRB) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. La SRB no unida se removió con 3 lavados de ácido acético al 1 % y se dejó secar al ambiente. Las placas teñidas se les agregó 100 μL de un buffer de *tris* (tris(hidroximetil) aminometano) y se agitaron por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo; a continuación se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm. Los datos se procesaron obteniendo el promedio de la DO de los 3 pozos/línea tratados con el compuesto (DOt), los 3 pozos tratados con DMSO (DOc) y 2 pozos de testigos, es decir aquellos

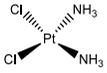
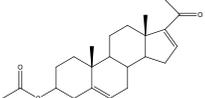
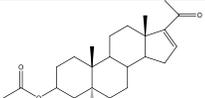
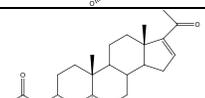
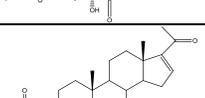
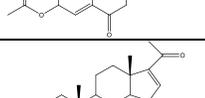
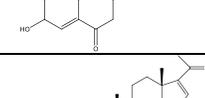
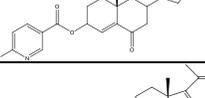
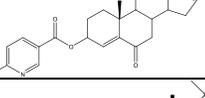
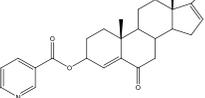
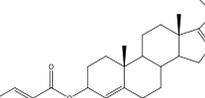
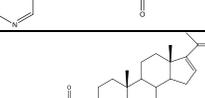


que no tiene células pero si compuesto (DOb). Así el porcentaje de inhibición del crecimiento (% IPC) se calculó con la siguiente expresión:

$$\%IPC = 100 - (DOt - DOb / DOc - DOb) * 100$$

Los resultados del análisis citotóxico se muestran en la Tabla 4, en donde: **PC-3**=próstata, **MCF-7**= Cáncer de mama mama RE+/RP+, **MDA-MB231**= cáncer de mama RE-/RP-, **NC** = No citotóxico a la concentración de análisis.

**Tabla 4.** Análisis de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.

Compuesto	Molécula	CLogP ^a	% de inhibición del crecimiento en línea celular		
			PC-3	MCF-7	MDA-MB231
Cisplatino		-	86.7±4.1	77.93±2.5	97.5±3.70
1		3,32	37.6±1.1	51.3±4.9	59.6±2.20
2		2,30	30.9±3.5	39.3±6.8	50.4±3.70
3		1,50	25.3±1.4	50.6±5.6	14.7±0.40
4		2,19	55.2±5.3	57.0±5.9	92.3±4.20
5		1,96	68.8±3.3	83.8±6.0	96.7±3.20
6		2,75	57.6±2.3	64.7±2.7	90.8±3.90
7		3,65	6.1±1.5	NC	19.0±0.10
8		3,99	NC	NC	29.7±0.10
9		3,46	NC	NC	8.2±2.60
10		3,34	25.8±2.1	9.4±0.3	6.8±0.06
11		4,09	41.4±4.2	58.7±2.3	29.5±5.70

*Concentración de cada compuesto a 50 µM en DMSO.

* NC: No citotóxico a la concentración de análisis.

a CLogP: LogP calculado usando ChemDraw Ultra V.12.0 (CambridgeSoft Corporation).



CAPÍTULO 5.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

5.1. *Análisis de resultados químicos.*

En la ruta de síntesis planteada, se empleó como materia prima la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (**1**), debido a que es un compuesto comercialmente disponible de costo accesible y es considerado como un compuesto de partida en la síntesis de diversos fármacos esteroidales.

Como primer paso en esta ruta de síntesis se caracterizó la materia prima (**1**) tanto física como espectroscópicamente correlacionando los resultados con los datos de la literatura. Así, el valor de 1660 cm⁻¹ en el espectro IR mostró la presencia del grupo carbonilo α,β -insaturado en la posición C-20, el cual también es confirmado por el valor de 237 nm en espectroscopía de UV. Además, también se encontró en el espectro IR las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos alrededor de 2942 cm⁻¹ y la correspondiente a carbonilo de éster en 1728 cm⁻¹. En RMN de ¹³C se detectaron los desplazamientos correspondientes a carbonos olefínicos, en 140.3 ppm (C-5) y 121.9 ppm (C-6), así como las señales de los carbonilos de la cetona α,β -insaturada en 196.8 ppm y 170.5 ppm para la función éster. En RMN de ¹H se detectaron señales simples a 0.9 ppm, 1.1 ppm y 2.3 ppm correspondientes a los metilos de los H-18, H-19 y H-21 respectivamente, así como unas señales dobles (J=4.0 Hz) en 5.4 ppm correspondiente al acoplamiento vecinal del protón en C-6. En espectrometría de masas (EM-FAB) se comprobó la masa molecular del compuesto con el pico (Íon pseudomolecular) de 357 *m/z* [M+H]⁺ y con la pérdida de 60 unidades de masa del ión molecular se prueba nuevamente la presencia del acetato.

Siguiendo la ruta de síntesis se realizó una primera reacción de epoxidación para obtener el 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (**2**); se corroboró la obtención de



este compuesto por las siguientes señales: en IR se observó una señal a 1237 cm^{-1} referente al estiramiento C-O-C entre los carbonos 5 y 6 del esqueleto carbonado. En esta reacción se formaron dos isómeros (α y β), por lo que en el espectro de resonancia se pueden observar picos dobleteados debido a la presencia del isómero beta (β) que se encuentra en menor proporción debido a que por su configuración es menos favorecida su formación. Para el isómero alfa (α) en RMN de ^{13}C las señales de los carbonos C-5 y C-6 aparecieron a 65.34 ppm y 63.27 ppm respectivamente y en RMN de ^1H la señal del H-6 se observó a 2.9 ppm un doblete con una $J = 4.0\text{ Hz}$, además se encontró la señal del H-3 a 4.9 ppm.³¹ Por otro lado, los picos mas representativos del isómero β , presentaron un desplazamiento en RMN de ^{13}C para los carbonos C-5 y C-6 a 65.16 ppm y 63.20 ppm respectivamente y en RMN de ^1H la señal del H-3 apareció a 4.77 ppm. Debido a la intensidad de los picos en los espectros de resonancia magnética nuclear se puede concluir que el isómero que se encuentra en mayor proporción es el isómero alfa. En espectrometría de masas (EM-FAB) se comprobó la masa molecular del compuesto con el pico de 373 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ que corresponde al ión pseudomolecular que es el ión molecular más un protón (1 uma).

Para la obtención del compuesto **3** se realizó una oxidación del compuesto **2** para formar un alcohol terciario y una cetona en los carbonos C-5 y C-6 respectivamente, lográndose así la formación de 3β -acetoxi- 5α -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (**3**). Para corroborar la formación de estos dos grupos funcionales, en el espectro IR se observó una señal en 3356 cm^{-1} evidenciando la presencia de un grupo $-\text{OH}$ en la molécula y una señal a 1700 cm^{-1} para el carbonilo de la cetona en C-6. En RMN ^{13}C se observó la señal del C-5 en 80.2 ppm base hidroxilo y la del C-6 en 212.1 ppm típica de grupo carbonilo de cetona.³¹ En RMN ^1H se observa la desaparición de la señal correspondiente al proton en C-6 a 2.92 ppm base epóxido. Para corroborar la presencia del grupo hidroxilo en C-5, se realizó una RMN de ^1H en presencia de agua deuterada (D_2O), en el cual se observó que el pico de 3.69 ppm el cual se atribuyó a el hidrógeno del hidroxilo se vio disminuido debido al intercambio de éste hidrógeno con el deuterio. Por lo que se puede decir que esta señal corresponde a este



hidrogeno (Ver anexo E15). En espectrometría de masas se confirmó la obtención de la molécula deseada con el pico m/z 389 $[M+H]^+$.

Para la formación del compuesto **4**, se realiza una eliminación del $-OH$ en C-5 del compuesto **3** para formar la estructura de la 3β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**4**). Lo que confirmó la formación de este compuesto, es que ya no aparece la señal del $-OH$ a 3300 cm^{-1} y aparece una señal en 1679 cm^{-1} correspondiente a un grupo carbonilo α,β -insaturado de la cetona formada en C-6.³¹ Ahora la banda del espectro de UV a 236 nm corresponde ahora a las dos cetonas $\alpha\text{-}\beta$ insaturadas ubicadas en el C-6 y C-20. En RMN ^{13}C se observaron los cambios en el C-4 y C-5 (35.5 ppm y 80.2 ppm) los cuales se desplazan de campos altos a campos bajos de 129.0 ppm y 147.9 ppm respectivamente debido a la formación de la doble ligadura. Además se puede observar que aparece una señal a 6.10 ppm correspondiente a un hidrógeno en C-4 de doble ligadura, que no aparece en el espectro del compuesto **3**. El pico de m/z 371 $[M+H]^+$ en espectrometría de masas es indicativo de la masa molecular mas un protoón de dicho compuesto.

Finalmente, para la obtención del compuesto intermediario con grupo $-OH$ en C-3, se realizó una hidrólisis del compuesto **4**, obteniéndose el compuesto 3β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**5**), con una señal de 3421 cm^{-1} en el espectro de IR correspondiente al grupo $-OH$ en la posición C-3. Esto también fue evidenciado, en el espectro de RMN de ^{13}C ya que no se encontró la señal de 170.7 ppm del grupo carbonilo del acetato.³¹ En la RMN ^1H se observó que la señal de H-3 se desplazó a campo mas alto de 5.33 ppm a 4.21 ppm debido a que cambia el ambiente químico de una base acetoxi a una base hidroxil, por otra parte la señal que corresponde al grupo metilo del acetoxi (C-23) que antes aparecía a 2.07 ppm , no se observa en el espectro del compuesto **5**. En el espectro de masas se encuentra la señal de m/z 329 $[M+H]^+$ y la de m/z 311 que es el ión pseudomolecular menos 18 unidades ($[M+H]^+-18$) debida a la pérdida de agua por la presencia del grupo alcohol.

Una vez obtenidos los intermediarios, se procedió con la síntesis de los compuestos **6**,



7, 8, 9 y 10, productos de esterificación con derivados del ácido nicotínico que presentan sustituyentes en la posición 4' y el compuesto **11** que es un derivado de ácido benzoico que en trabajos anteriores mostro actividad biológica.³¹ La obtención de estos productos se confirman mediante la formación de un carbonilo de éster. En espectroscopía de IR se observaron valores entre 1714-1719 cm^{-1} característicos de esta función química. Además, el espectro de RMN ^{13}C mostró un desplazamiento característico de carbonilo de éster entre 164-166 ppm y en RMN ^1H se observaron señales de protones aromáticos alrededor de 6 a 8.5 ppm característicos para este tipo de compuestos. En espectrometría de masas se identificó el ión pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ correspondiente a cada compuesto y el pico de m/z 311 correspondiente al rompimiento del enlace éster con el esteroide.

5.2 Análisis de resultados biológicos.

En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* de los compuestos **1-11** sobre la inhibición de la proliferación de 3 líneas celulares cancerosas humanas: próstata (PC-3), mama (MCF-7) RE+/RP+ y mama (MDA-MB231) RE-/RP-. En esta figura se puede observar que solo los compuesto **4, 5 y 6**, mostraron disminuir la proliferación de las 3 líneas celulares por arriba del 50 % de inhibición a la concentración de 50 μM .

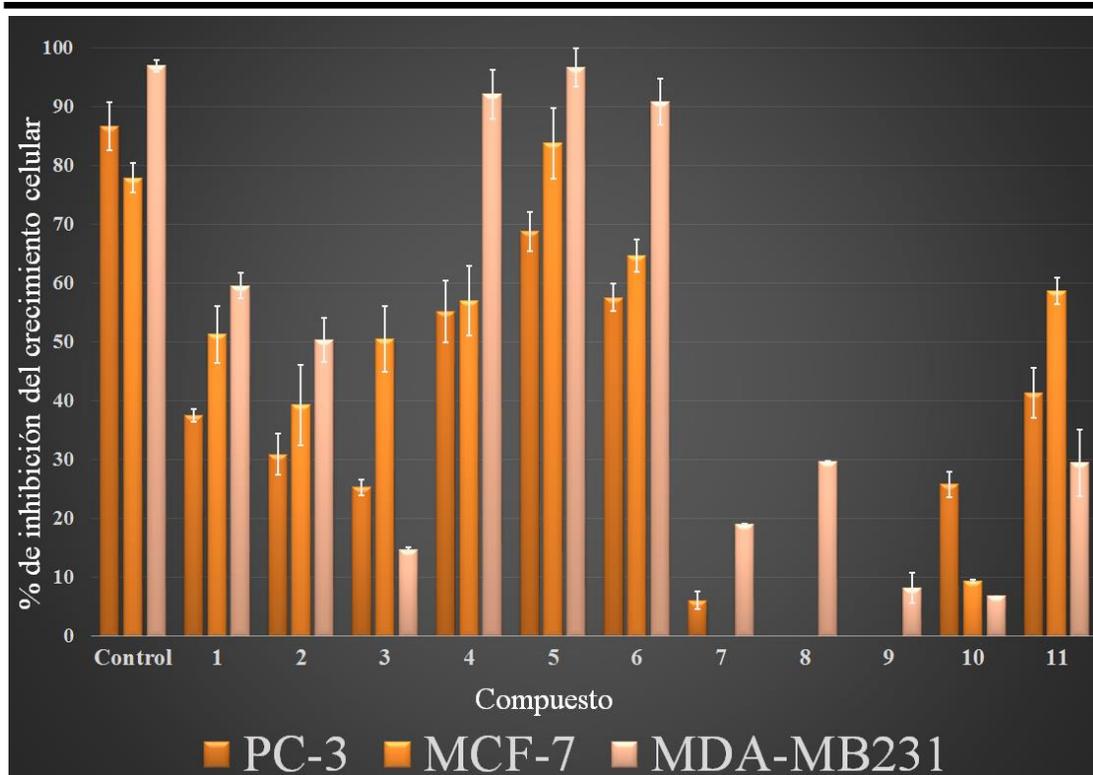


Figura 26. Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.

Aunque los compuestos **4**, **5** y **6**, inhibieron la proliferación celular de las 3 líneas empleadas, estos muestran una clara preferencia por las líneas celulares de cáncer de mama. Este hecho se puede confirmar, debido a que los valores de % de inhibición de proliferación celular (% IPC) son mayores para MCF-7 y MDA-MB231, que para PC-3 (cáncer de próstata).

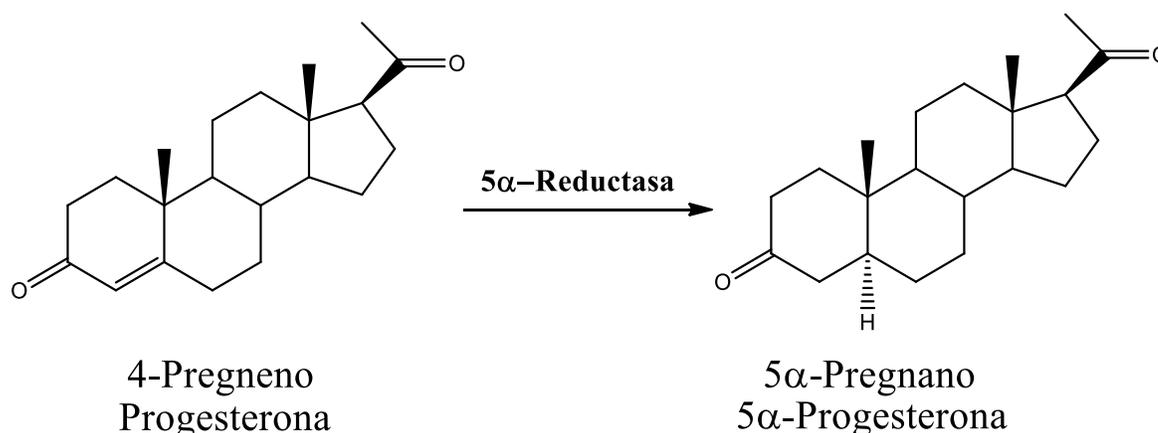
Como ya se mencionó anteriormente las diferencias existentes entre la línea celular MCF-7 y MDA-MB231, es que la primera responde a estímulos sobre receptor de progesterona y estrógenos, mientras que en la segunda, su proliferación se ve regulada vía otros mecanismos (Tabla 5).

Tabla 5. Tabla comparativa entre las líneas celulares de cáncer de mama.

Línea Celular	Tumor primario	Origen celular	Receptor de Estrógeno (RE)	Receptor Progesterona (RP)
MCF-7	Carcinoma invasivo	Efusión pleural	SI	SI
MDA-MB231	Carcinoma invasivo	Efusión pleural	NO	NO

En base a los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* podemos destacar que los compuestos sintetizados **4**, **5** y **6**, muestran una gran selectividad a disminuir el crecimiento celular en la línea cancerígena MDA-MB231, en comparación con la MCF-7.

De acuerdo a lo descrito por Wiebe y Lewis, la línea celular MDA-MB231 al igual que la MCF-7 son capaces de convertir los 4-pregnenos a 5 α -pregnanos por la acción de la enzima 5 α -reductasa (Figura 27); sin embargo la línea MDA-MB231 la expresa en mayor cantidad.³⁴ Es bien sabido que la enzima 5 α -reductasa se encuentra asociada al desarrollo del cáncer de mama,³⁵ esta enzima está constituida por 3 isoenzimas, pero la que se relaciona directamente al desarrollo y progresión del cáncer es la isoforma tipo 1. Wiebe y Lewis demostraron que la 5 α -reductasa tipo 1 se encuentra expresada en MDA-MB231.

**Figura 27.** Conversión de 4-pregneno a 5 α -pregneno por la acción de la enzima 5 α -reductasa.



Por otro lado en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que el derivado 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**4**) inhibe la enzima 5 α -reductasa.³⁶ Con base en estas observaciones podemos deducir que la actividad antiproliferativa mostrada por los derivados **4**, **5** y **6** sobre la línea celular MDA-MB231, esta puede estar regulada vía la inhibición de la enzima 5 α -reductasa.

De los derivados **4-6**, el que mostró la mayor actividad antiproliferativa fue el compuesto **5**, el cual tiene un grupo hidroxilo en C-3. Este compuesto mostró disminuir el crecimiento celular del 96.7 % \pm 3.2 a una concentración de 50 μ M. Aunque este compuesto mostró una alta actividad inhibitoria, muy probablemente cuando se realicen los estudios *in vivo* este efecto se vea disminuido debido al metabolismo que se le atribuye a las hormonas esteroidales. Este metabolismo, involucra reacciones que normalmente sufre el esqueleto esteroideal para poder ser excretado, las cuales son de glucoronidación o sulfatación, con la finalidad de hacer a la molécula más hidrosoluble y poder ser eliminada por la orina.³⁷

El empleo de los profármacos es una estrategia ampliamente utilizada para evitar reacciones propias del metabolismo; estas modificaciones ayudan a aumentar el tiempo de vida media de una molécula en el cuerpo humano.³⁸ En este proyecto se decidió emplear esta estrategia y se sintetizaron diversos ésteres en C-3.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los ésteres que mostraron un mayor inhibición de la proliferación celular fueron los compuestos **4** y **6** (92.15 \pm 4.2 y 90.8 \pm 3.9 respectivamente). Como podemos observar, no existe una diferencia significativa en cuanto a la inhibición del crecimiento celular. Sin embargo, cuando se compara la actividad del benzoato (**11**, 29.5 % \pm 5.7) con la del ester del ácido nicotínico (**6**, 90.8 % \pm 3.9), la actividad de este último es mayor, debido a que el nitrógeno puede formar enlaces de hidrógeno con los sitios activos de los blancos terapéuticos.³⁸

En cuanto a la serie de derivados de ácido nicotínico (**6-10**), el único derivado que mostro un % IPC en comparación con el cisplatino, fue el derivado **6**. Además, se



puede notar que la inserción de grupos electro-atractores o electro-donadores en la posición 4' del anillo aromático, no mejora la inhibición de crecimiento de células cancerosas, por lo que se puede pensar que esta actividad no se ve influenciada por efectos electrónicos en el anillo aromático.

La baja actividad inhibitoria del crecimiento celular mostrada por los compuestos **7-10**, puede atribuirse a su baja solubilidad. El LogP es un parámetro que mide la afinidad relativa de una sustancia por los lípidos versus agua; cuanto mayor es el valor del coeficiente de partición de una sustancia, es más liposoluble.³⁹

Al realizar un análisis de la actividad biológica con respecto al coeficiente de partición calculado (CLogP) Figura 28, se muestra la relación que existe entre $-\log(1/\%IPC)$ en MDA-MB231 y el CLogP.⁴⁰ En esta figura se logra evidenciar que a un LogP de 2.75 se tiene la mayor actividad antiproliferativa para la línea celular MDA-MB231. Conforme el LogP aumenta, esta actividad se ve disminuida, por lo que si se deseara diseñar prototipos moleculares de ácido nicotínico con mayor actividad anticancerígena, su LogP debería ser menor o igual a 2.75.

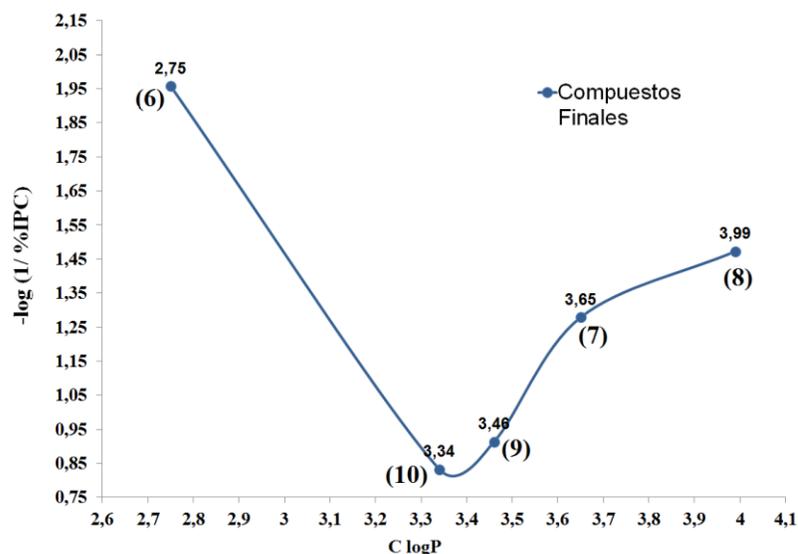


Figura 28. $-\log(1/\%IPC)$ en MDA-MB231 Vs CLogP.

Curiosamente, los compuestos **4** (acetoxi en C-3) y **5** (hidroxilo en C-3) tienen un valor de CLogP de 2.19 y 1.96 respectivamente; estos valores son menores a 2.75 por



lo que se comprueba lo mencionado anteriormente, dado que sus valores de inhibición de la proliferación de la línea celular MDA-MB231 son $92.3 \% \pm 4.20$ y $96.7 \% \pm 3.20$ respectivamente.

Con base a los diferentes estudios realizados por diversos grupos de investigación, se recomienda que el fármaco sea tan hidrofílico como sea posible mientras retenga la suficiente afinidad por las proteínas diana. Por tanto, el coeficiente de distribución ideal para un fármaco es habitualmente intermedio (ni demasiado hidrofóbico ni demasiado hidrofílico).⁴¹ Aparentemente, para la inhibición de la proliferación celular de la línea MDA-MB231 es necesario que los derivados esteroidales propuestos tengan un carácter medianamente hidrofílico.



CONCLUSIONES

- Se sintetizaron 4 compuestos intermediarios partiendo de la materia prima 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona: 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (**2**), 3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (**3**), 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**4**) y 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**5**).
- Se sintetizaron 5 compuestos esteroidales derivados de la 16-dehidropregnenolona con una función éster en C-3, un carbonilo α,β no saturado en C-6.
- De los compuestos sintetizados, los derivados **4**, **5** y **6** mostraron disminuir selectivamente la proliferación de la línea celular MDA-MB231, con valores de 92.15 % \pm 4.2, 96.7 % \pm 3.2 y 90.8 % \pm 3.9 respectivamente. Estos derivados podrían ser objeto de futuros estudios *in vitro* para poder confirmar si están inhibiendo a la enzima 5 α -reductasa y poder proponer un posible mecanismo de acción.
- El compuesto nuevo 3 β -piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6**), es un candidato ideal para inhibir selectivamente la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231 ya que presenta un 90.8 % \pm 3.9 de actividad anticancerígena, por lo que se realizaran estudios *in vivo* con este compuesto.
- Como resultado de este trabajo, se encontró que la presencia de sustituyentes electrodonadores o electroattractores en posición 4' de los derivados de ácido nicotínico (**7-10**) no mejora la actividad biológica en ninguna de las líneas celulares estudiadas, por lo que se puede concluir que el efecto biológico de estas moléculas no depende de efectos electrónicos en esta posición.
- La presencia de un nitrógeno en la posición 3' de los ésteres aromáticos del pregnano incrementan el porcentaje de inhibición de la proliferación celular en la



línea de cáncer de mama MDA-MB231.

- Según el estudio realizado, para plantear un diseño de prototipos moleculares con el sistema esteroidal propuesto en este trabajo y que inhiban líneas celulares de cáncer de mama, se debe considerar que cuente con valores de CLogP menores o iguales a 2.75.
- La realización de este trabajo de investigación aportó información importante sobre la actividad citotóxica de derivados del pregnano con sustituyentes de ácido nicotínico en C-3. Estos resultados permitirán desarrollar moléculas con mayor potencial terapéutico.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Organización Mundial de la Salud [OMS]. **2014**. Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Recuperado el 5 de febrero de 2014, de:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
2. Union for International Cancer Control [UICC]. **2014**. World Cancer Day 2014. Recuperado el 9 de enero de 2014, de: <http://www.worldcancerday.org/>
3. Siegel, R., Jemal, A. Cancer Statistics 2014. CA Cancer Journal for Clinicians. American Cancer Society, Inc. Publicado en línea en: www.cacancerjournal.com. Doi: 10.3322/caac.21208. **2014**, 64, pp 9–29.
4. Trejo, S, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropon, A., Osorio Rico, L., Sánchez-Torres, L., García-Mora, I., Márquez-Rosado, L., Sánchez, A., Moreno-García M. A., Bravo-Gómez, M. E., Ruiz-Ramírez, L., Rodríguez-Enríquez, S., Sotelo, J. Cas ligly induces apoptosis in glioma C6 cells In Vitro and In Vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia*. **2005**, 7 (6), pp 563-574.
5. Cristina, C. Cáncer: Herencia y Ambiente. Segunda edición (La Ciencia para Todos), [En línea]. **1997**. ISBN 968-16-5403-X. Impreso en México.
6. De Vita, V.T., Hellman, S., Rossenberg, S.A. CANCER Principios y Práctica de Oncología Vol 1 , 5 ed., Ed. Panamericana; Madrid, **1999**. pp 3-99.
7. Cotran, R.S., Khmer, V., Robbins, S.L. Patología Estructural y Funcional. 5 ed., Ed. Interamericana/Mc Graw-Hill. Madrid, **1995**. pp 290.
8. Chandrasoma, A., Taylor, P. C.R. Patología General. Ed. El manual Moderno, México D.F., **1994**. pp 281-296.
9. Globalcan: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer (IARC). Recuperado el 6 de febrero de **2014**, de: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
10. Instituto Nacional del Cáncer de los institutos de la salud de los Estados Unidos. Folleto del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) 2014. Recuperado el 7 de febrero de **2014**, de: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/necesita->



saber/prostata

11. Heemers, H., Tindall, DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine Reviews*. **2007**, 28, pp 778-808.
12. Taplin. M., Ho S. The endocrinology of prostate cancer. Clinical review 134. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **2001**, 86, pp 3467-3477.
13. Hsieh, CL., Cai C., Giwa, A., et al. Expression of a hyperactive androgen receptor leads to androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology*. **2008**, 41, pp 13-23.
14. So, A., Hurtado-Col, A., Gleave, M. Androgens and prostate cancer. *World Journal of Urology*. **2003**, 21, pp 325-337.
15. Heinlein, C., Chang, C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrine Reviews*. **2002**, 23, pp 175-200.
16. Matsumoto, T., Takeyama, K., Sato, T., Kato, S. Study of androgen receptor functions by genetic models. *The Journal of Biochemistry*. **2005**, 138, pp 105-110.
17. Luke, M., Coffey, D. The male sex accessory tissues. Structure, androgen action, and physiology. In *The physiology of reproduction*. Vol. 1 Edited by Knobil E, Neill JD. Raven Press, New York. **1994**, pp 1435-1487.
18. Bellido, M. Reproducción en el varón. In *Fisiología Humana*. Edited by Tresguerres JAF. Madrid, España: McGRAW-Hill-Interamericana; **1999**, pp 1033-1047.
19. Keshtgar, M., Davidson, T., Pigott, K., Falzon, M., Jones, A. Current status and advances in management of early breast cancer. *International Journal of Surgery*. **2010**, 8, pp 199-202.
20. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *American Family Physician*. **2010**, 81, pp 1339-46.
21. Veerappan, J., Sundaravel, Vivek, K., Raju, R. Synthesis of novel 16-spiro steroids: 7-(Aryl)tetrahydro-1H-pyrrolo [1,2-c][1,3]thiazolo estrone hybrid heterocycles. *Steroids*. **2014**. 82, pp 29-37



22. Christopher, N, F. Publicado en línea en: http://kidshealth.org/parent/en_espanol/medicos/steroid_treatment_esp.html#. The Nemours Foundation. **2012**.
23. Gamal, A., Elmegeed, K.B., Khalil, M., Mohareb, H., Mervat, M., Abd-Elhalim, Ghada, E. Cytotoxicity and gene expression profiles of novel synthesized steroid derivatives as chemotherapeutic anti-breast cancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2011**. 19, 22, pp 6860-6872.
24. Raja, V., Solomon, H, Lee. Anti-breast cancer activity of heteroaryl chalcone derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2012**, 66, 3, pp 213-220.
25. Kandeel, M., Kamal, A., Eman, K.A., Abdelall, Heba, A.H. Elshemy. Synthesis of novel chromene derivatives of expected antitumor activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2013**, 59, pp 183-193
26. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drugs screen using a diverse panel of cultured human tumor cell *Journal of the National Cancer Institute*. **1991**. 83, 11, pp 757- 767.
27. Skehan, P. Storeng, R. Scudiero, D. et. al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the national cancer institute*. **1990**. 82, 13, pp 1107-1112.
28. Monga, M., Sausville, E. Developmental therapeutics program the NCI: molecular target and drug discovery process. *Leukemia*. **2000**. 16, pp 520-526.
29. Hoffer, A. Vitamin B-3 (Niacin) Update. *New Roles For a Key Nutrient in Diabetes, Cancer, Heart Disease and Other Major Health Problems*. Keats Pub, Inc., New Canaan, CT, **1990**.
30. Gerson M. Dietary considerations in malignant neoplastic disease. A preliminary report. *The Review of Gastroenterology*. **1945**, 12, pp 419-425.
31. Pérez, V., Cabeza, M., Bratoeff, E., Heuze, I., Sánchez, M., Ramírez, E., Naranjo, E. New 5α -reductasa inhibitors: In vitro and in vivo effects, *Steroids*. **2005**. 70, pp. 217-224.
32. Solomon VR, Hu C, Lee H. Design and synthesis of chloroquine analogs with



- anti-breast cancer property. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, 45, pp 3916–23.
33. Solomon, VR., Hu, C., Lee, H. Design and synthesis of anti-breast cancer agents from 4-piperazinylquinoline: a hybrid pharmacophore approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2010**, 18, pp 1563–72.
 34. John, P. W., Michael, J. L. Activity and expression of progesterone metabolizing 5α -reductase, 20α -hydroxysteroid oxidoreductase and $3\alpha(\beta)$ -hydroxysteroid oxidoreductases in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF-10A) human breast cancer cells. *BioMed Central Cancer (BMC)*. **2003**, 3.
 35. Wiebe, J. P., Muzia, D., Hu J., Szwajcer, D, Hill SA., Seachrist, J. L. The 4-pregnene and 5α -pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion *Cancer Research*. **2000**, 60, pp 936-943.
 36. Perez, V., Cabeza, M., Bratoeff, E., A. Heuze I, Sánchez, M., Ramírez, E., Naranjo, E. New 5α -reductase inhibitors: In vitro and in vivo effects. *Steroids*. **2005**, 70, pp 217–224.
 37. Harper, H.A., Rodwell. V. W., Mayes, P. A. Review of physiological chemistry. *Lange medical publicaaations*. 17th ed. Losaltos California, **1979**. pp 536-547.
 38. Richard, B. Silverman. The organic chemistry of drug design and drug action. *Accademic press*. San Diego, California, **1992**. pp 287, 252- 266.
 39. Gennaro, A.R. Remington FARMACIA. Médica Panamericana. Buenos Aires. Tomo 1. 19 ed, Ed. **1999**. pp 1046-1050.
 40. Denis, A.S. et al. Pharmacokinetics and metabolism in drug design in *Methods and principles in medicinal chemistry*, Wiley-VCH, Germany, **2001**, 13, 2.
 41. Pliska, V., Testa, B. Lipophilicity in Drug Action and Toxicology. John Wiley & Sons Ltd. ISBN 978-3527293834. New York. **1996**, 4, pp 240-249.



ANEXOS

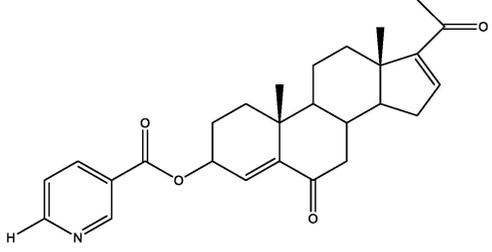
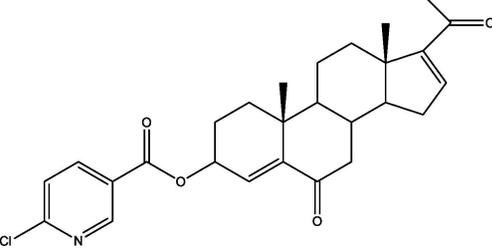
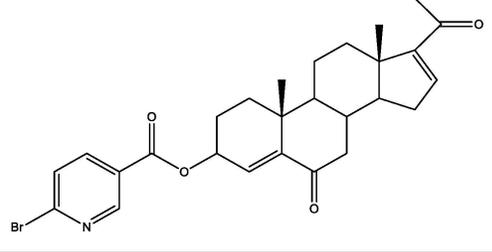
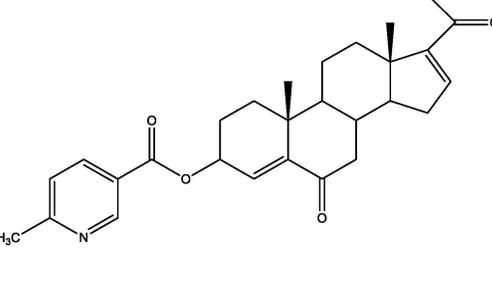
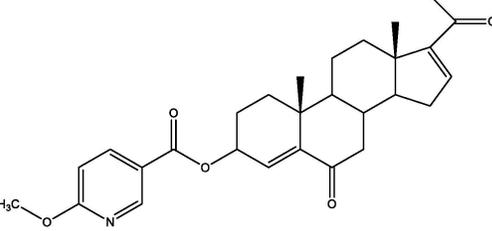
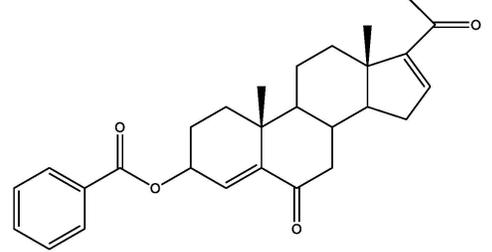


ANEXO 1

Tabla 6. Resumen de compuestos sintetizados.

N°	Molécula	FORMULA Y PM	P. F. °C	% R
1		FM: C ₂₃ H ₃₂ O ₃ PM: 356 g/mol	174 – 175	-
2		FM: C ₂₃ H ₃₂ O ₄ PM: 372 g/mol	172 – 173	92
3		FM: C ₂₃ H ₃₂ O ₅ PM: 388 g/mol	248 – 249	77
4		FM: C ₂₃ H ₃₀ O ₄ PM: 370 g/mol	204 – 205	78
5		FM: C ₂₁ H ₂₈ O ₃ PM: 328 g/mol	168 – 169	81



6		FM: C ₂₇ H ₃₁ NO ₄ PM: 433 g/mol	219 – 220	68
7		FM: C ₂₇ H ₃₀ ClNO ₄ PM: 467.5 g/mol	228 – 229	53
8		FM: C ₂₇ H ₃₀ BrNO ₄ PM: 511.9 g/mol	225 – 226	54
9		FM: C ₂₈ H ₃₃ NO ₄ PM: 447 g/mol	232 – 233	72
10		FM: C ₂₈ H ₃₃ NO ₅ PM: 463 g/mol	227 – 228	77
11		FM: C ₂₈ H ₃₂ O ₄ PM: 432.6 g/mol	222- 223	76



ESPECTROSCOPIA



ESPECTROS DE LA MATERIA PRIMA
 3β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona
 Compuesto 1

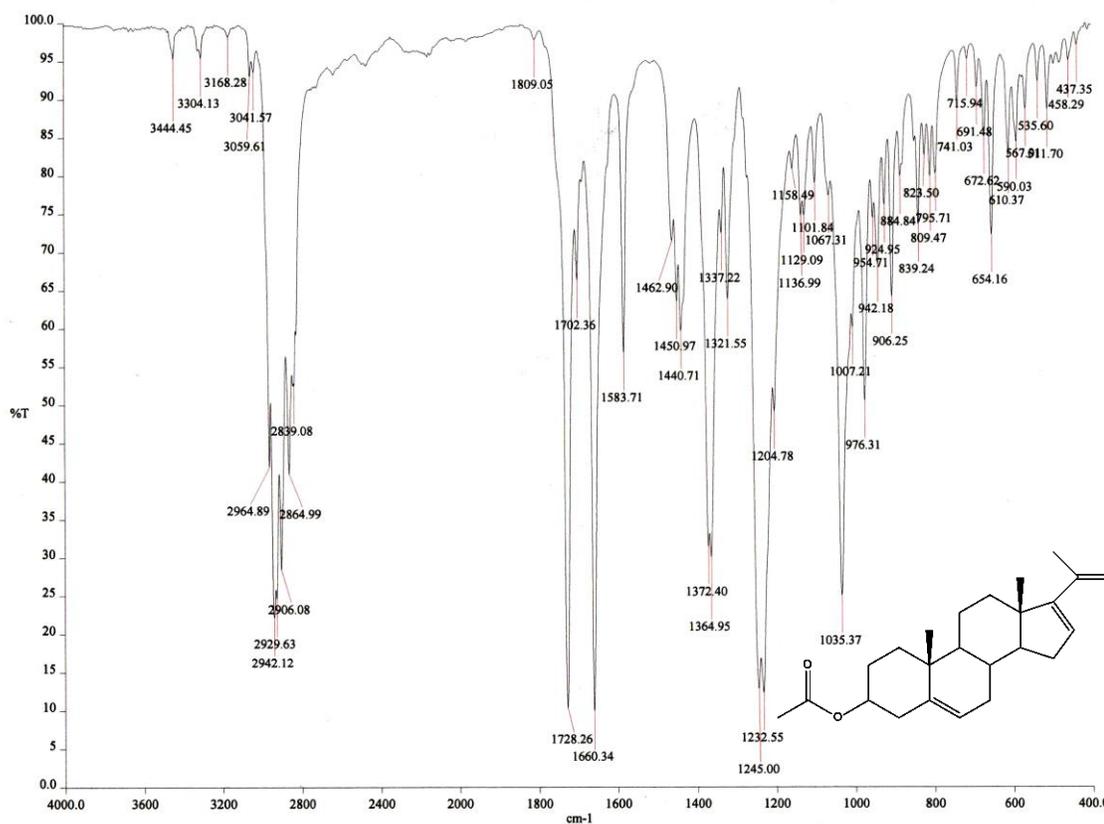


Figura E1. Espectro IR de la 3β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).

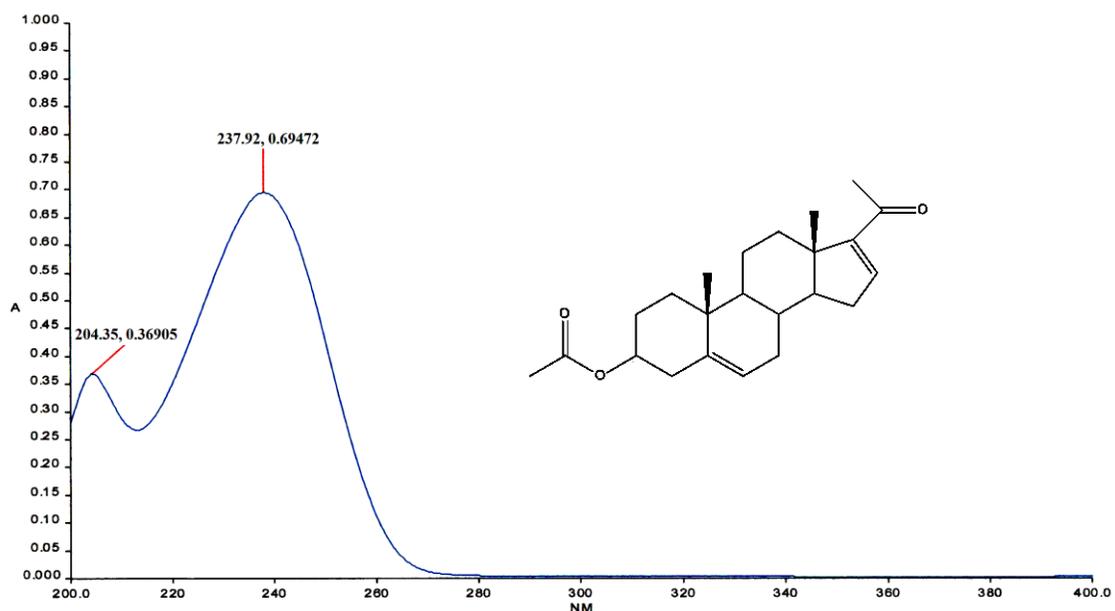


Figura E2. Espectro de UV de la 3β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).

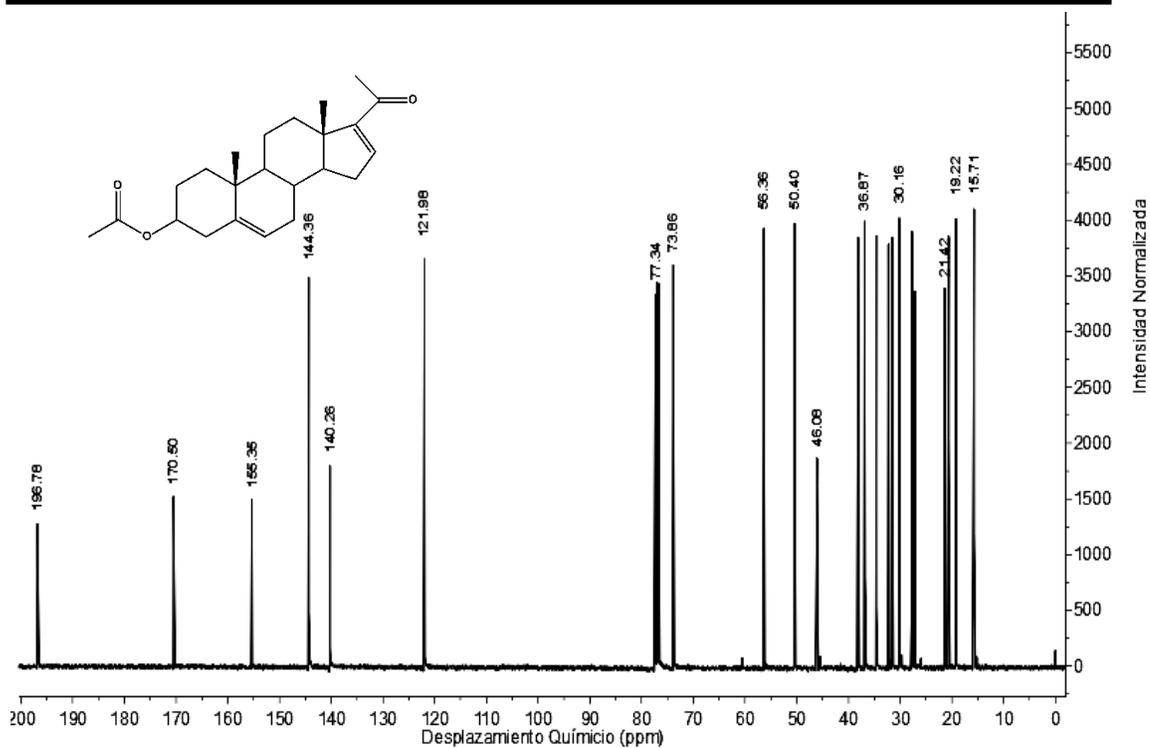


Figura E3. Espectro de RMN- ^{13}C de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).

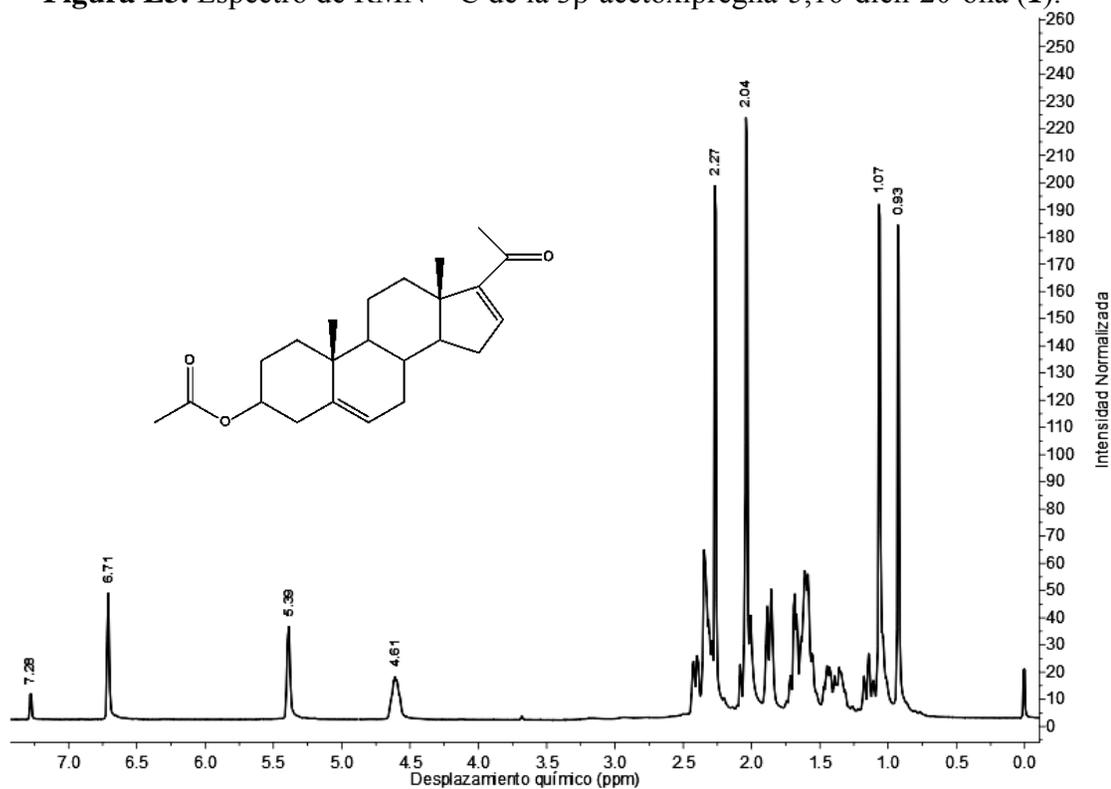


Figura E4. Espectro de RMN- ^1H de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).

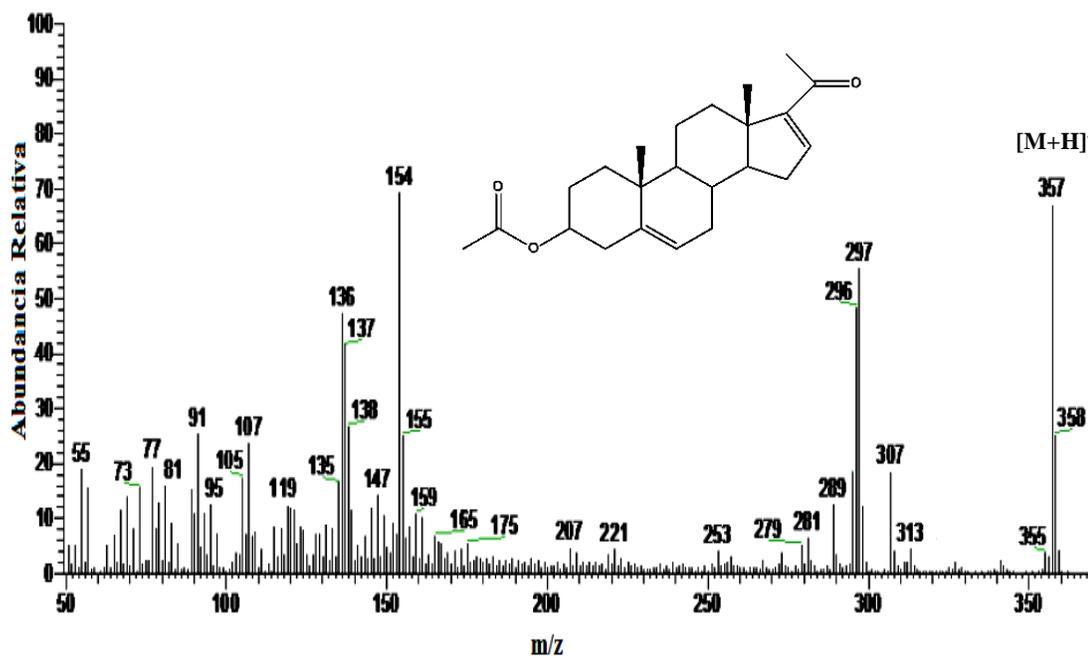


Figura E5. Espectro de masas de la 3β-acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1).



ESPECTROS DE LA 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona Compuesto 2

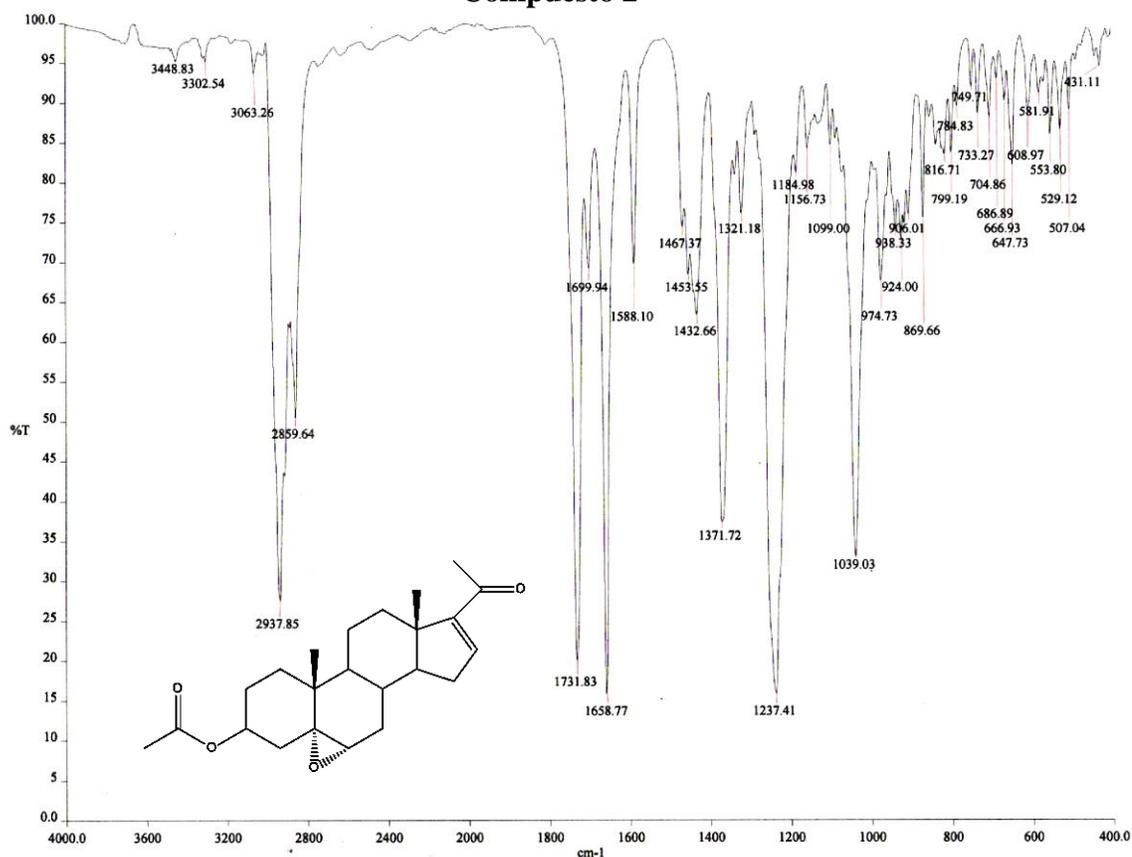


Figura E6. Espectro IR de la 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).

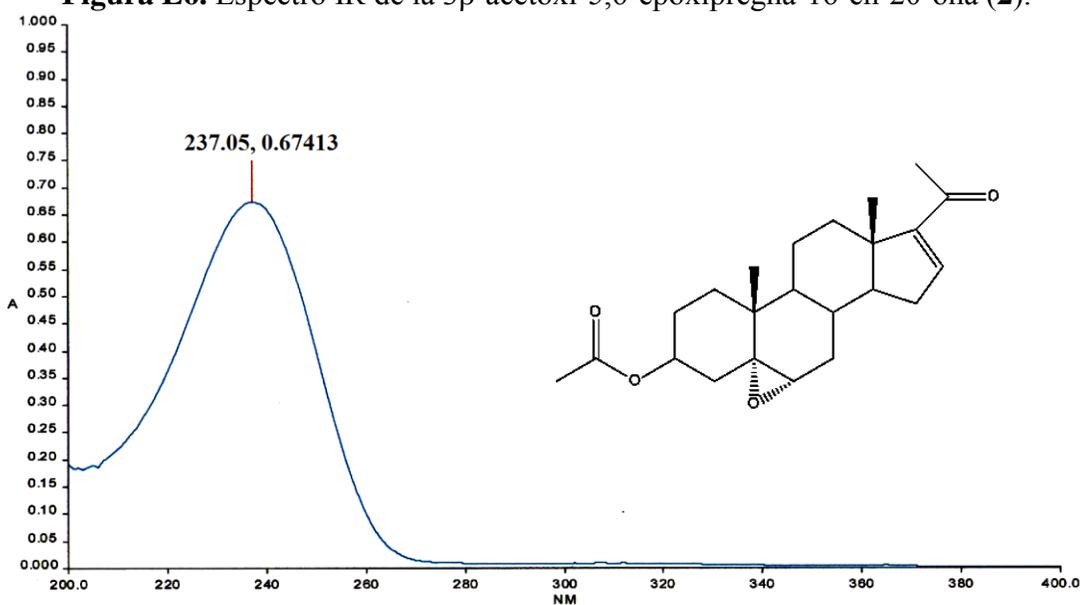


Figura E7. Espectro de UV de la 3 β -acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).

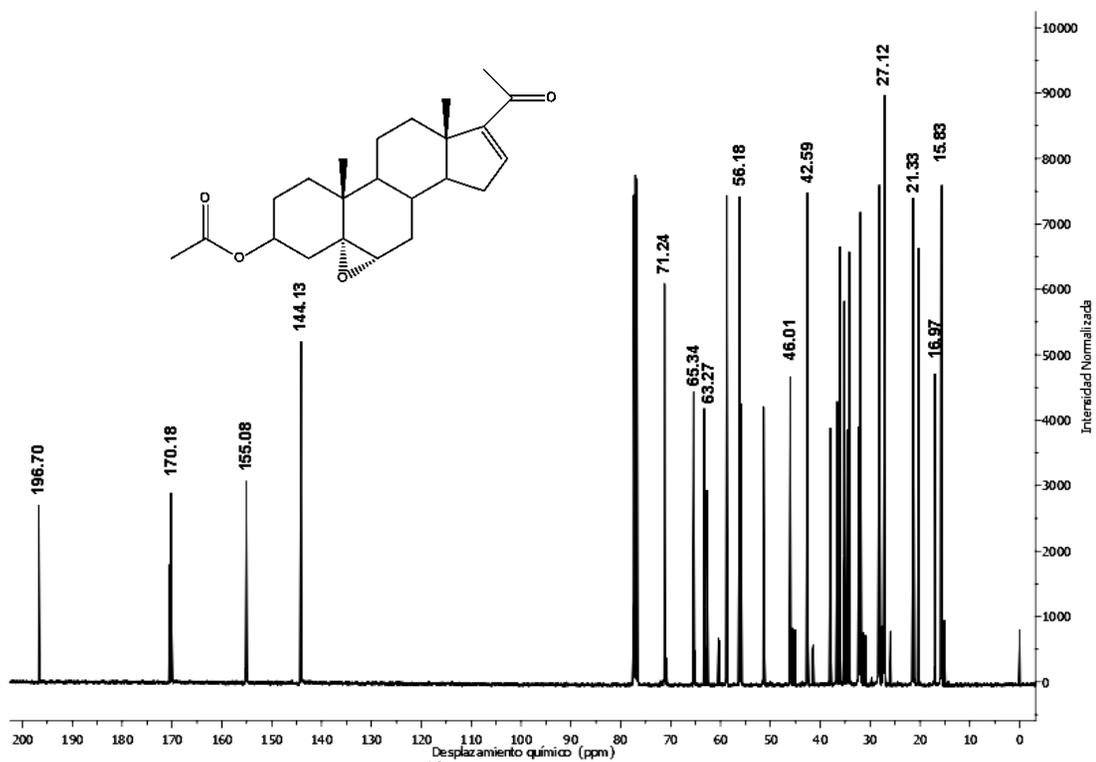


Figura E8. Espectro de RMN-¹³C de la 3β-acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).

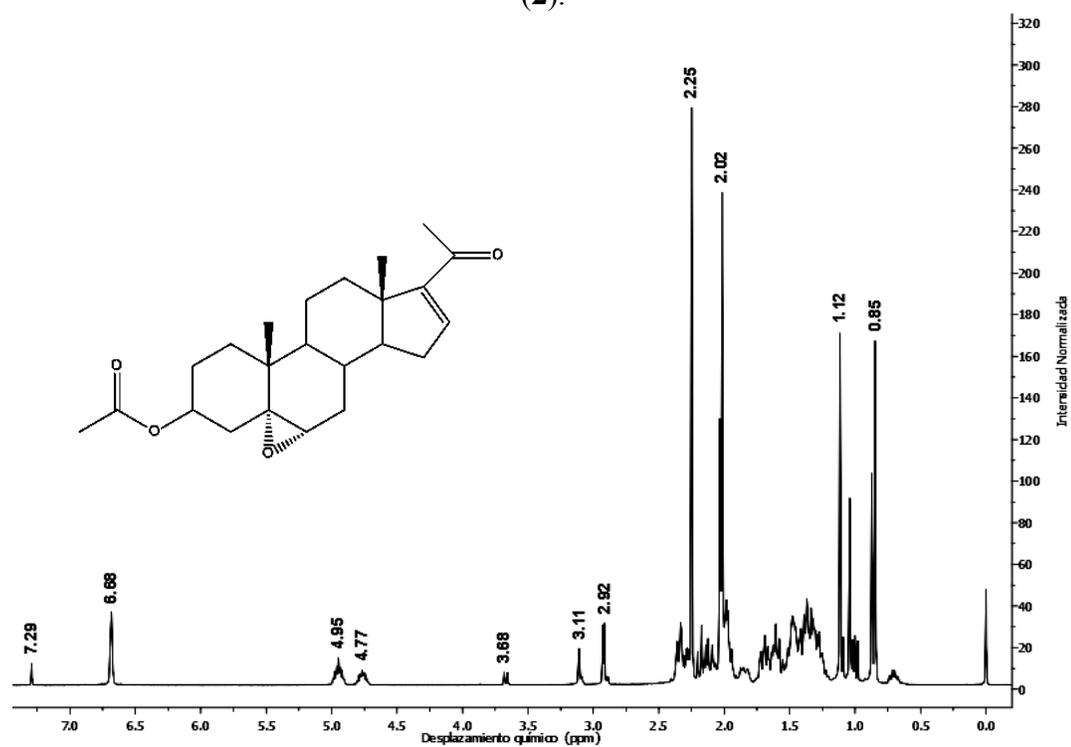


Figura E9. Espectro de RMN-¹H de la 3β-acetoxi-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).

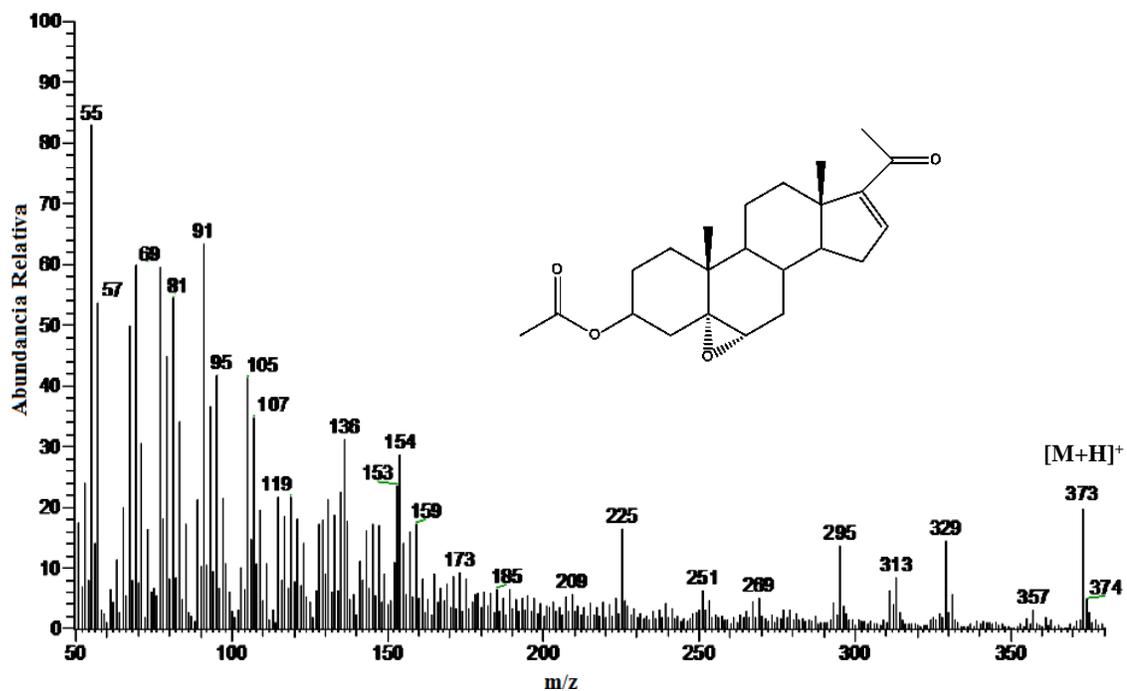


Figura E10. Espectro de masas de la 3β-acetoxy-5,6-epoxipregna-16-en-20-ona (2).

ESPECTROS DE LA
3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregna-16-en-6,20-diona
Compuesto 3

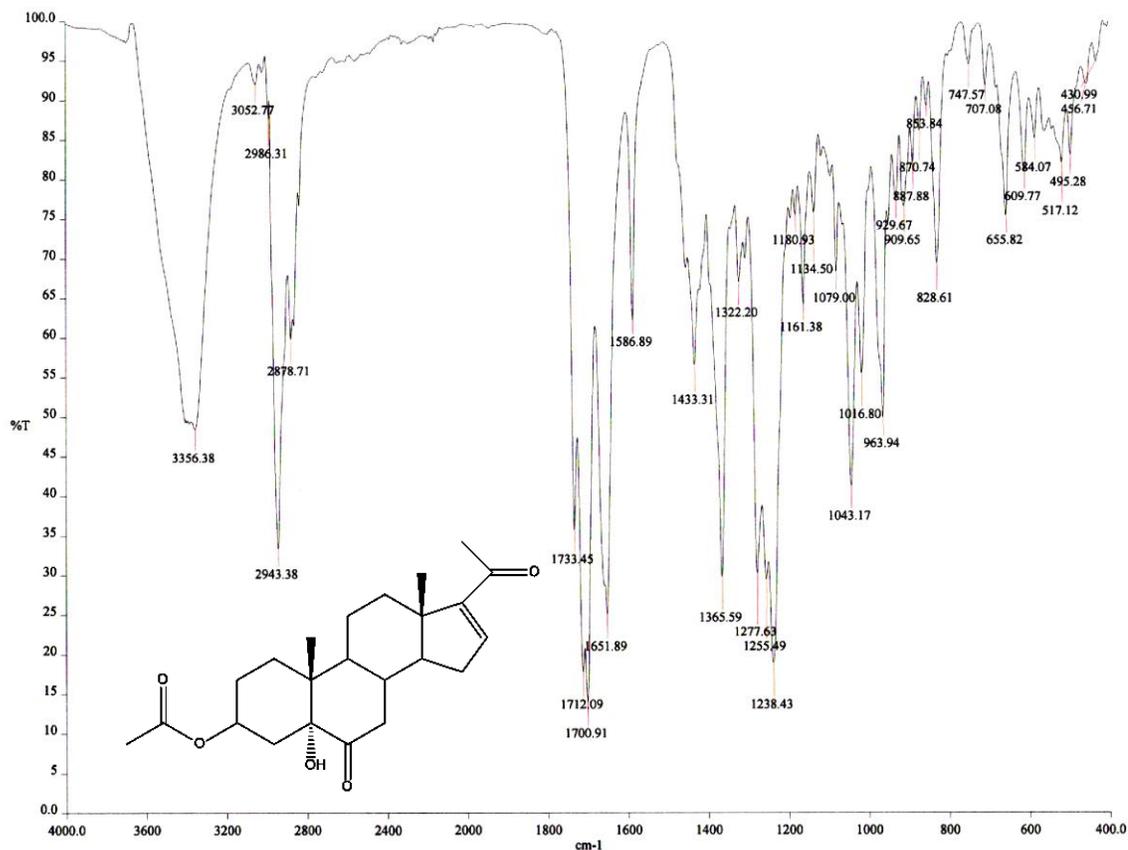


Figura E11. Espectro IR de la 3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregnan-16-en-6,20-diona (3).

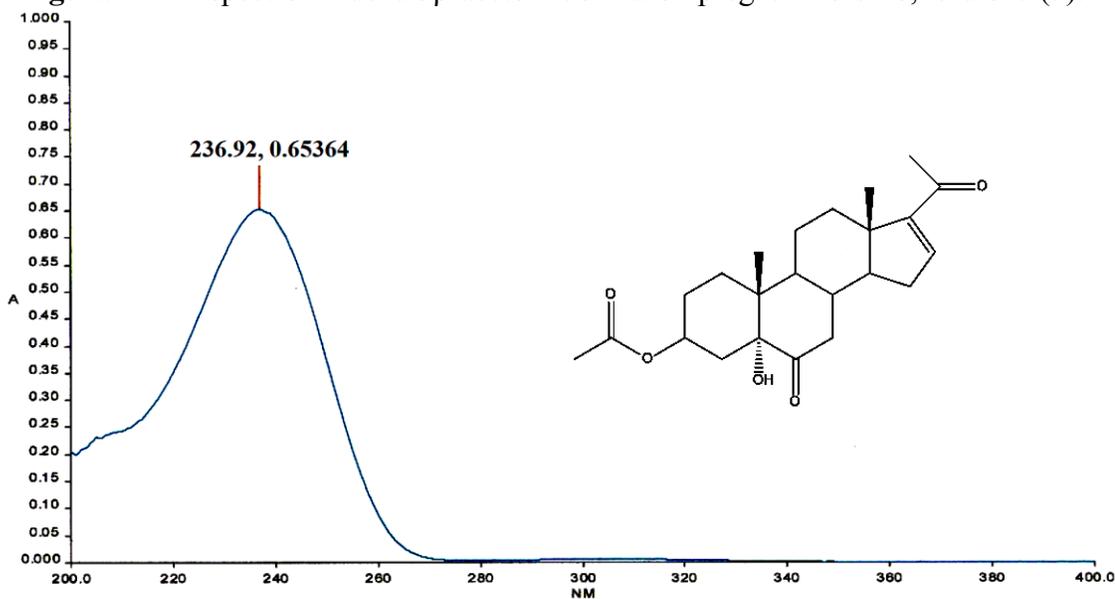


Figura E12. Espectro de UV de la 3 β -acetoxi-5 α -hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3).

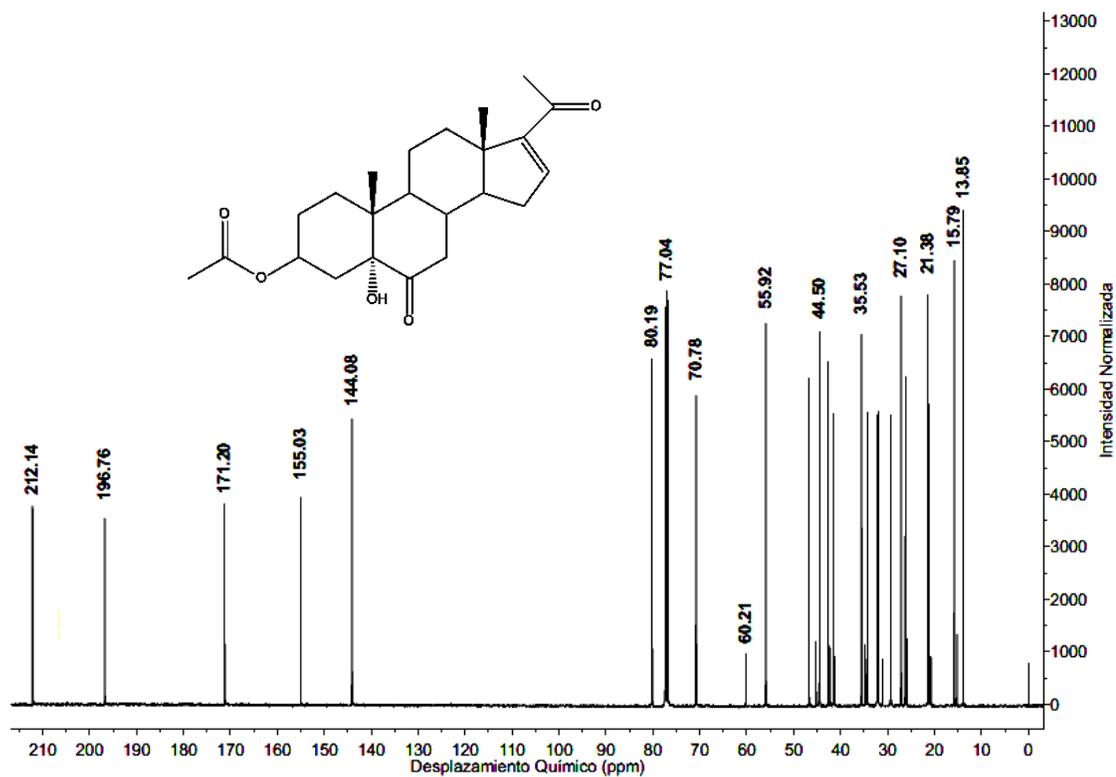


Figura E13. Espectro de RMN- ^{13}C de la 3β-acetoxy-5α-hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (3).

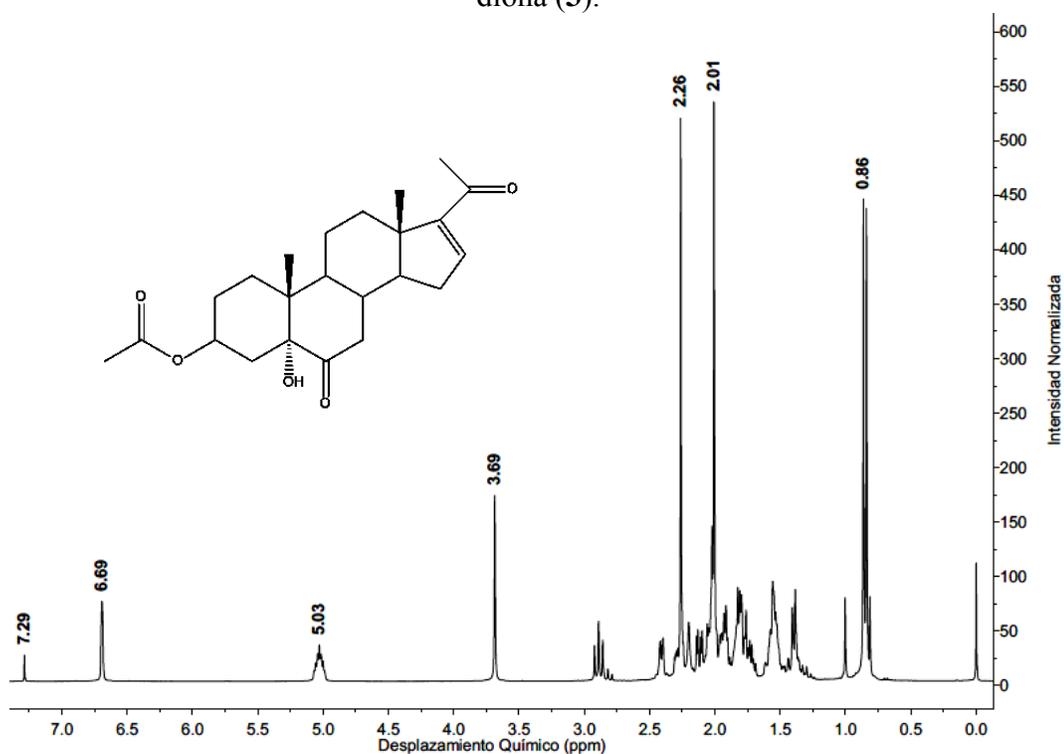


Figura E14. Espectro de RMN- ^1H de la 3β-acetoxy-5α-hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (3).

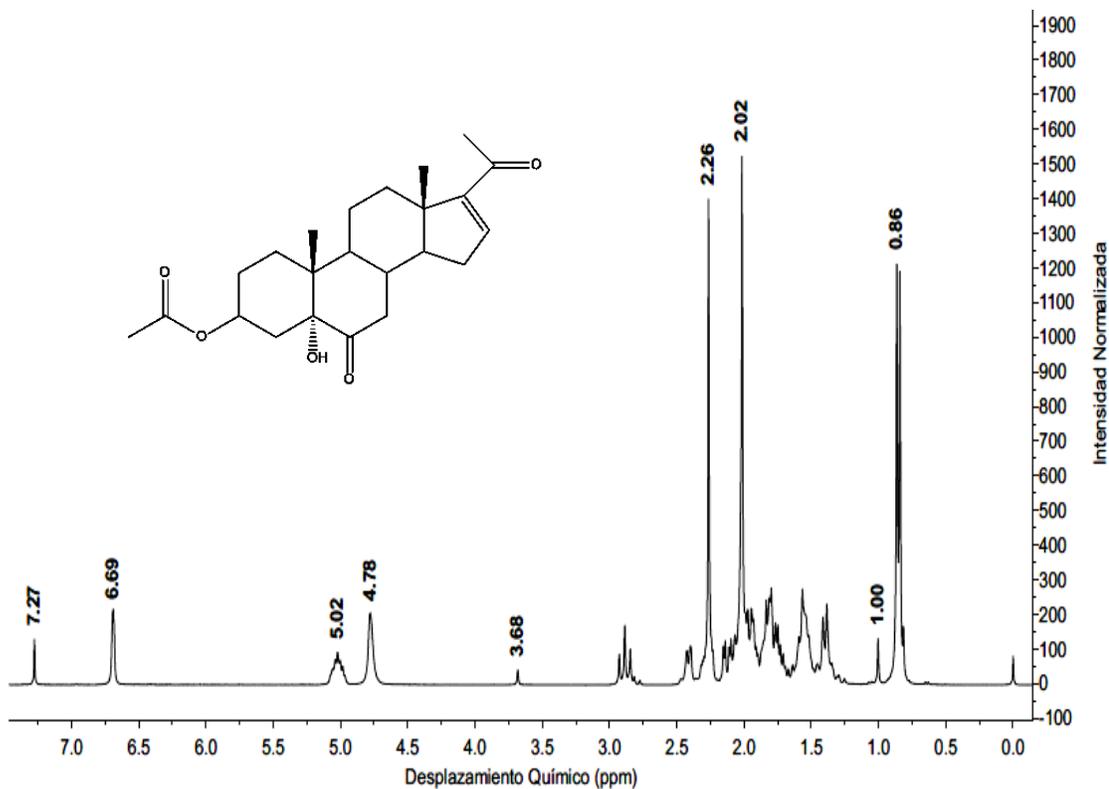


Figura E15. Espectro de RMN- ^1H con D_2O de la 3β-acetoxy-5α-hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3).

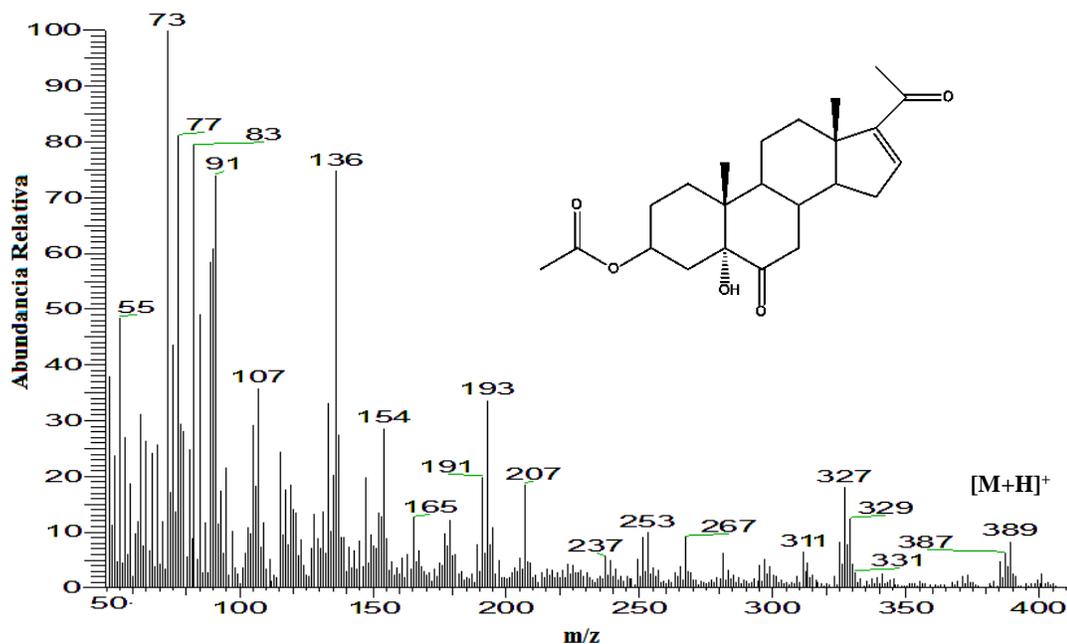


Figura E16. Espectro de masas de la 3β-acetoxy-5α-hidroxipregna-16-en-6,20-diona (3).



ESPECTROS DE LA
3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona
Compuesto 4

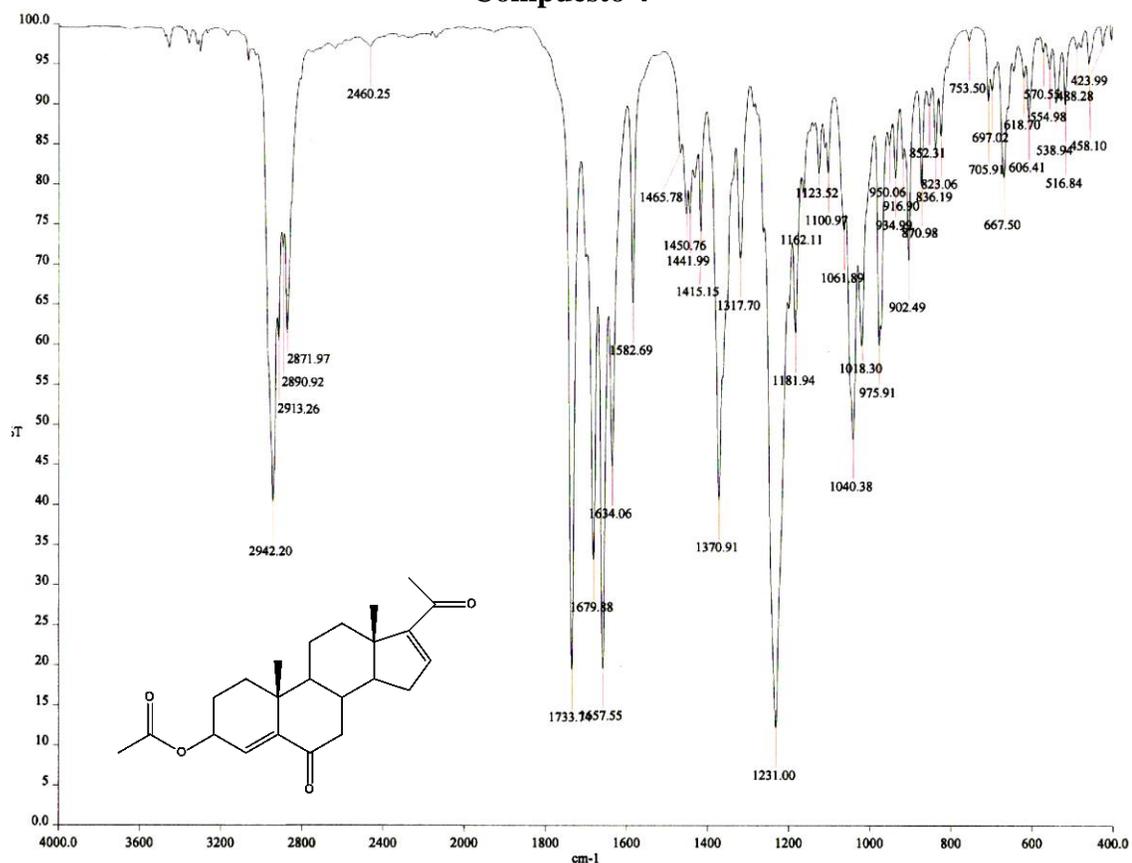


Figura E17. Espectro IR de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).

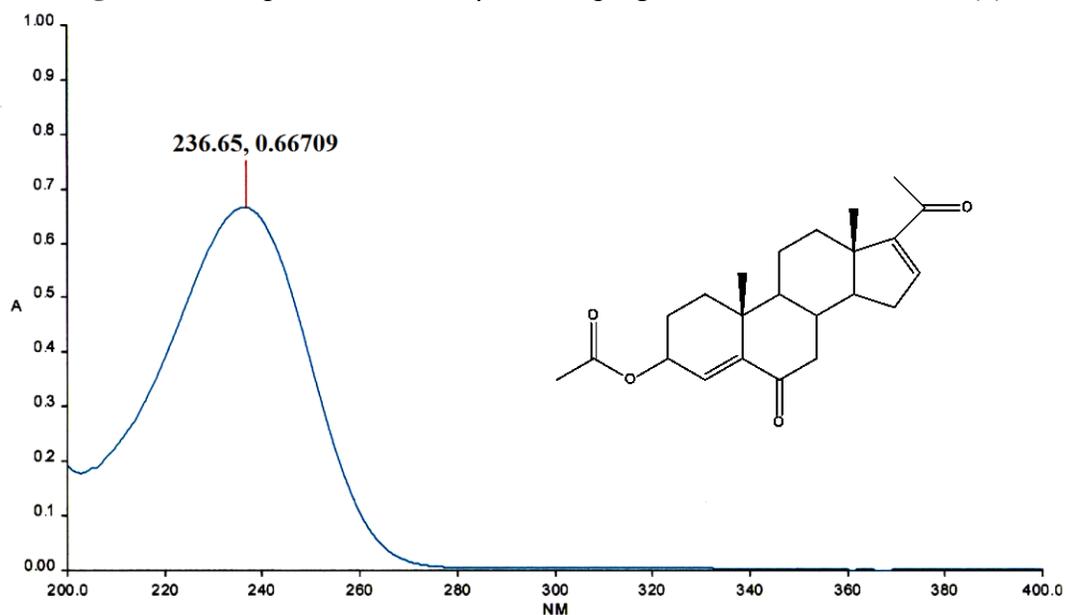


Figura E18. Espectro de UV de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).

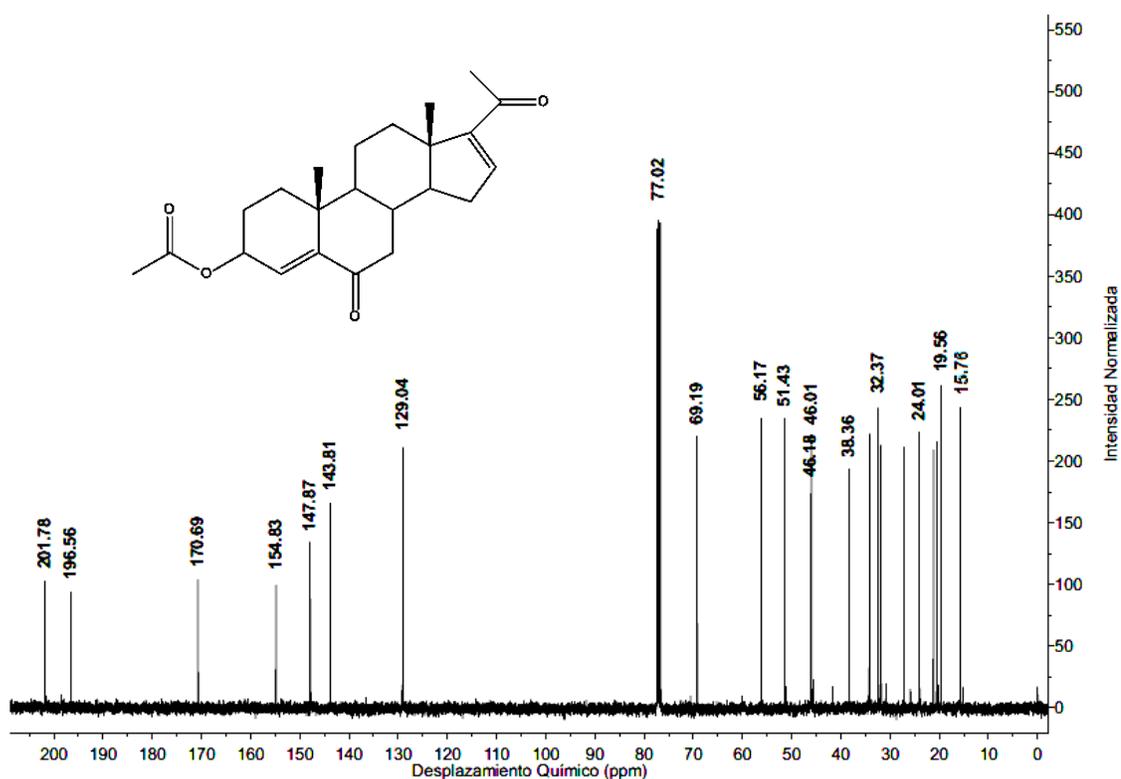


Figura E19. Espectro de RMN-¹³C de la 3β-acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).

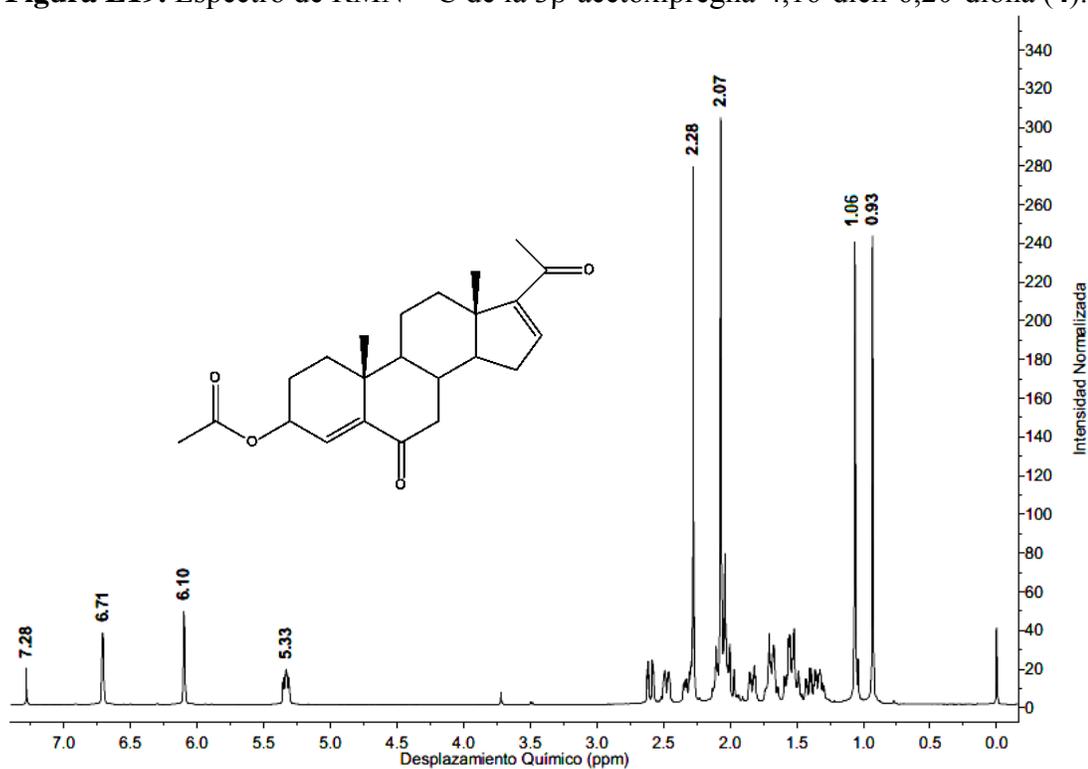


Figura E20. Espectro de RMN-¹H de la 3β-acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).

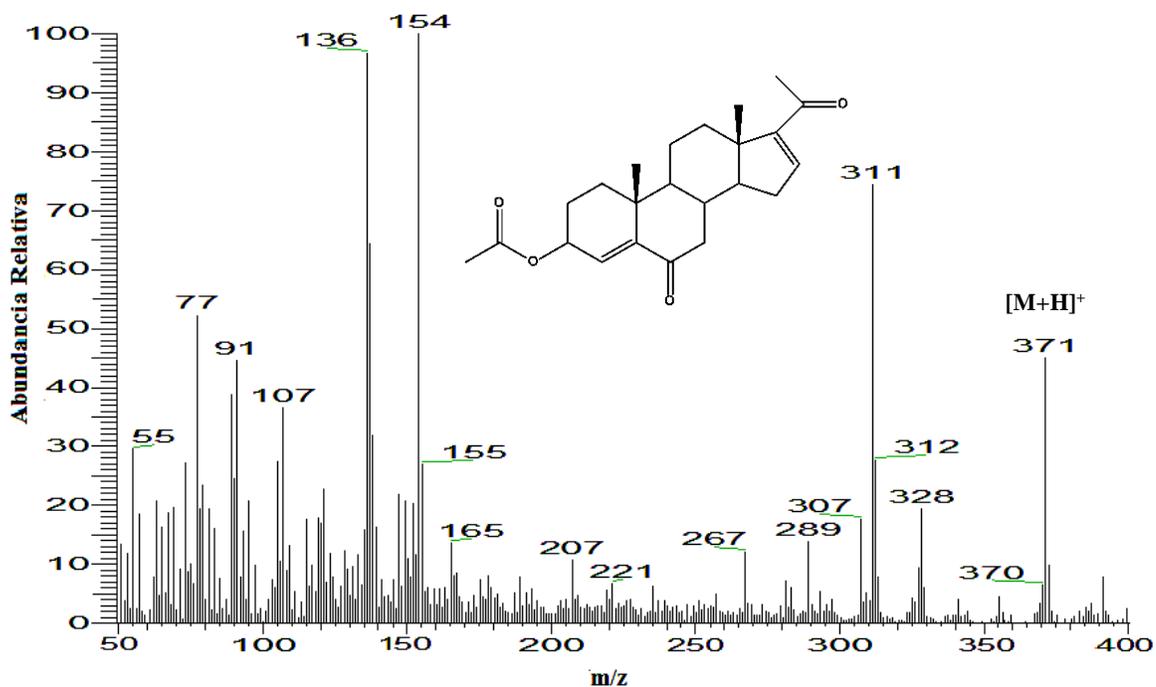


Figura E21. Espectro de masas de la 3β-acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4).

ESPECTROS DE LA
3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona
Compuesto 5

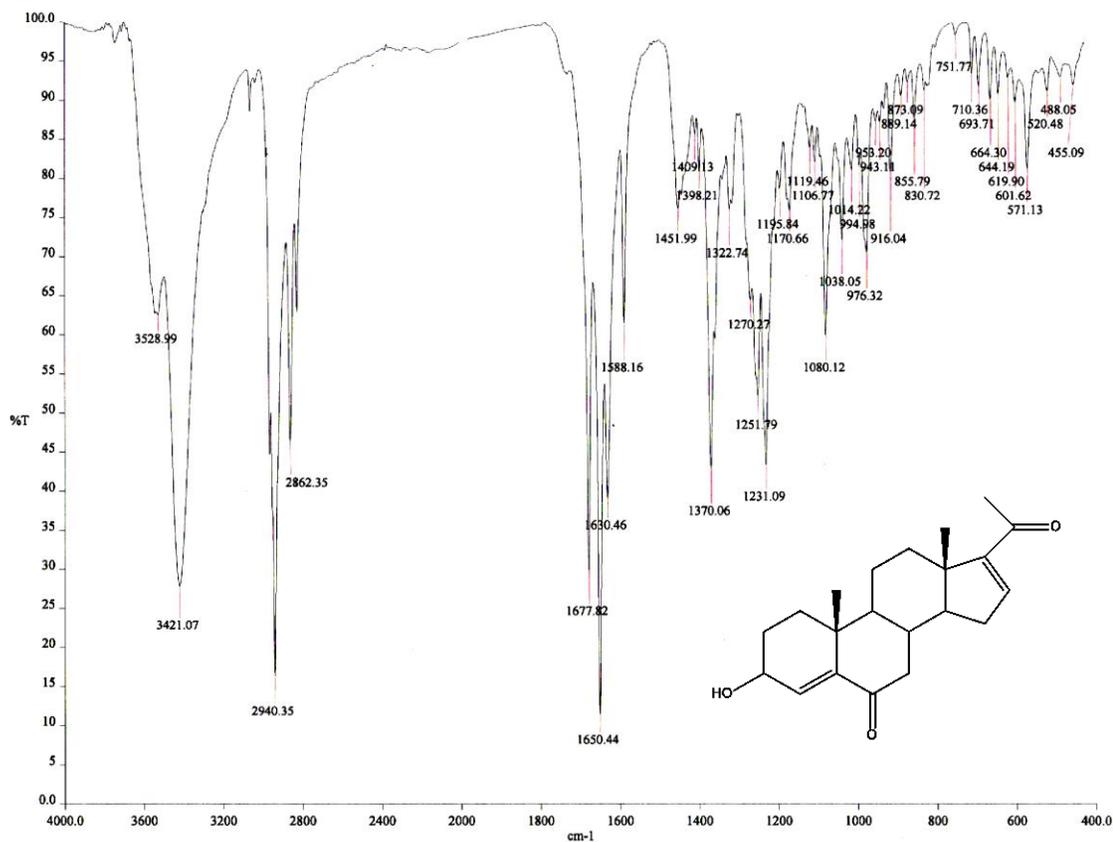


Figura E22. Espectro IR de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5).

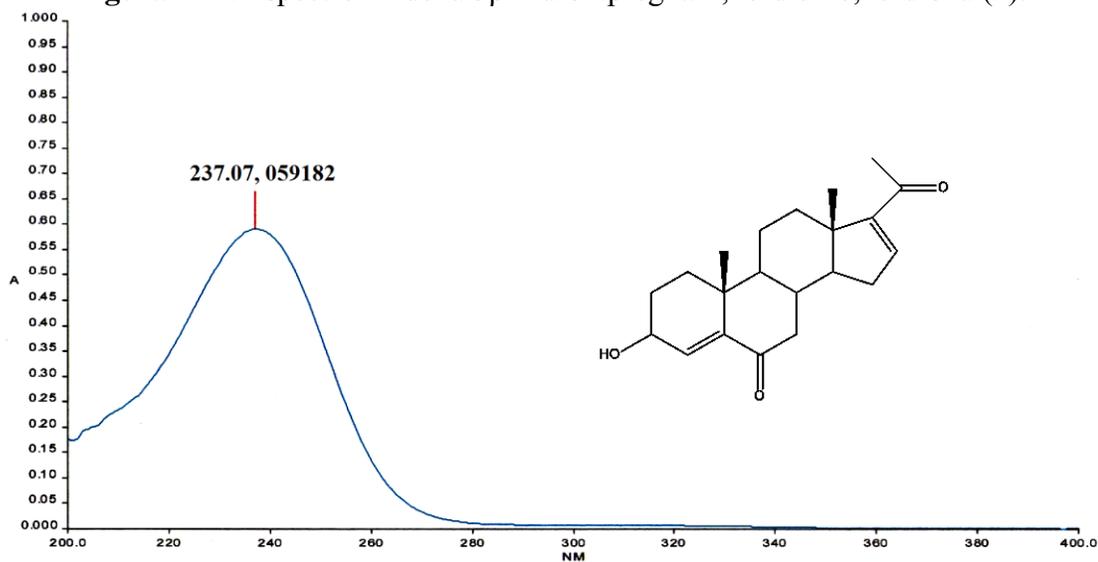


Figura E23. Espectro de UV de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5).

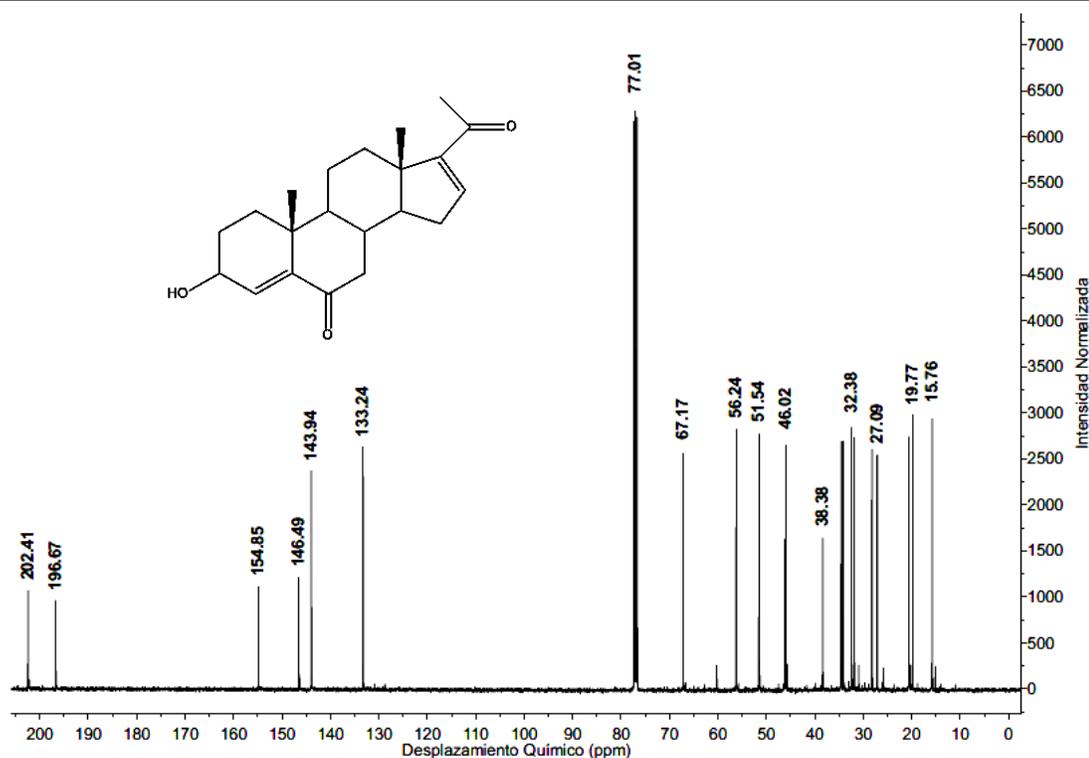


Figura E24. Espectro de RMN-¹³C de la 3β-hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5).

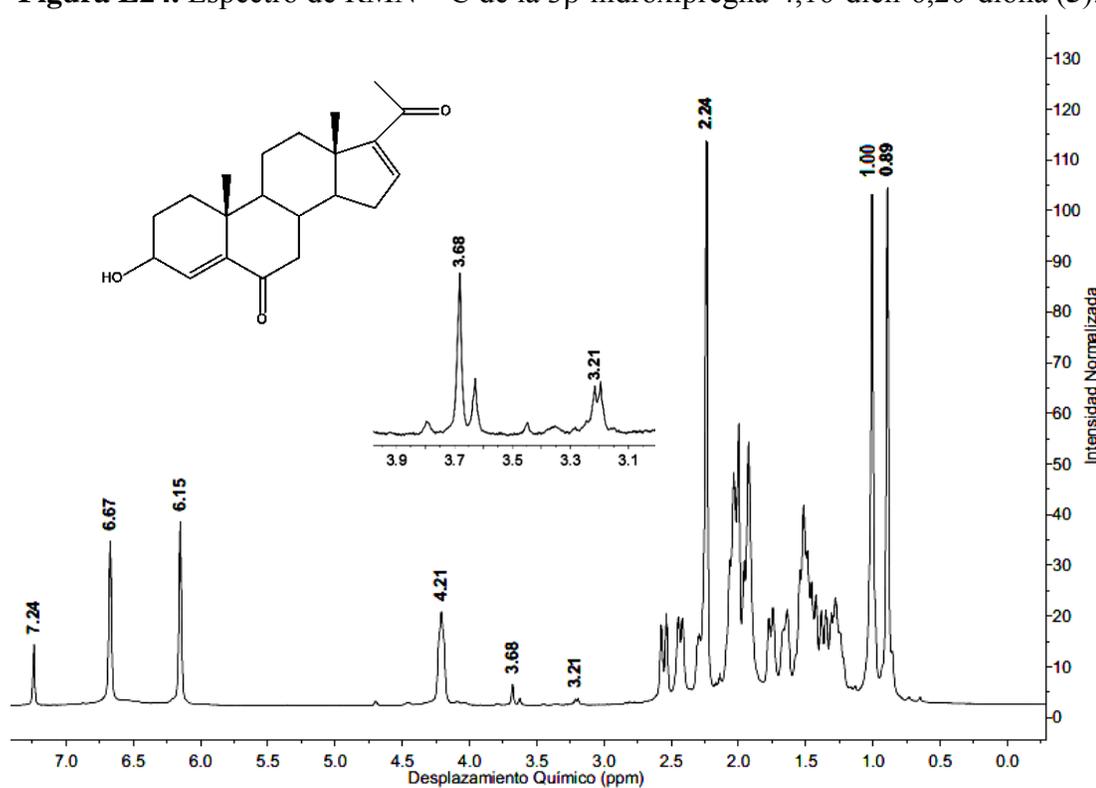


Figura E25. Espectro de RMN-¹H de la 3β-hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5).

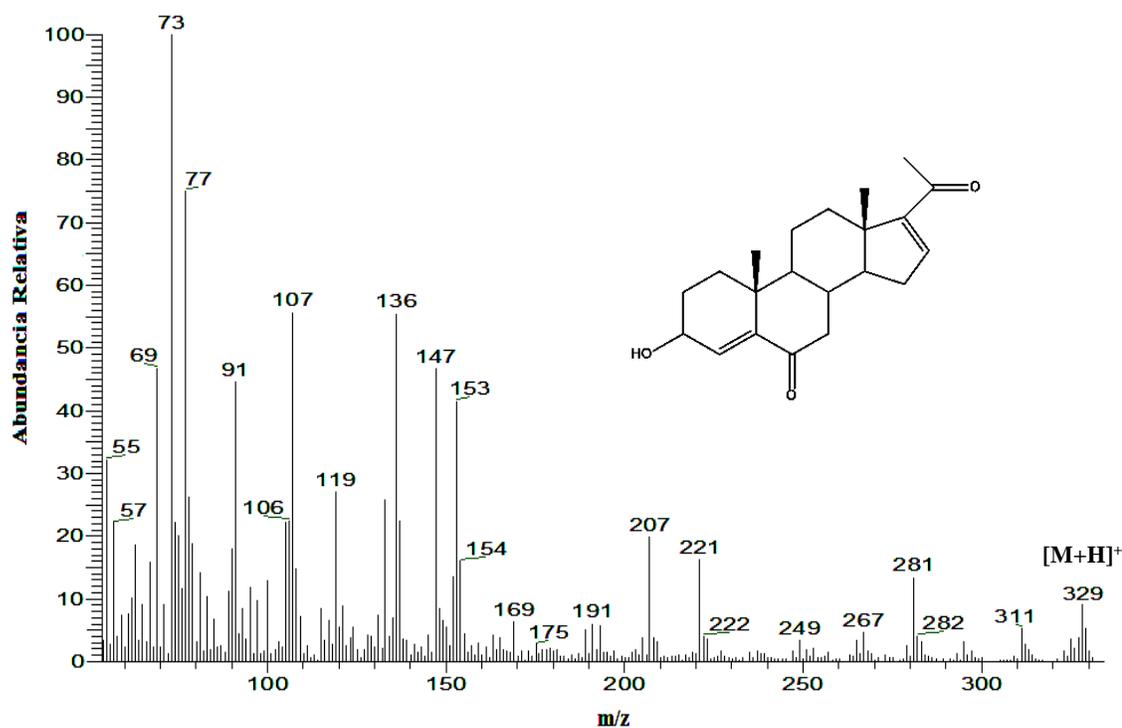


Figura E26. Espectro de masas de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**5**).

ESPECTROS DE LA
3 β -piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona
Compuesto 6

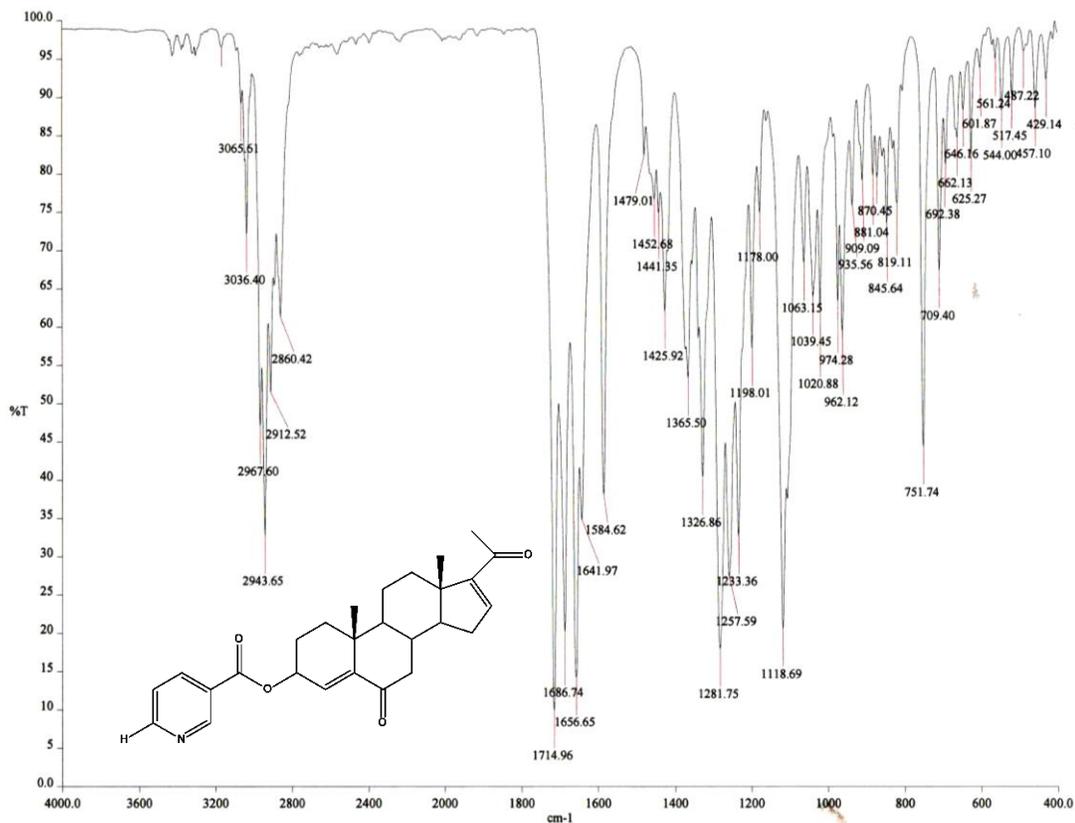


Figura E27. Espectro IR de la 3 β -piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6).

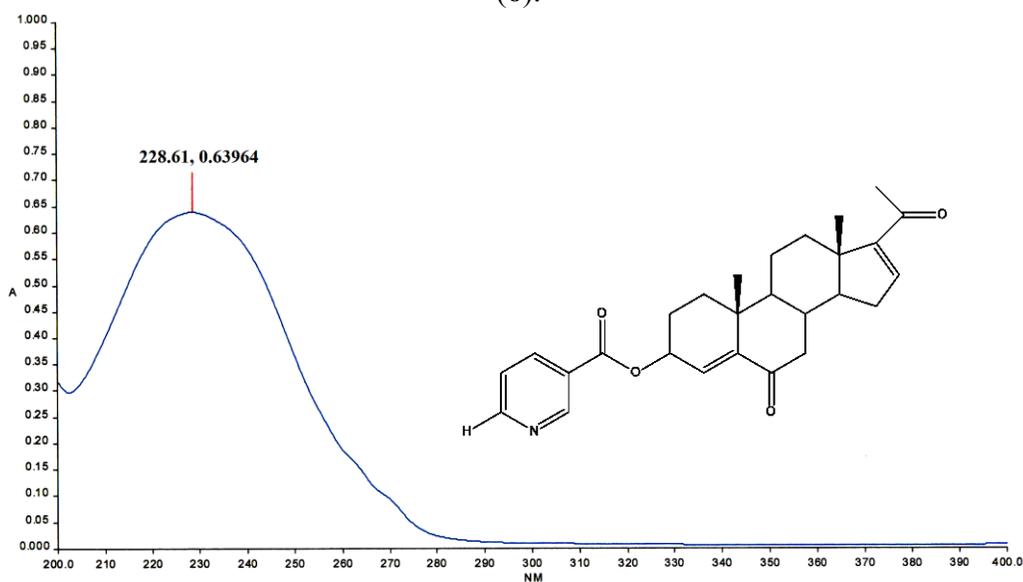


Figura E28. Espectro de UV de la 3 β -piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6).

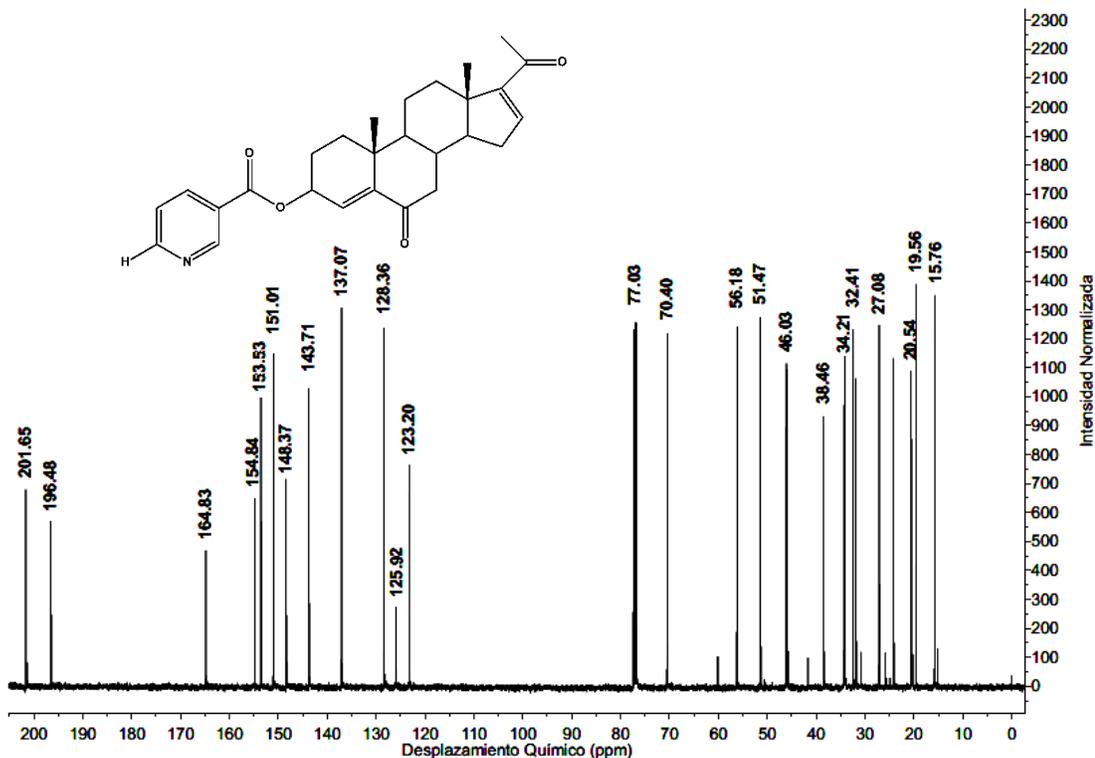


Figura E29. Espectro de RMN-¹³C de la 3β-piridil-3-carboxilopregna-4,16-dien-6,20-diona (6).

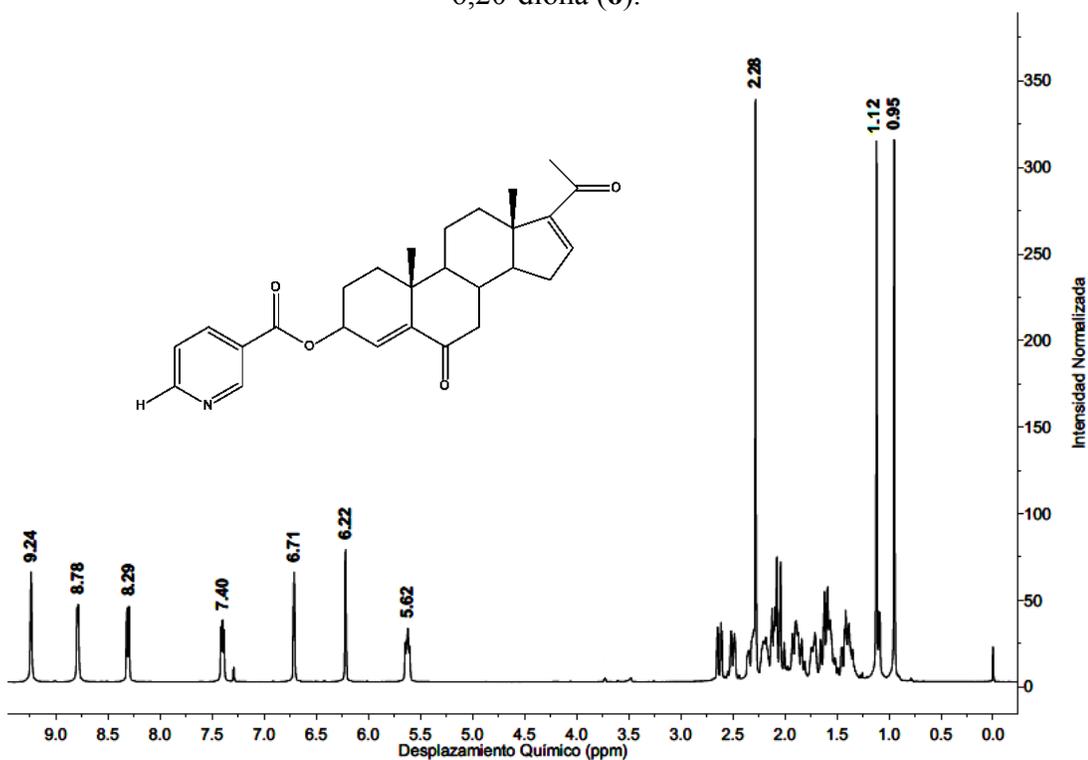


Figura E30. Espectro de RMN-¹H de la 3β-piridil-3-carboxilopregna-4,16-dien-6,20-diona (6).

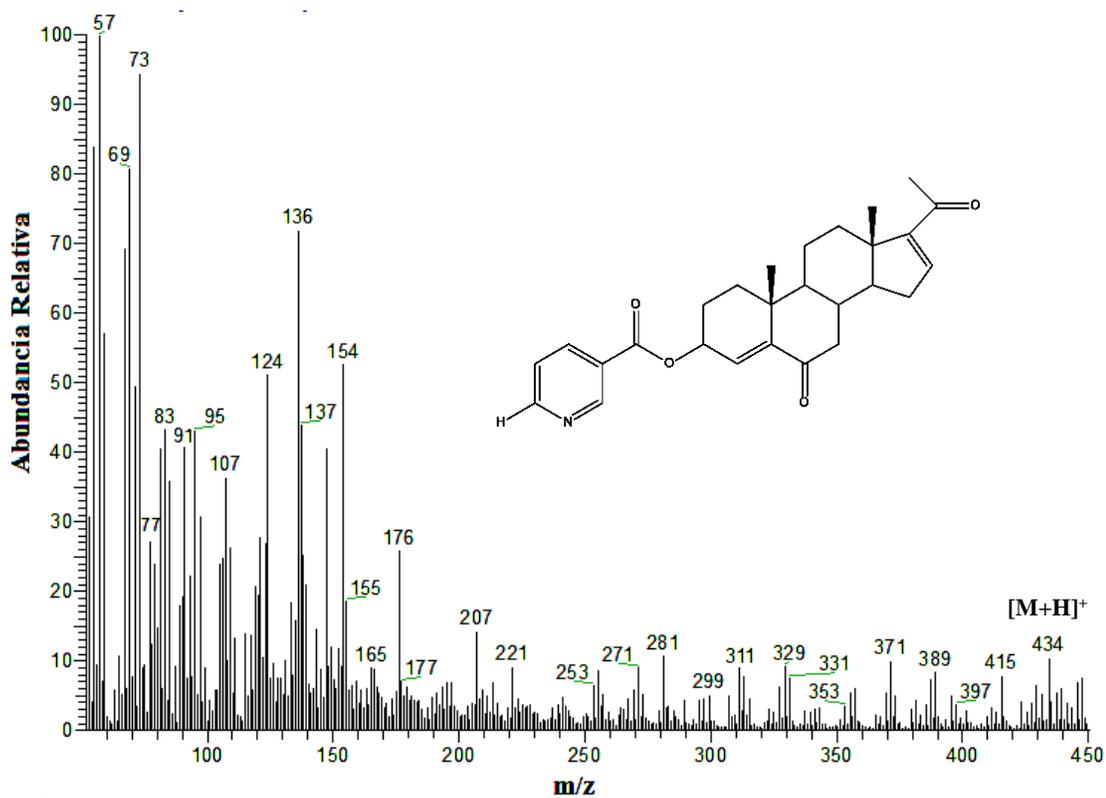


Figura E31. Espectro de masas de la 3β-piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6).

ESPECTROS DE LA
 3β -(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona
 Compuesto 7

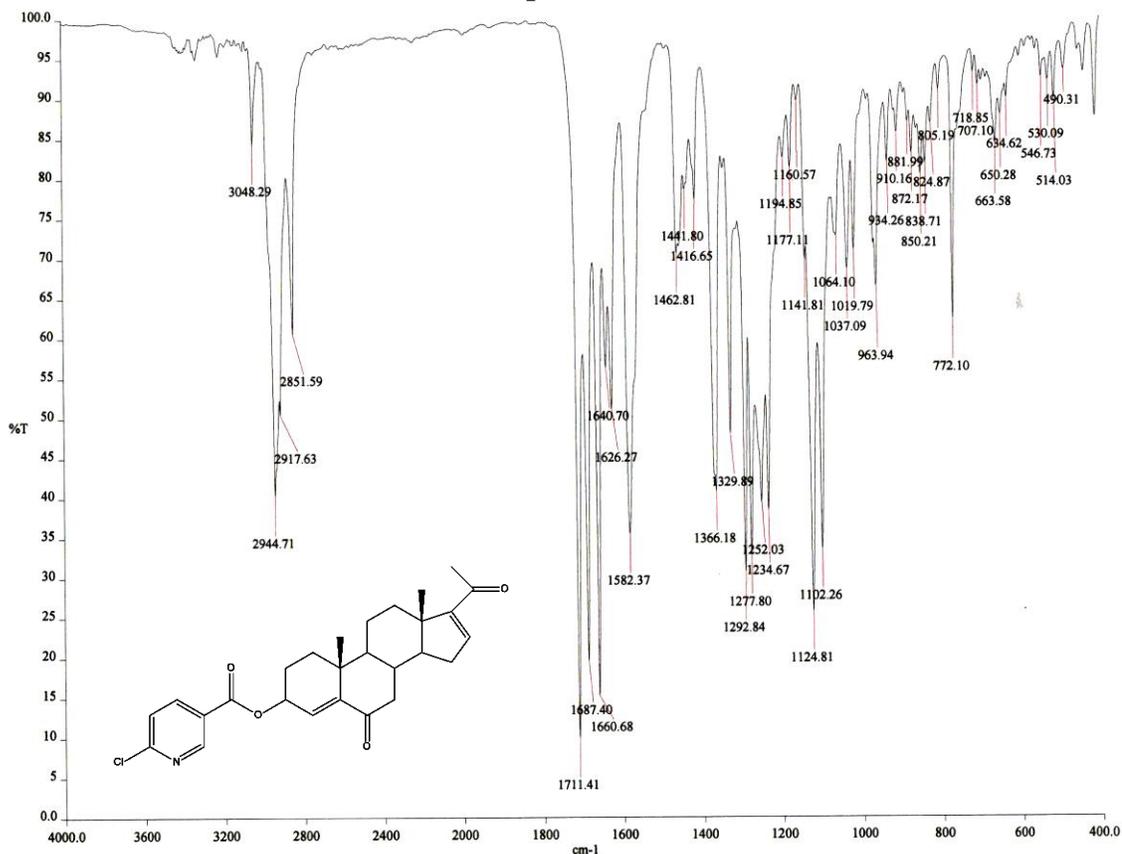


Figura E32. Espectro IR de la 3β -(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7).

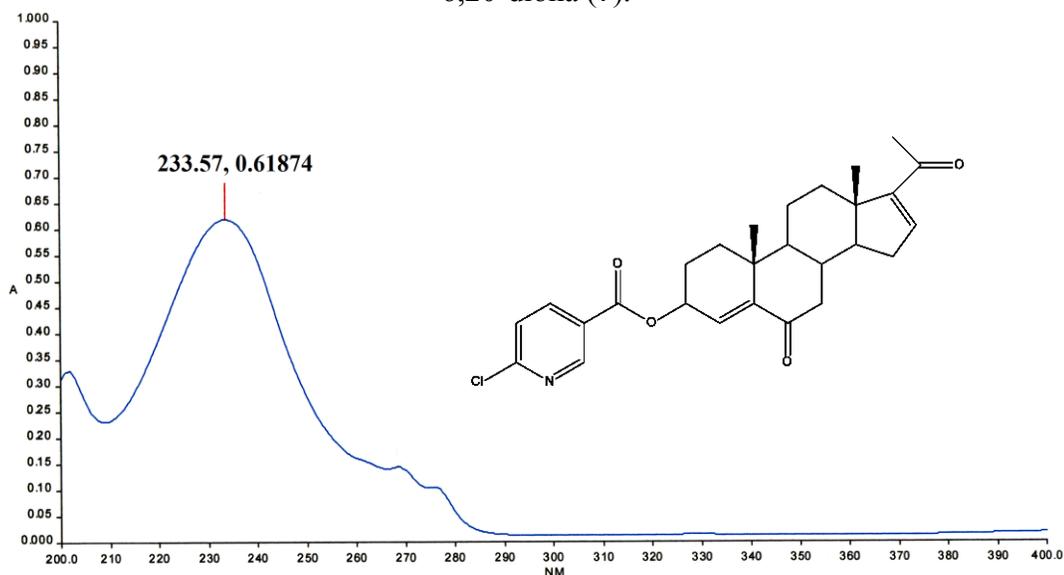


Figura E33. Espectro de UV de la 3β -(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7).

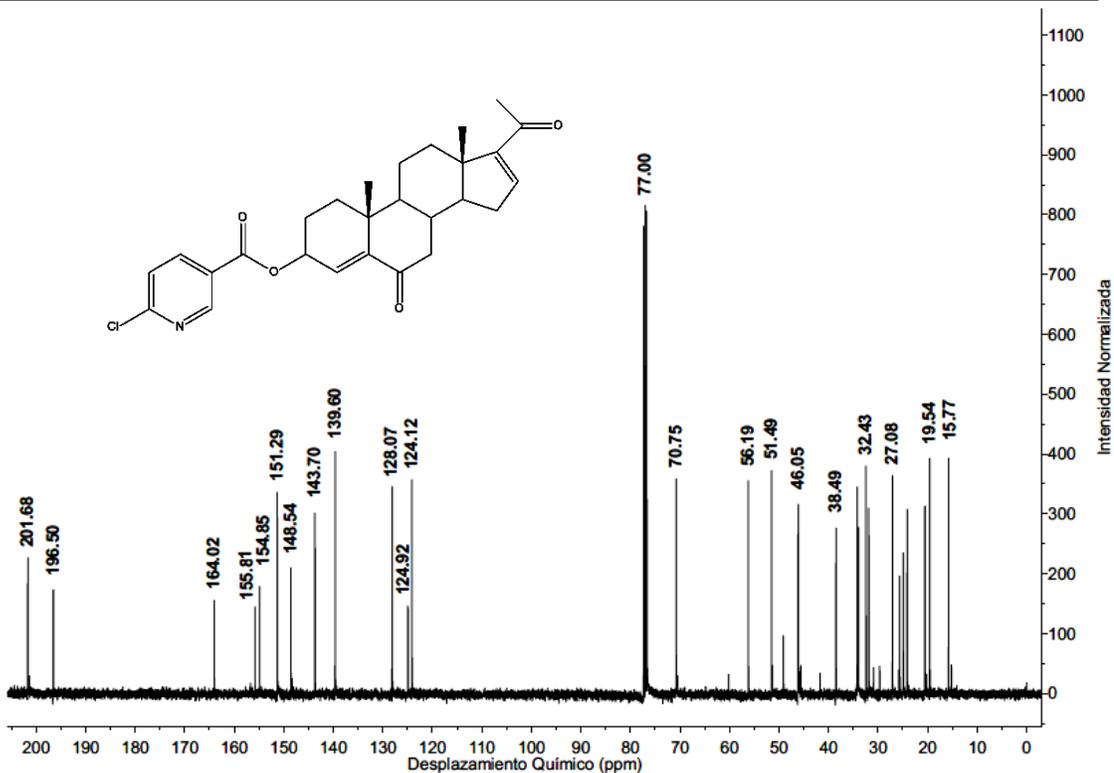


Figura E34. Espectro de RMN- ^{13}C de la 3β-(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7).

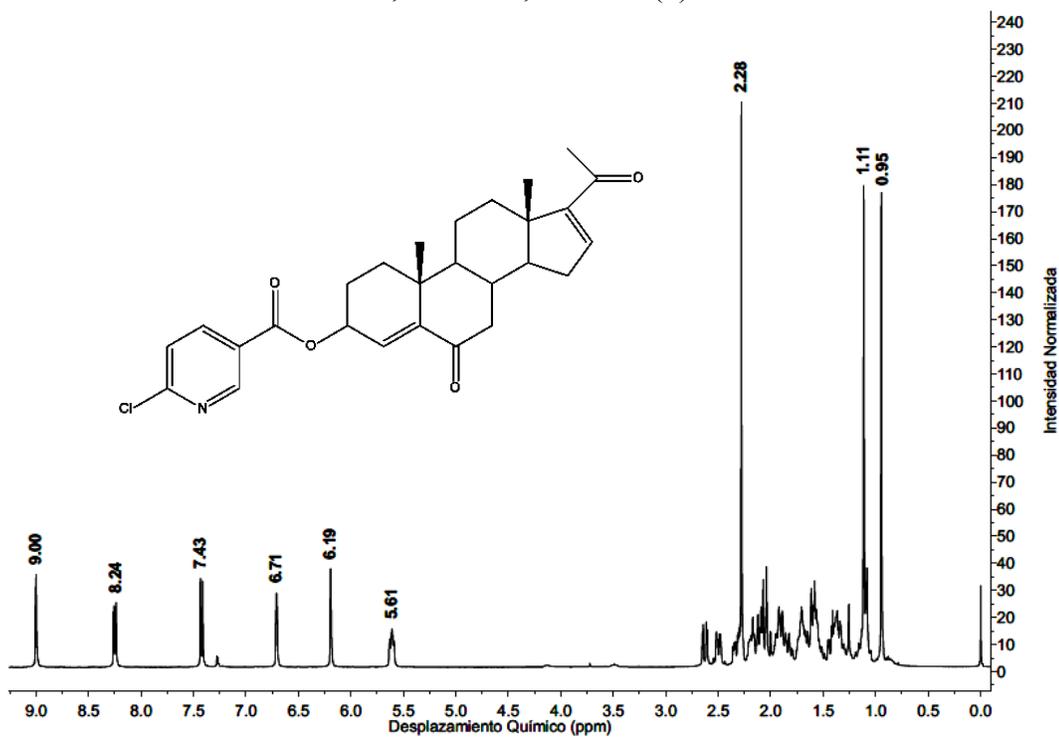


Figura E35. Espectro de RMN- ^1H de la 3β-(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7).

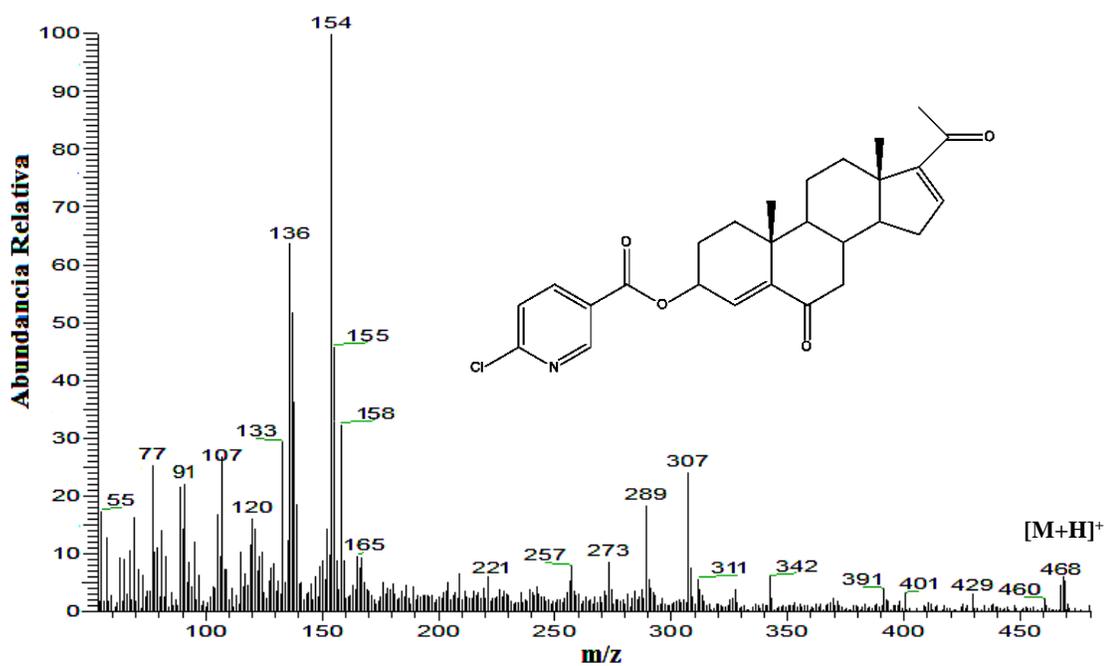


Figura E36. Espectro de masas de la 3β-(6-cloro)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7).

ESPECTROS DE LA
3 β -(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona
Compuesto 8

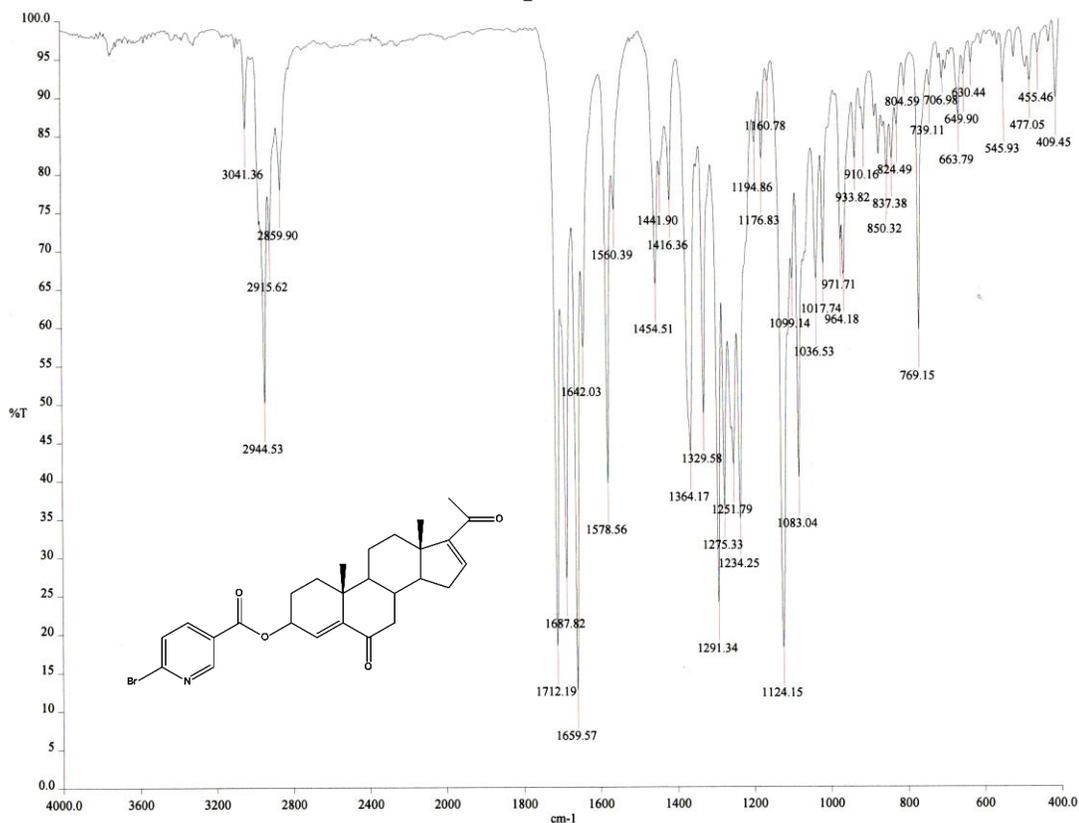


Figura E37. Espectro IR de la 3 β -(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8).

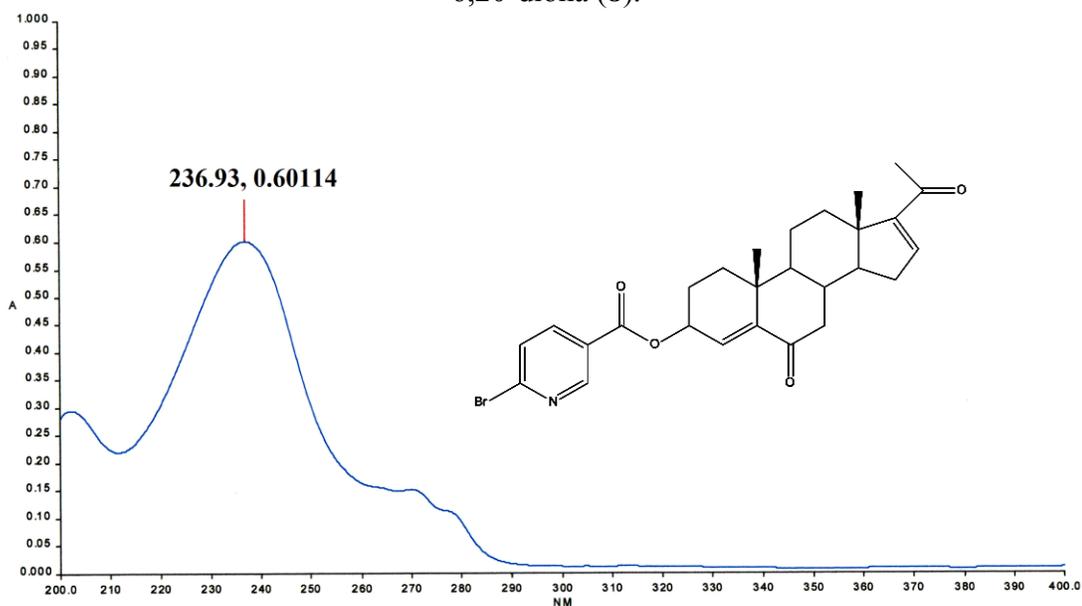


Figura E38. Espectro de UV de la 3 β -(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8).

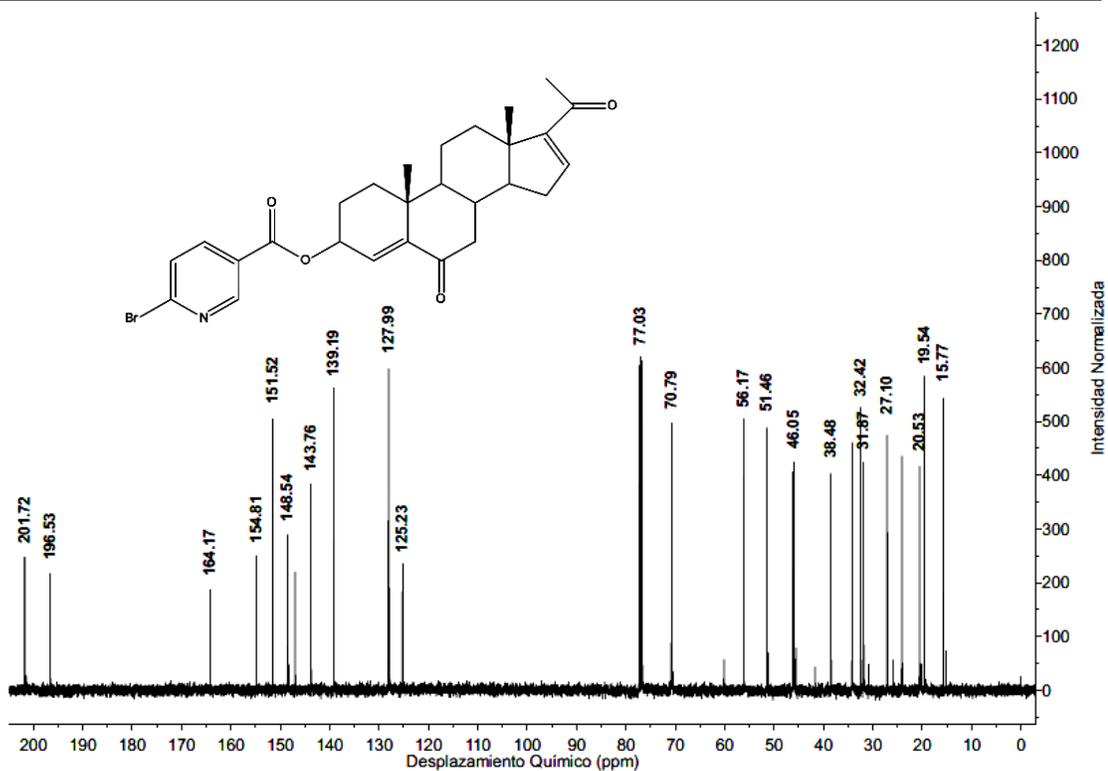


Figura E39. Espectro de RMN-¹³C de la 3β-(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**8**).

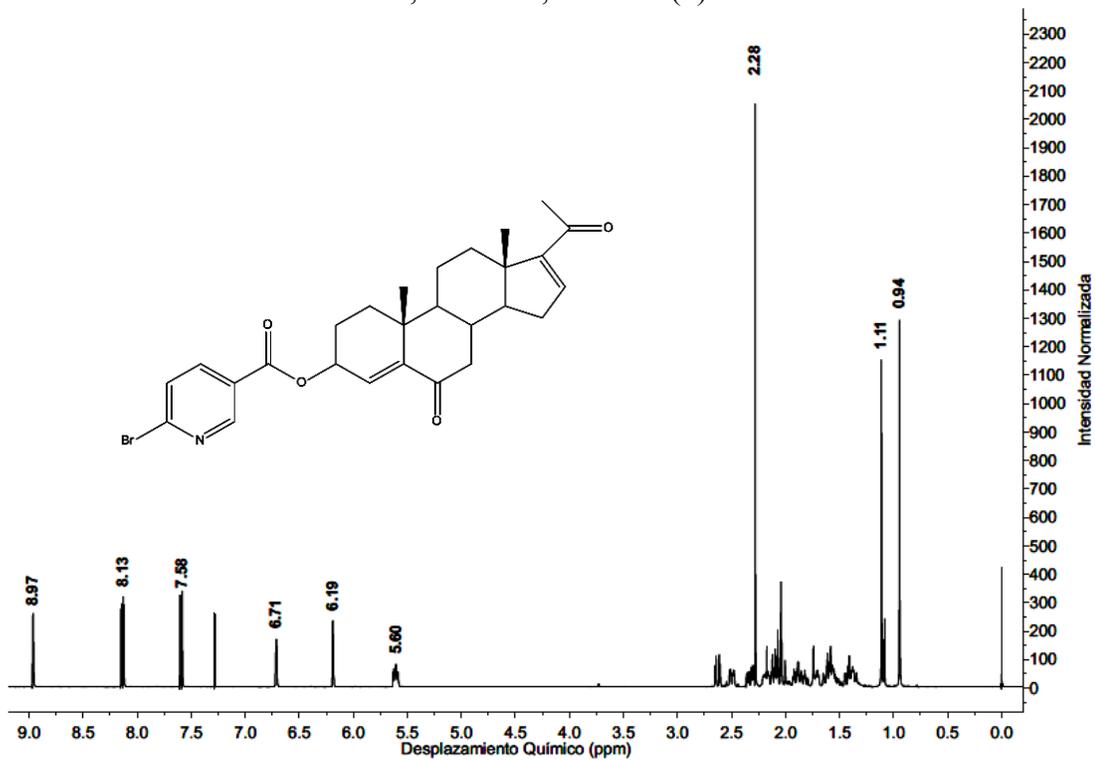


Figura E40. Espectro de RMN-¹H de la 3β-(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**8**).

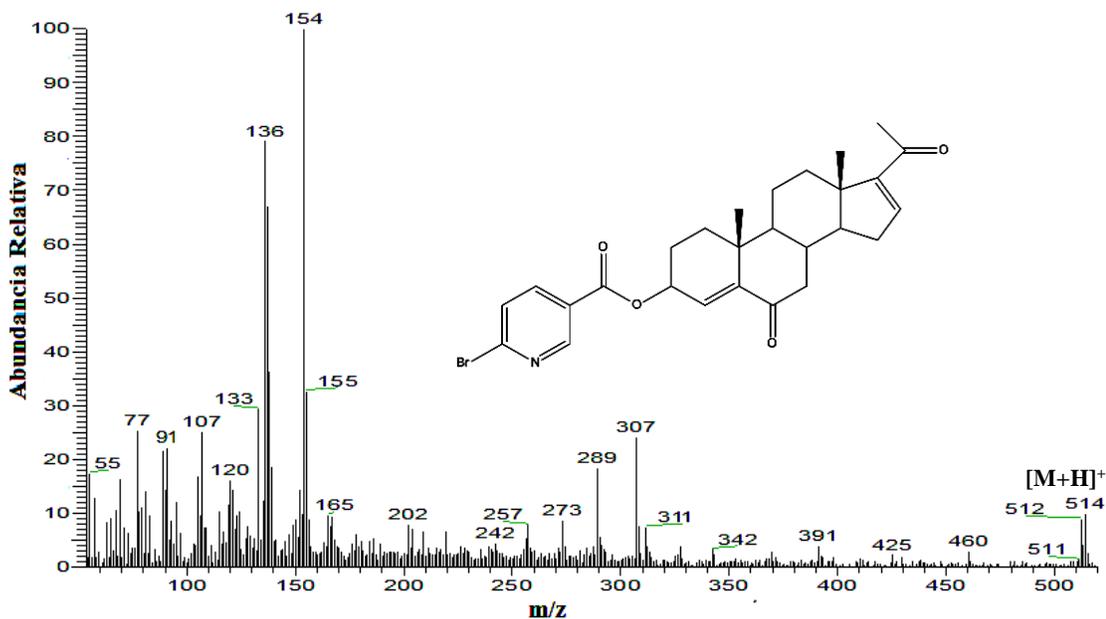


Figura E41. Espectro de masas de la 3β-(6-bromo)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8).

**ESPECTROS DE LA
3β-(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona
Compuesto 9**

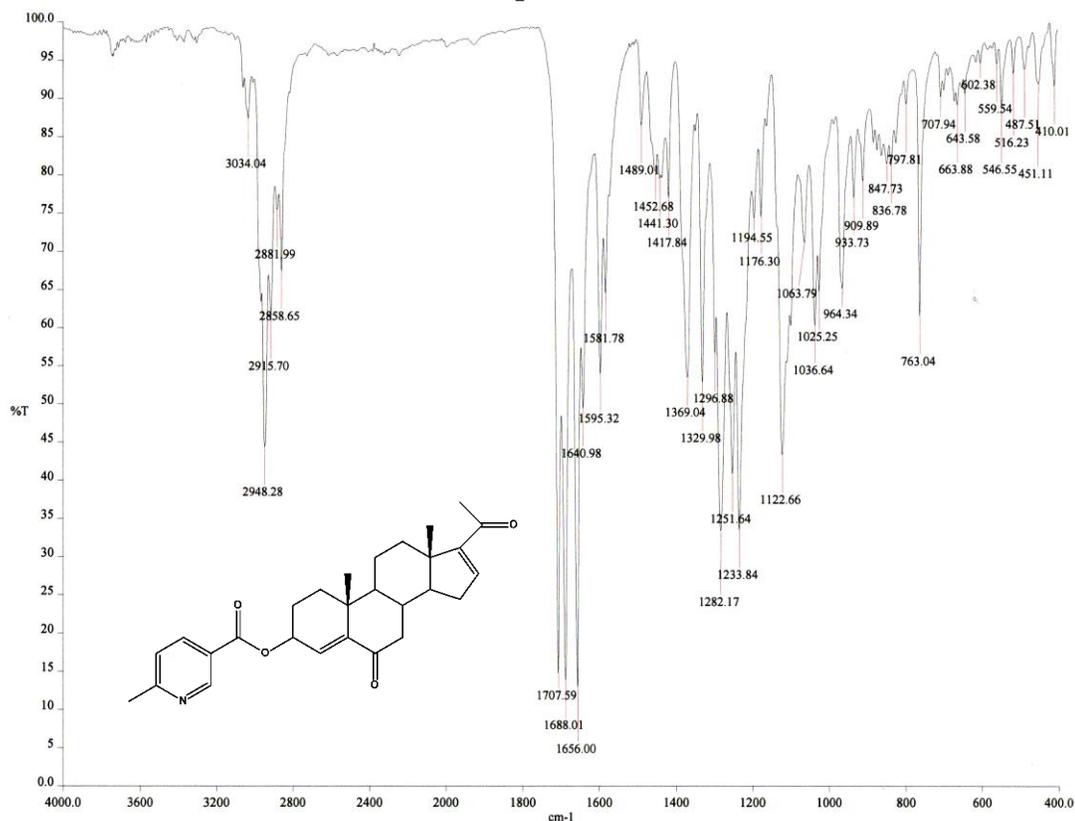


Figura E42. Espectro IR de la 3β-(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (9).

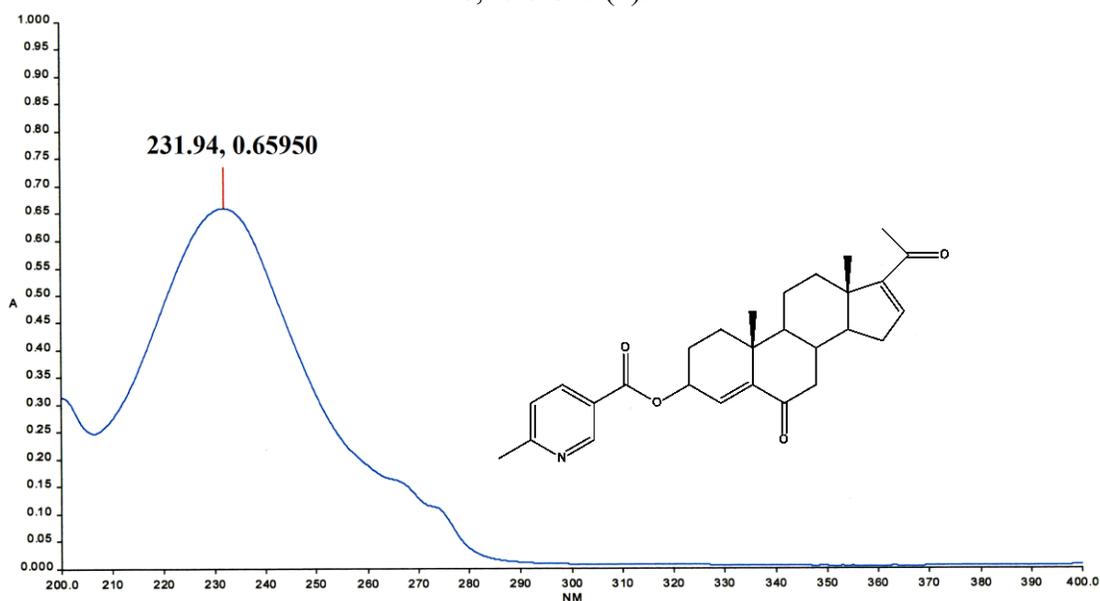


Figura E43. Espectro de UV de la 3β-(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (9).

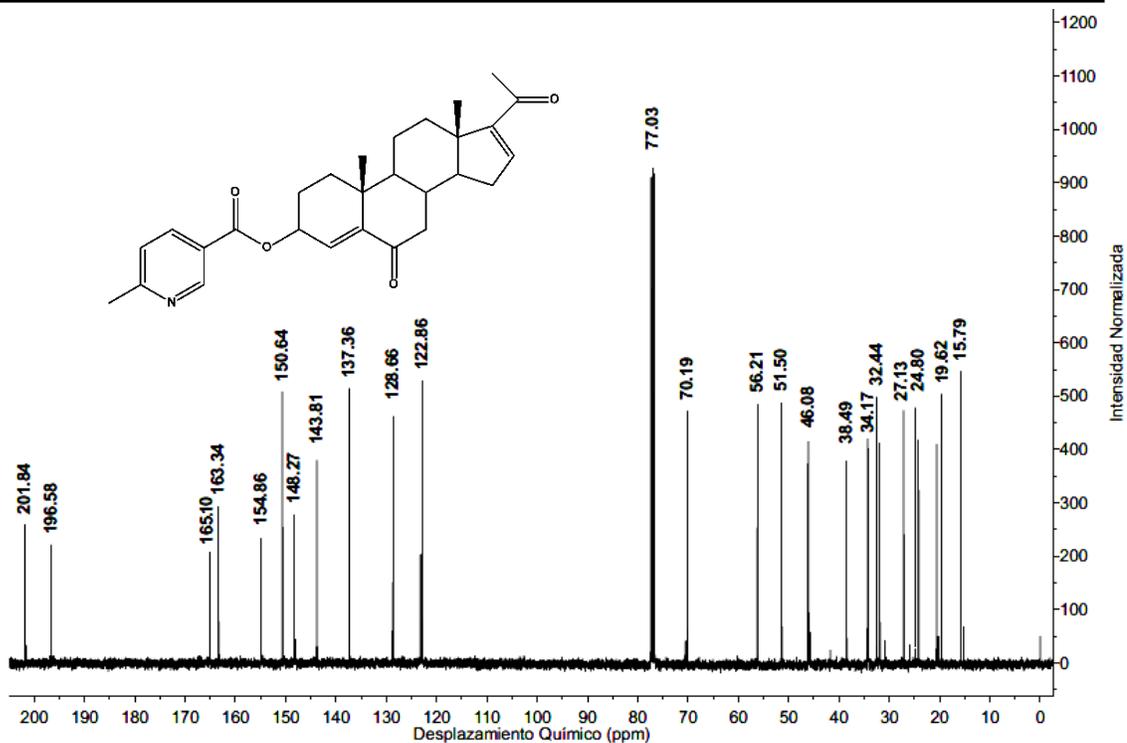


Figura E44. Espectro de RMN-¹³C de la 3β-(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (9).

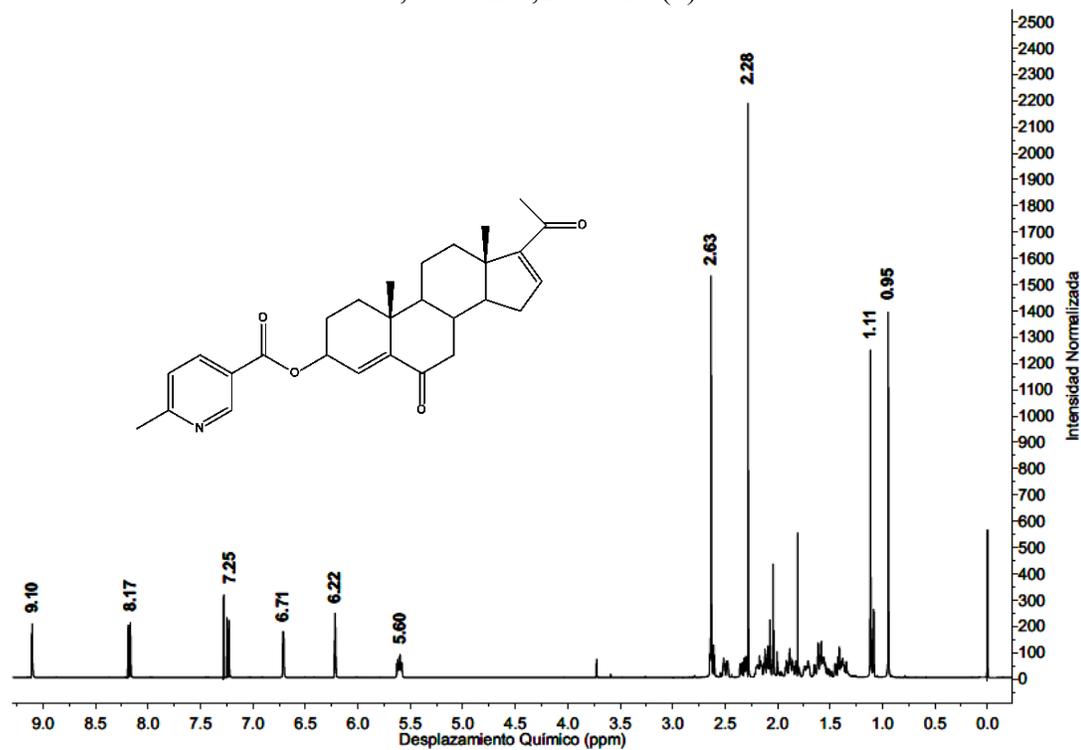


Figura E45. Espectro de RMN-¹H de la 3β-(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (9).

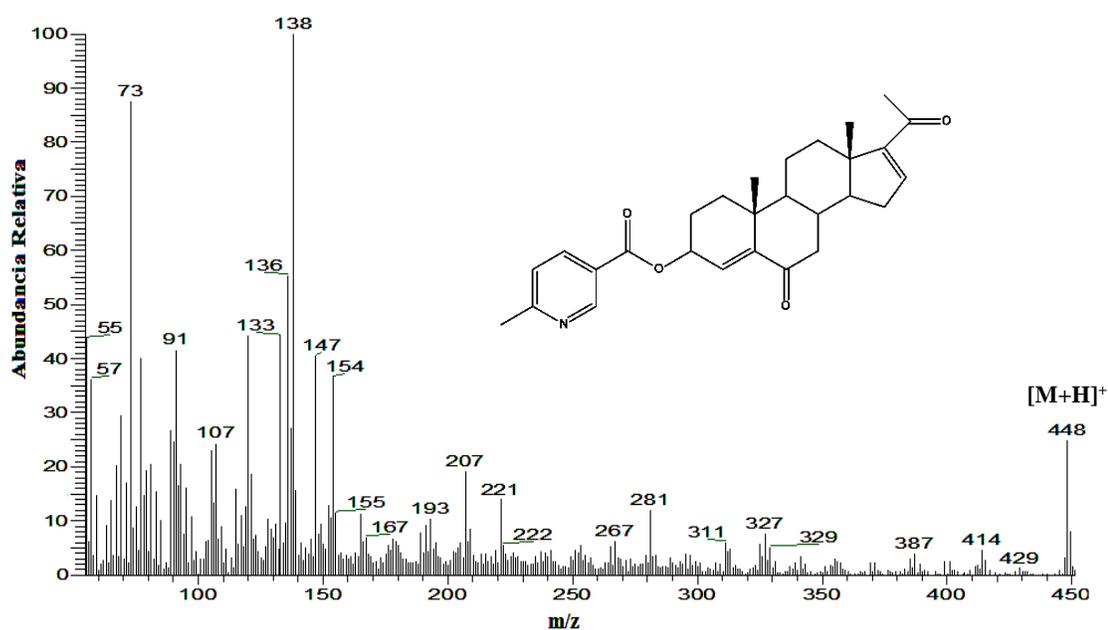


Figura E46. Espectro de masas de la 3β-(6-metil)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**9**).

ESPECTROS DE LA
3β-(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona
Compuesto 10

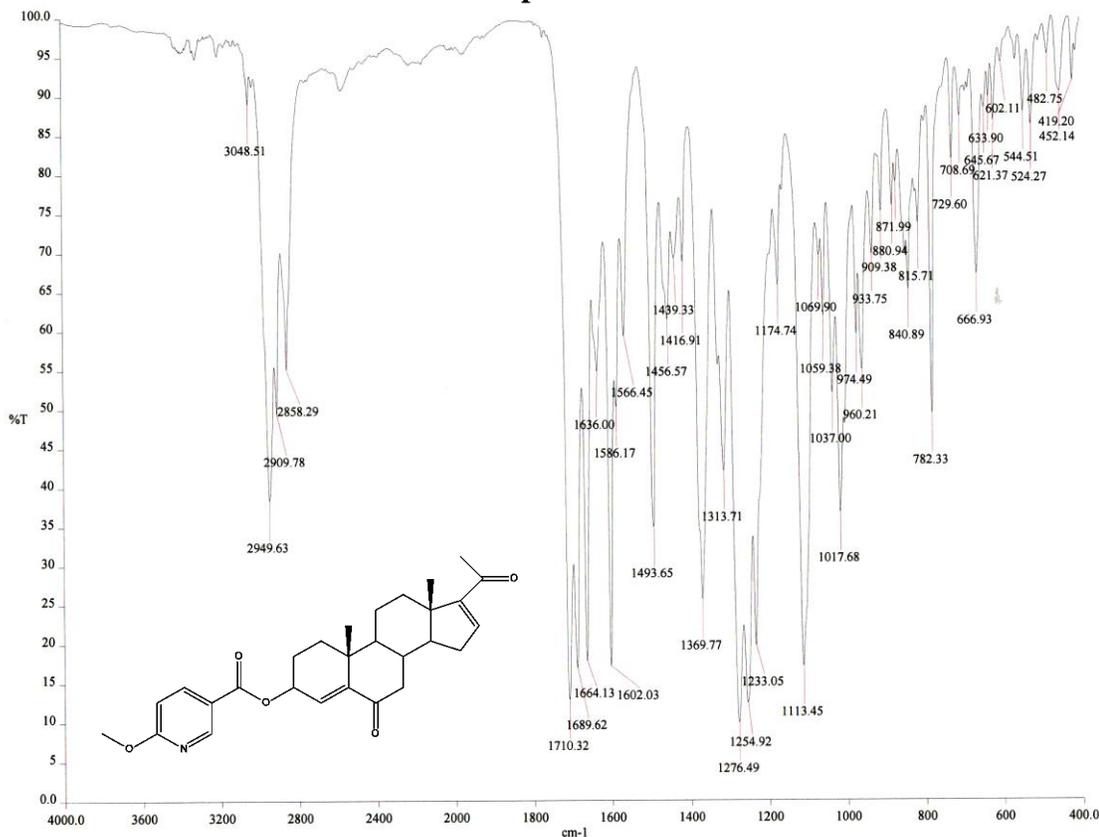


Figura E47. Espectro IR de la 3β-(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (10).

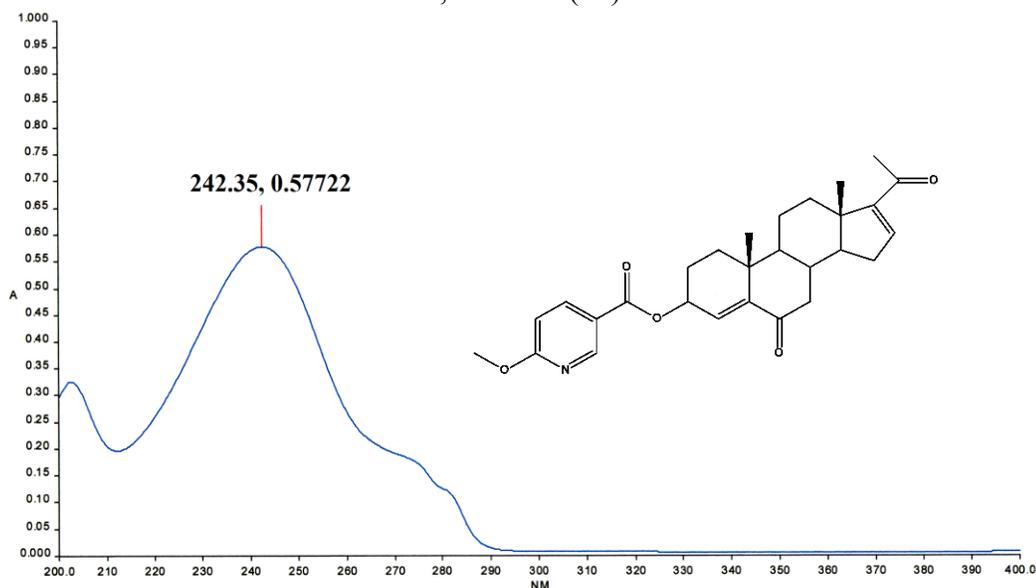


Figura E48. Espectro de UV de la 3β-(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (10).

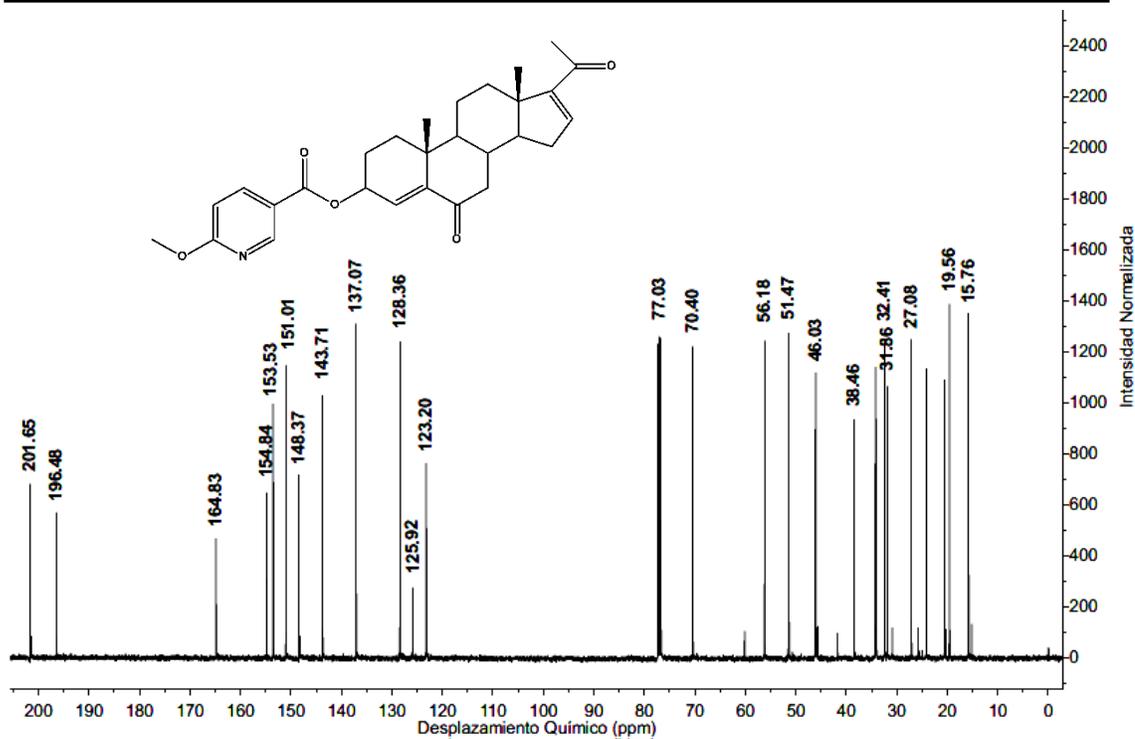


Figura E49. Espectro de RMN-¹³C de la 3β-(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**10**).

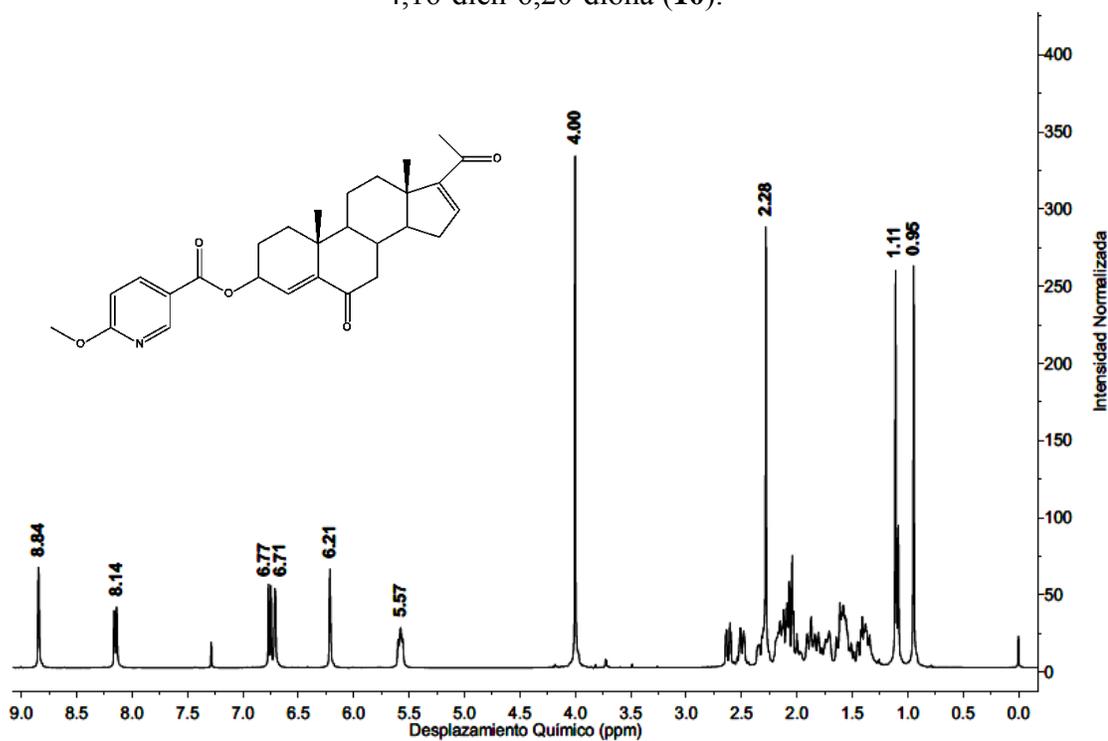


Figura E50. Espectro de RMN-¹H de la 3β-(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**10**).

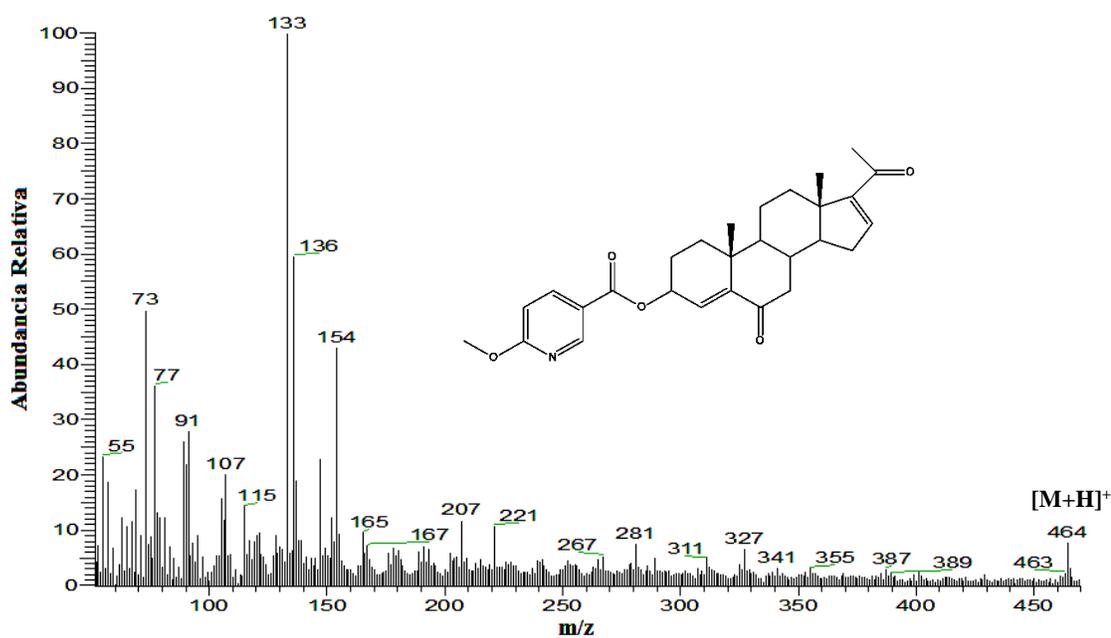


Figura E51. Espectro de masas de la 3β-(6-metoxi)piridil-3-carboxiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**10**).

**ESPECTROS DE LA
3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona
Compuesto 11**

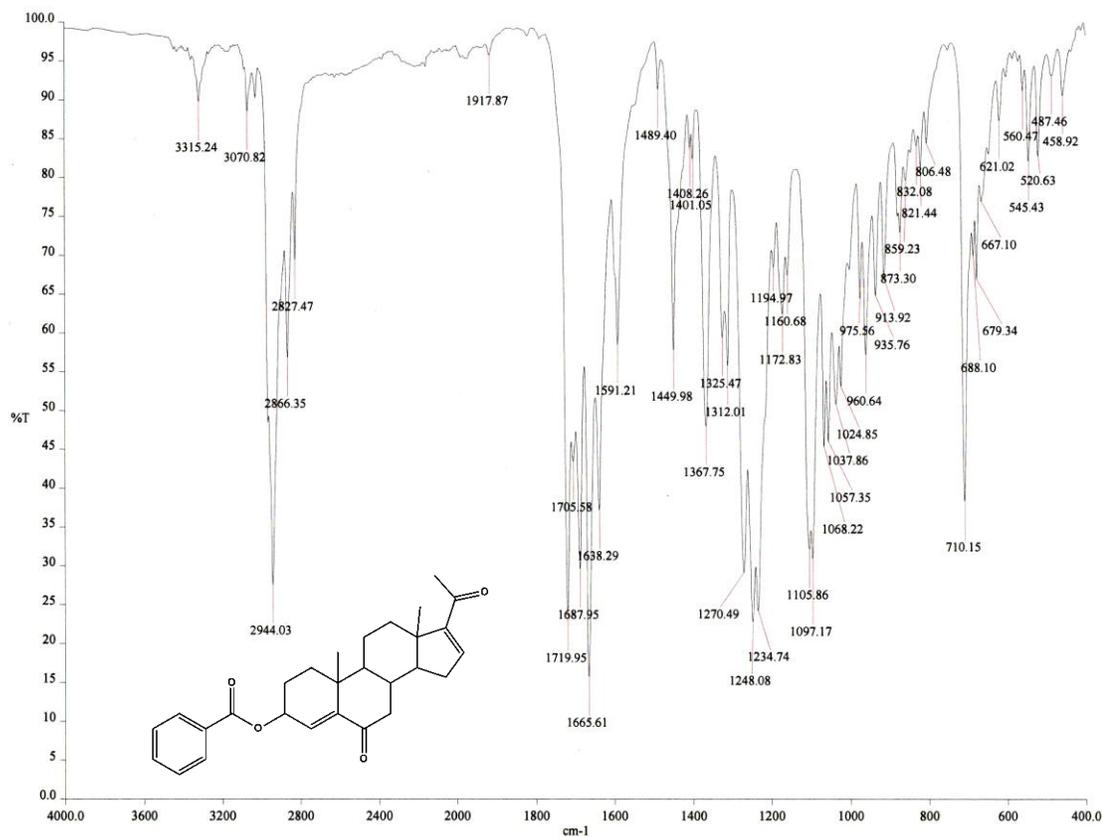


Figura E52. Espectro IR de la 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (11).

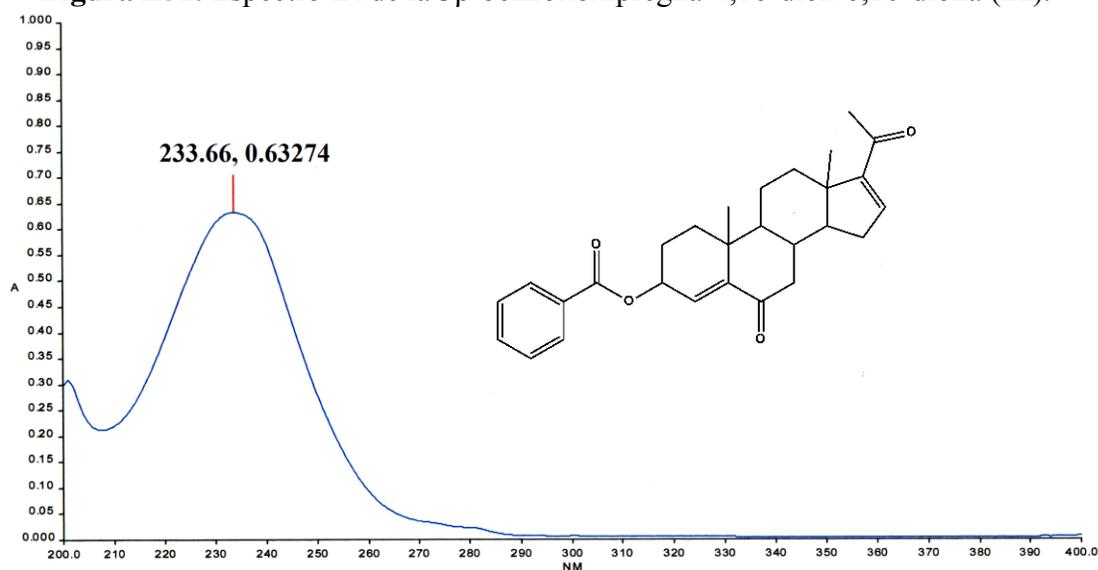


Figura E53. Espectro de UV de la 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (11).

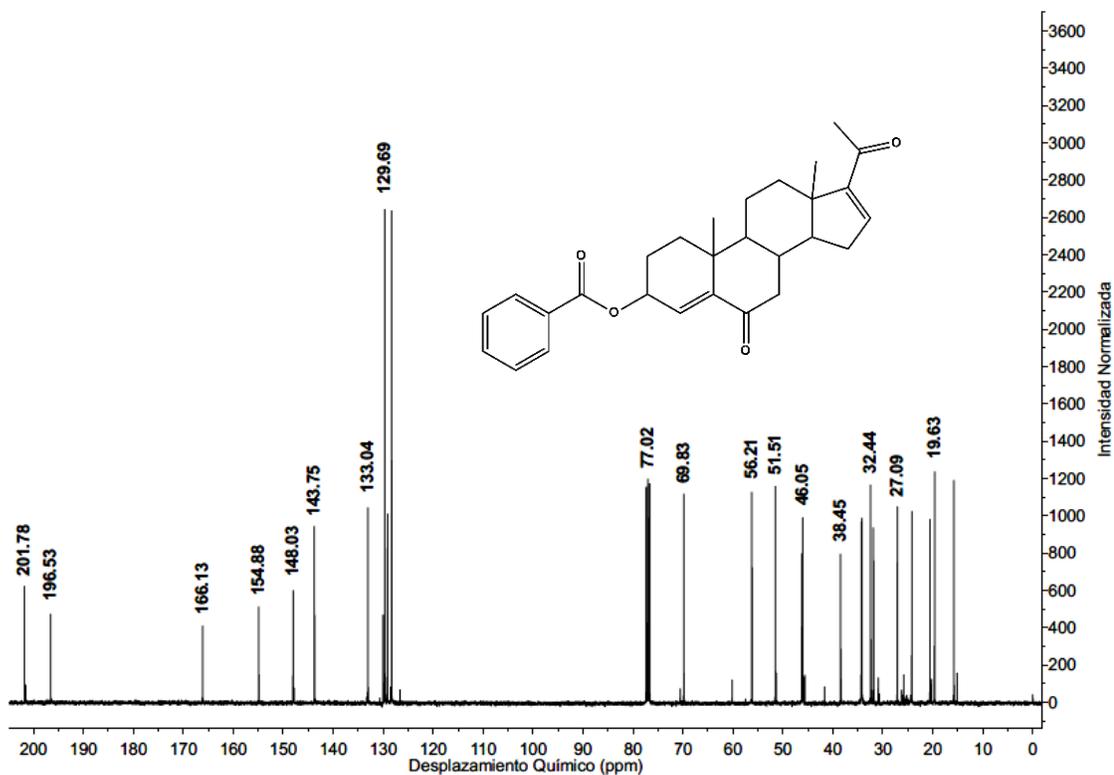


Figura E54. Espectro de RMN- ^{13}C de la 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (11).

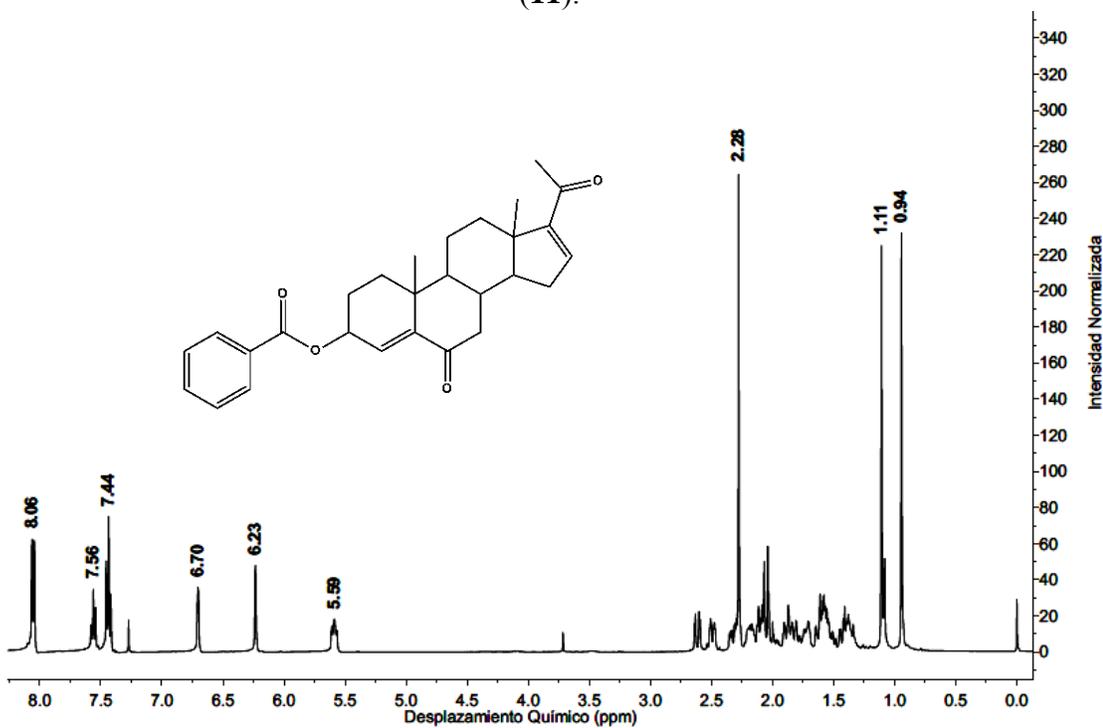


Figura E55. Espectro de RMN- ^1H de la 3 β -benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (11).

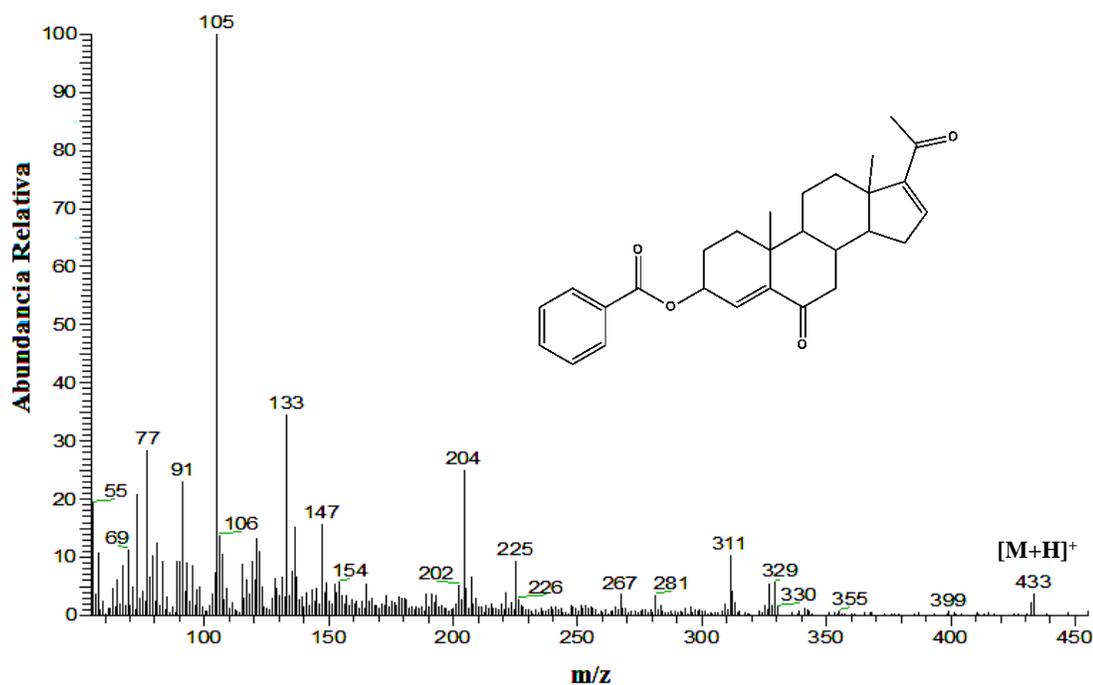


Figura E56. Espectro de masas de la 3β-benzoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**11**).

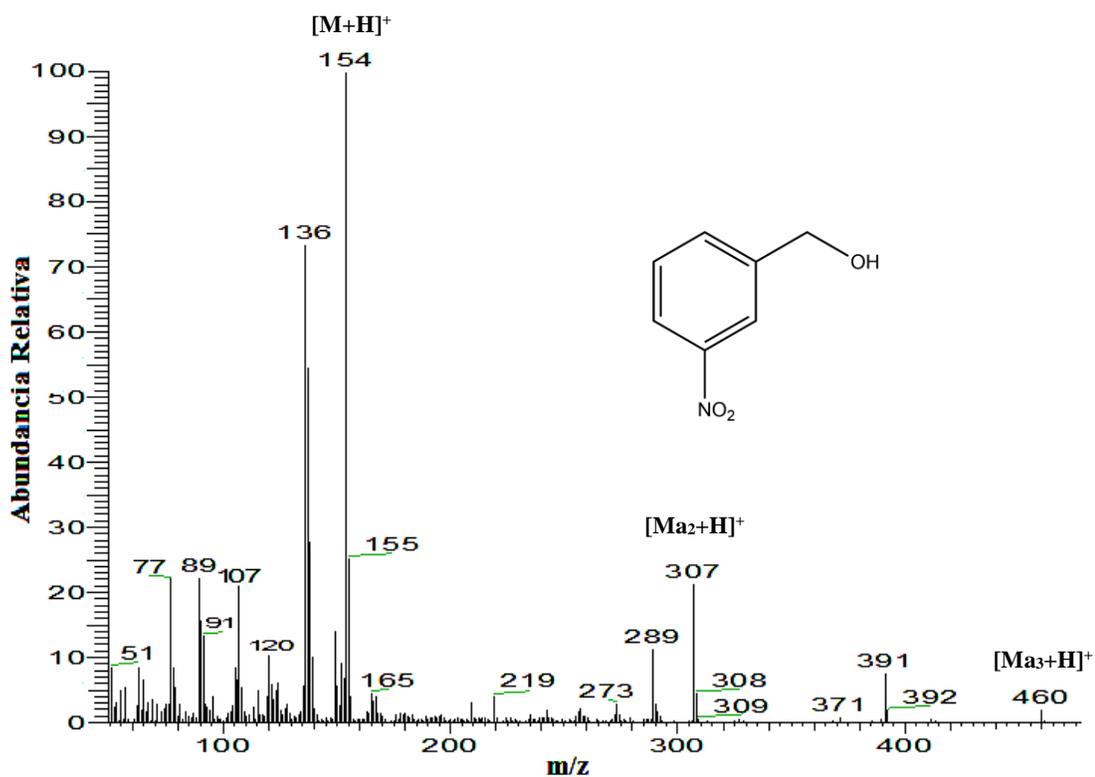


Figura E57. Espectro de masas de la matriz utilizada en EM-FAB (Alcohol nitrobenzénico (ANB: PM=153 uma)).