



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE
DESHIDROEPIANDROSTERONA CON UN GRUPO AZOL EN C-17 Y ÉSTERES
DE CINAMOILO EN C-3”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

Q.F.B. MARÍA EUGENIA MENDOZA JASSO

TUTOR: EUGENE A. BRATOEFF T. †
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

MÉXICO D.F.

ENERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Dr. Gustavo García de la Mora	Presidente
M. en. C. José Manuel Méndez Stivalet	Vocal
Dra. Rosa Luisa Santillán Baca	Vocal
Dr. Rubén Trinidad Sánchez Obregón	Vocal
Dr. José Guillermo Penieres Carrillo	Secretario

LUGAR DÓNDE SE LLEVÓ A CABO EL PROYECTO:

- Laboratorio 125, edificio E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.
- Laboratorio G-006, Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco.
- Unidad de Pruebas Biológicas, Instituto de Química, UNAM.

Asesor:

Dr. Eugene Athanas Bratoeff T. [†]

Sustentante:

Q.F.B. María Eugenia Mendoza Jasso

Parte de los resultados de este proyecto fueron presentados en:

Encuentro académico “QuimiUNAM 2013”, 13-15 de noviembre de 2013, Auditorio “Alfonso Caso”, UNAM, D.F. México. *“Síntesis y evaluación biológica de C-3 cinamoil derivados de deshidroepiandrosterona con un anillo azol en C-17 como potenciales antiandrógenos”* **María Eugenia Mendoza Jasso** y Eugene Bratoeff. Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, México, D.F., México.

10^a Reunión de la Academia de Química Orgánica, 5-9 de mayo de 2014, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí. *“Síntesis de nuevos derivados de Deshidroepiandrosterona con un grupo azol en C-17 y ésteres de ácido cinámico en C-3”*, **María Eugenia Mendoza Jasso** ¹, Marisa Cabeza Salinas ², Eugene A. Bratoeff ¹. ¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, México, D.F., México. ²Departamento de Sistemas Biológicos y Producción Animal, UAM-Xochimilco, 04960, México, D.F., México.

Agradecimientos

A esta Máxima Casa de Estudios y a la H. Facultad de Química por haberme abierto las puertas una vez más.

Al Dr. Eugene Bratoeff [†] por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo, así como su constante apoyo y confianza para la realización y culminación de este proyecto.

A la Dra. Marisa Cabeza Salinas, de la UAM-Xochimilco, por la realización de las pruebas biológicas *in vivo* e *in vitro*.

A la M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apán, del Instituto de Química, UNAM, por la realización de los ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares cancerosas y macrófagos murinos.

Al M. en C. Francisco Cortés Benítez por haber sido un gran guía y un segundo asesor a lo largo de este proyecto, por sus aportaciones para el enriquecimiento del mismo, así como por toda la confianza, paciencia, el apoyo incondicional y sus valiosos consejos.

Al personal de la USAI por la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN-¹H y RMN-¹³C), de infrarrojo (IR) y espectrometría de masas (EM).

A los miembros del jurado que con sus valiosos comentarios enriquecieron el contenido de este trabajo.

Al Dr. Francisco Hernández Luis por sus valiosos comentarios hacia este trabajo así como por el apoyo brindado para finalizar este proceso.

Al Posgrado en Ciencias Químicas por haberme brindado la oportunidad y el apoyo para seguirme desarrollando y creciendo académicamente.

Al proyecto DGAPA (IN211312) y proyecto CONACyT (CB2011/165049) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Agradezco también, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de Maestría (**No. de becario: 273578**).

A la Dra. Elena G. Ramírez López por todo el cariño, la confianza, los valiosos consejos y su valiosa amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 125, por sus consejos, aportaciones, su gran apoyo y su valiosa amistad.

A mi hermana Ceci por apoyarme y aguantarme desde el inicio de esta etapa y a mi niño Alexis por impulsarme a escribir y terminar este trabajo, y por todas sus risas y ocurrencias que me acompañaron mientras escribía.

*A mis padres por ser mi gran fortaleza, por creer en
mí y por su amor incondicional*

A Francisco

Al Dr. Eugene Bratoeff †

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Esteroides y hormonas esteroideas.....	2
2.2. Generalidades sobre los tumores benignos y malignos.....	2
2.3. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) y Cáncer de Próstata (CaP).....	4
2.4. Opciones terapéuticas para el tratamiento de hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata	6
2.4.1. Terapia hormonal.....	7
2.4.1.1. Antagonistas del receptor de andrógenos.....	7
2.4.1.2. Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.....	8
2.4.1.3. Inhibidores del CYP17.....	11
2.4.1.4. Inhibidores de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD).....	15
2.4.1.4.1. Ácido cinámico como inhibidor de la enzima 17 β -HSD tipo 5.....	17
2.5. Hibridación Molecular: técnica de modificación estructural en la Química Farmacéutica.....	18
2.6. Isosterismo y bioisosterismo.....	20
2.7. Derivados de 1,2,4-triazol.....	21
3. Hipótesis.....	24
4. Objetivos.....	25
5. Análisis de Resultados.....	27
5.1. Parte química.....	27
5.1.1. Derivados 3 β -cinamoiloxi-17-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6a-6i).....	32
5.2. Parte biológica.....	36
5.2.1. Estudios <i>in vitro</i>	36
5.2.1.1. Concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀) de los derivados 6a-6i, 7 y 8 sobre la enzima 5 α -reductasa tipo 2 de próstata humana.....	36
5.2.1.2. Ensayo de inhibición de la enzima 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa de los nuevos derivados (6a-6h).....	38
5.2.1.3. Ensayo de citotoxicidad de los nuevos derivados (6a-6i, 7 y 8) y de los intermediarios (4 y 5)	39
5.2.2. Estudios <i>in vivo</i>	42
5.2.2.1. Determinación de la actividad antiandrogénica de los derivados de 1,2,4-triazol.....	42

5.3. Parte computacional.....	45
5.3.1. Modelado molecular.....	45
5.3.2. Análisis de los descriptores QSAR para los derivados de 1,2,4-triazol.....	45
5.3.2.1. PC-3, cáncer de próstata independiente de andrógenos.....	47
5.3.2.2. LNCaP, cáncer de próstata sensible a andrógenos.....	50
6. Conclusiones.....	52
7. Metodología Experimental.....	53
7.1. Reactivos y equipo.....	53
7.2. Descripción de la ruta de síntesis.....	55
7.2.1. Método para la obtención de 3 β -formiloxi-androst-5-en-17-ona (2).....	56
7.2.2. Método para la obtención de 3 β -formiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (3)...	56
7.2.3. Método para la obtención de 3 β -hidroxi- 17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (4).....	57
7.2.4. Método para la obtención de 3 β -hidroxi-17-(1 <i>H</i> - 1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (5).....	58
7.2.5. Método general para la obtención de los derivados 3 β -(cinamoiloxi)-17-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6a-6i).....	58
7.2.6. Método para la obtención de 3 β -hidroxi-17-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (7).....	63
7.2.7. Método para la obtención de 3 β -hidroxi-17-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (8).....	64
7.3. Parte biológica.....	65
7.3.1. Material biológico.....	65
7.3.2. Ensayo <i>in vitro</i> : citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.....	65
7.3.3. Ensayo de viabilidad del macrófago.....	66
7.3.4. Ensayo <i>in vitro</i> : inhibición de la enzima 5 α -reductasa.....	66
7.3.5. Ensayo <i>in vitro</i> : inhibición de la enzima 17 β -HSD.....	68
7.3.6. Ensayo <i>in vivo</i> : determinación del peso de la próstata y de vesículas seminales, y diámetro de la mancha pigmentada en hámsteres castrados.....	68
7.4. Parte computacional.....	69
8. Referencias bibliográficas.....	71
ANEXO: Espectros.....	75

1. Introducción

En México, las enfermedades por tumores malignos son la segunda causa de muerte solo por detrás de la diabetes mellitus; datos de la OMS, de 2008, afirman que en nuestro país el cáncer de próstata se encuentra dentro de los tipos de cáncer más frecuentes. Por otro lado, la hiperplasia prostática benigna (HPB) es una enfermedad que involucra el crecimiento anormal de células del estroma y el epitelio prostático, lo cual resulta en la compresión del canal uretral llevando a la interrupción en el flujo normal de la orina. Ambos padecimientos son favorecidos por el aumento de la dihidrotestosterona (DHT) que es el metabolito de la testosterona obtenido por acción de la enzima 5α -reductasa (5AR). El tratamiento más común para ambos padecimientos es la terapia antiandrogénica, en la que una molécula interviene en la esteroidogénesis y/o antagoniza la función de una hormona en la célula cancerosa, deteniendo su crecimiento y funciones normales. Actualmente, existen compuestos esteroideos (Finasterida® y Dutasterida®) aprobados para su uso clínico que pueden inhibir a la enzima 5AR, lo cual ha sido empleado como una de las estrategias para el tratamiento de hiperplasia prostática benigna.

Las enzimas 17β -hidroxiesteroide-deshidrogenasas (17β -HSDs) están involucradas en la catálisis final de la síntesis de hormonas sexuales y juegan un papel muy importante en la regulación y función hormonal en el humano, ya que se encargan de convertir los 17-cetoesteroides (forma inactiva) a su forma activa (17β -hidroxiesteroides). La 17β -HSD tipo 5 (AKR1C3) se encarga de la conversión de androstenediona a testosterona, así como de la conversión de estrona a 17β -estradiol. Debido a estas razones, esta enzima resulta un blanco terapéutico interesante para el tratamiento de enfermedades hormono-dependientes como lo es el cáncer de próstata (CaP). Hasta la fecha, se han descrito muchos inhibidores de las 17β -HSDs; los fitoestrógenos de la dieta han sido mencionados como buenos inhibidores de las diferentes isoformas de esta enzima, incluyendo la tipo 5. También se han descrito analgésicos no esteroideos (AINES), indometacina, ácido flufenámico y otros relacionados como potentes inhibidores. El grupo de investigación del Dr. Gobec se dio a la tarea de evaluar biológicamente el efecto inhibitorio de ácidos cinámicos sobre AKR1C3, ya que se sabe que muchos de estos compuestos presentan actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, así como propiedades quimiopreventivas y antitumorales.

En el grupo de trabajo del Dr. E. Bratoeff se han desarrollado nuevos derivados esteroideos de la deshidroepiandrosterona (DHEA), que han mostrado actividad antiandrogénica *in vivo* en modelos de hámsteres castrados y, algunos otros, actividad *in vitro* sobre la inhibición del crecimiento de líneas celulares cancerosas de próstata. El presente trabajo está enfocado en la síntesis y evaluación biológica *in vivo* e *in vitro* de nuevos derivados de DHEA que contienen un anillo heterocíclico en el carbono C-17 y cinamatos sustituidos en el carbono C-3 del esqueleto esteroideo; adicionalmente, también se desarrolló un Análisis Cuantitativo de Relación Estructura-Actividad (QSAR por sus siglas en inglés).

2. Antecedentes

2.1. Esteroides y hormonas esteroideas

Los esteroides son moléculas de naturaleza lipídica, derivados del colesterol, que se caracterizan por tener en su estructura el núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno (Figura 2.1) y se encuentran ampliamente distribuidos en los organismos eucariontes, tanto en el reino animal como en el vegetal. Las características funcionales de las moléculas esteroideas están determinadas por la conformación de sus cuatro anillos (A, B, C, D) y la posición relativa de los grupos funcionales en el espacio.^{1,2}

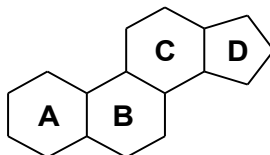


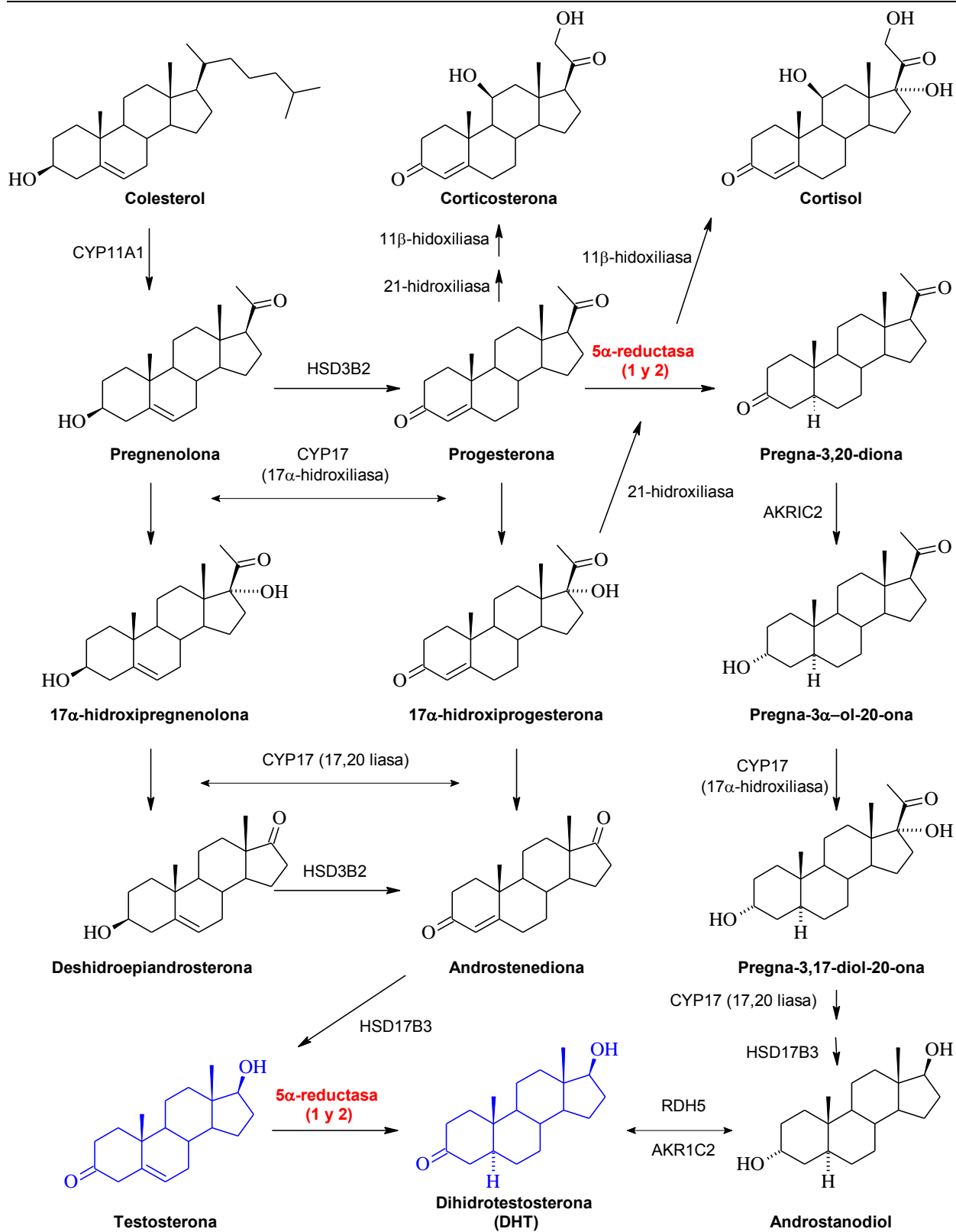
Figura 2.1. Núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno.

Dentro de los esteroides se encuentran las hormonas esteroideas, las cuales son moléculas sintetizadas en el organismo a partir del colesterol (Esquema 2.1) y que se clasifican de acuerdo a su función biológica en: *glucocorticoides*, esenciales para la adaptación al estrés; *mineralocorticoides*, encargados de la regulación del equilibrio normal de sodio y potasio en el organismo; *progestinas*, cuya función principal es el mantenimiento del embarazo y, finalmente, *hormonas sexuales: estrógenos* y *andrógenos*, que definen las características sexuales secundarias femeninas y masculinas, respectivamente. Los efectos fisiológicos varían de un compuesto a otro, su función va desde vitaminas hasta hormonas sexuales.^{1,2}

En el campo de la medicina, los esteroides juegan un papel importante como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer, así como agentes antiinflamatorios. Por ejemplo, el uso de Metiltestosterona (andrógeno) y Tamoxifen (antiestrógeno), para el tratamiento de cáncer de mama, o Finasterida (antiandrógeno) para tratar el cáncer de próstata. La Prednisona, aparte de ser empleada como agente quimioterapéutico, también se emplea como agente antiinflamatorio, al igual que la Dexametasona y Betametasona.³

2.2. Generalidades sobre los tumores benignos y malignos

La promoción y restricción del crecimiento normal de una célula depende de un balance de señales finamente controlado, permitiendo que la proliferación y diferenciación ocurran de una manera ordenada y solo cuando sea necesario. En las células tumorales existen cambios y modificaciones ocasionados por factores internos y/o externos sobre su genoma, provocando una continua proliferación celular, pérdida de diferenciación y una disfunción en el proceso normal de la muerte celular. Los tumores se pueden dividir en dos grandes grupos, tumores benignos y tumores malignos (cáncer): los primeros rara vez son potencialmente mortales; éstos crecen dentro de una cápsula bien definida la cual limita su tamaño, además mantienen las características de la célula de origen y por lo tanto, generalmente, están bien diferenciadas. Por otro lado, los tumores malignos son capaces de invadir tejidos circundantes y



Esquema 2.1. Ruta metabólica de esteroides (adaptado de referencia 7).

extenderse a otras áreas del organismo para generar nuevos crecimientos (metástasis). Algunas de las causas que dan lugar al origen de cáncer son factores genéticos (predisposición genética), carcinógenos químicos, radiaciones ionizantes, infecciones bacterianas y virales, entre otras más.^{3,4}

2.3. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) y Cáncer de Próstata (CaP)

La próstata es una glándula que forma parte del aparato genital y urinario masculino, ésta se encuentra situada inmediatamente debajo de la vejiga, siendo atravesada por el conducto urinario llamado uretra. Su principal función está relacionada con la producción del fluido seminal. En los hombres jóvenes, tiene el tamaño aproximado de una nuez. El aumento en el tamaño de la próstata es muy común después de los 50 años, lo cual puede conllevar al desarrollo de dos enfermedades relacionadas con el crecimiento celular anormal: hiperplasia prostática benigna (HPB) y cáncer de próstata (CaP).^{4,5}

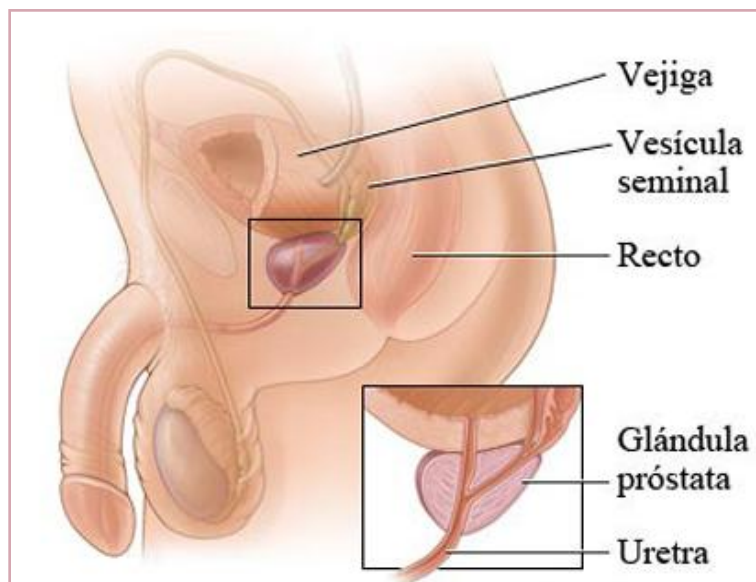


Figura 2.2. Aparato reproductor masculino. Localización de la glándula prostática.

La hiperplasia prostática benigna es una enfermedad que afecta entre el 50 y 80% de los hombres mayores de 50 años. Se caracteriza por un aumento en el tamaño de la glándula prostática, que ocasiona grados variables de obstrucción en la evacuación de la vejiga, así como disfunción renal e infección en tracto urinario. Existe un número considerable de hormonas y factores que influyen en el crecimiento prostático, entre éstos podemos mencionar factores endocrinos (andrógenos, estrógenos), señales neuroendocrinas (serotonina, norepinefrina), entre otros. Se ha descrito que los estrógenos, sinérgicamente con los andrógenos, estimulan el estroma prostático, ya que aumentan el número de receptores de andrógenos favoreciendo así la producción de la 5α -dihidrotestosterona (DHT), a la vez que favorecen la apoptosis.⁶

Los efectos biológicos de la testosterona (T) y DHT son mediados a través del receptor de andrógenos (RA). La DHT, metabolito reducido de la testosterona, es de 3 a 10 veces más potente que la testosterona debido a que se disocia más lentamente del receptor de andrógenos. Existen dos isoformas

del RA reportados, RA-A y RA-B. La isoforma B es la que predomina en la próstata, algunas mutaciones en este receptor están relacionadas con lesiones malignas.^{4,8}

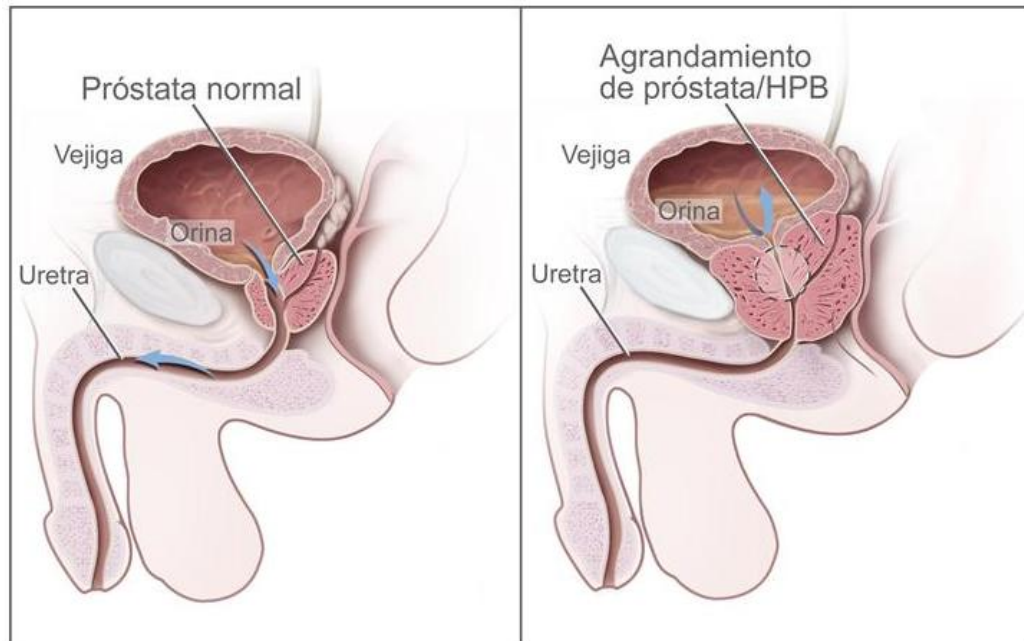
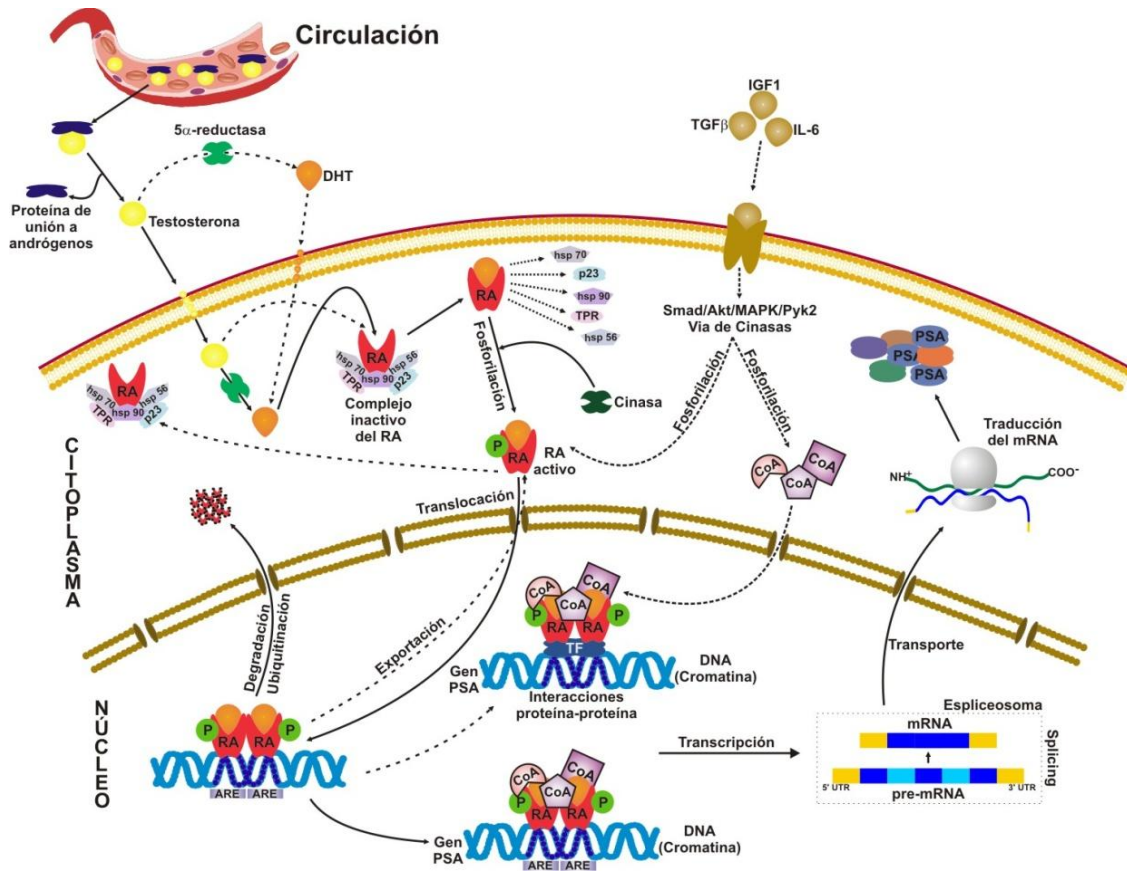


Figura 2.3. Próstata normal (izquierda) e HPB (derecha). Una próstata normal no obstruye el flujo de orina desde la vejiga. El agrandamiento de la próstata ejerce presión sobre la vejiga y uretra, obstruyendo el flujo de orina.²⁰

En la próstata, el efecto de los andrógenos inicia con el transporte de testosterona desde la circulación hacia la glándula. La testosterona es biotransformada a DHT por acción de la enzima 5α -reductasa tipo 2, y transportada por difusión pasiva al citoplasma de la célula epitelial. En el citoplasma, los monómeros del RA están inactivos debido a que se encuentran unidos a proteínas llamadas chaperonas (Hsp). Cuando la DHT, o testosterona, se une al RA éste sufre un cambio conformacional, las chaperonas se disocian y el RA es fosforilado, solo así es translocado al núcleo. En el núcleo, el RA se dimeriza y se une a secuencias específicas del ADN conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ERA), para llevar a cabo la transcripción y posterior síntesis de las proteínas. La estabilidad del RA es mantenida por la fosforilación, ya que se ha demostrado que el factor de crecimiento transformante β (TGF β , por sus siglas en inglés (modulador de apoptosis)), el factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1 (IGF-1) y la interleucina 6 (IL-6) participan aumentando la actividad del RA a través de la fosforilación del mismo receptor o de sus correguladores (CoA) (Esquema 2.2).^{9,10}



Esquema 2.2. Mecanismo de acción del RA en una célula prostática. La testosterona es metabolizada a DHT, en el estroma, por la enzima 5α-reductasa y se transporta por difusión pasiva al citoplasma. Al unirse la DHT al RA, éste sufre un cambio conformacional y la disociación de Hsp; el RA es fosforilado, y el complejo hormona-receptor es translocado al núcleo donde se une a ERAs que inducen la transcripción de proteínas que favorecen la proliferación.⁹

El cáncer de próstata (CaP) es uno de los más comunes entre los hombres de edad avanzada. Es la segunda neoplasia maligna más común y está relacionada con aproximadamente el 10% de las muertes relacionadas con cáncer. En 2012, tan solo en Estados Unidos, se registraron 28,000 muertes relacionadas con este padecimiento. En México, la Secretaría de Salud informa que el 45% de los pacientes con cáncer son varones, siendo el de próstata el que más afecta a esta población.^{11,12}

Las enfermedades prostáticas crónicas requieren de un período largo de desarrollo, es decir, su crecimiento es muy lento, no obstante existen algunos tipos de cáncer de próstata que suelen ser muy agresivos y tienen la capacidad de hacer metástasis, principalmente en los huesos y nódulos linfáticos.^{13,14}

2.4. Opciones terapéuticas para el tratamiento de hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata

Existen diferentes tipos de tratamiento para los pacientes de CaP e HPB. Algunos de éstos son estándar (se emplean en la actualidad) y otros se encuentran bajo investigación clínica. La elección del tratamiento más adecuado es una decisión que involucra tanto al paciente, a su familia, así como al

equipo de atención médica. Algunas de las opciones para el tratamiento de estos padecimientos pueden incluir:^{15,16}

- Cirugía
- Radioterapia
- Criocirugía (crioterapia)
- Quimioterapia
- Terapia hormonal

2.4.1. Terapia hormonal

A la terapia hormonal también se le conoce como *terapia de privación/supresión de andrógenos* (ADT). Los andrógenos son necesarios para la iniciación del CaP, el balance entre estas sustancias químicas induce la proliferación celular y la apoptosis, además de que regula el crecimiento normal de la próstata. En condiciones normales, existe un estado de equilibrio entre la síntesis y la inactivación de andrógenos activos. Un cambio en este balance (síntesis aumentada, inactivación disminuida) puede llevar a una influencia androgénica excesiva y a un incremento en la proliferación celular. La mayoría de los cánceres de próstata se derivan de las células epiteliales secretoras andrógenos-dependientes y, por esta razón, el tratamiento hormonal para estos padecimientos está basado en la modulación de los niveles de testosterona. Esto se puede lograr al suministrar un antagonista hormonal para bloquear la acción de este andrógeno y de su metabolito, DHT, o bien, suprimir la producción de estos andrógenos a través del bloqueo de la enzima responsable de su síntesis. Como se mencionó anteriormente, los principales factores que contribuyen en la proliferación celular de la HPB y el CaP son la sobreproducción de DHT y la sobreexpresión del receptor de andrógenos, este último en el CaP, por lo cual los tratamientos hormonales más exitosos para estos padecimientos son:^{17,18}

- Antagonistas del receptor de andrógenos.
- Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.
- Inhibidores de la enzima CYP17-A1.
- Inhibidores de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD).

2.4.1.1. Antagonistas del receptor de andrógenos

Los antagonistas de andrógenos se unen al receptor evitando así la unión de los esteroides naturales al mismo, pero estos antagonistas no producen el cambio conformacional correcto en el receptor que es esencial para obtener los cambios normales en la expresión de los genes. El Acetato de Ciproterona es un antiandrógeno de naturaleza esteroidea que, en un principio, fue empleado como anticonceptivo, posteriormente se identificó como un inhibidor competitivo del RA. La Flutamida fue el primer antiandrógeno no esteroideo encontrado. Este fármaco en sí no actúa sobre el RA, pero es metabolizado vía hidroxilación para dar lugar a especies activas. Este metabolito inhibe la captación y unión de los andrógenos a sus receptores en los tejidos diana. Otros antiandrógenos no esteroideos de uso clínico para el tratamiento de CaP son la Bicalutamida y la Nilutamida, los cuales tienen un mayor tiempo de vida media en comparación con la Flutamida, lo que lleva a la administración de una sola dosis al día (Figura 2.4). Los antiandrógenos también son empleados en el tratamiento de la HPB.¹⁹

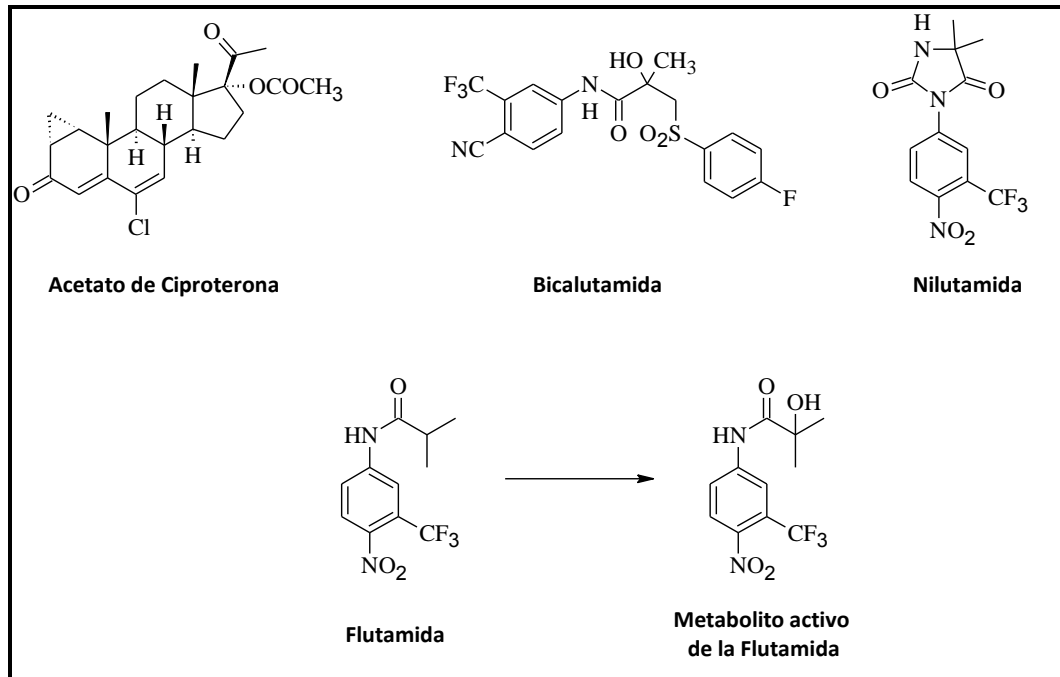


Figura 2.4. Estructuras de algunos antagonistas esteroidales y no esteroidales del receptor de andrógenos.¹⁹

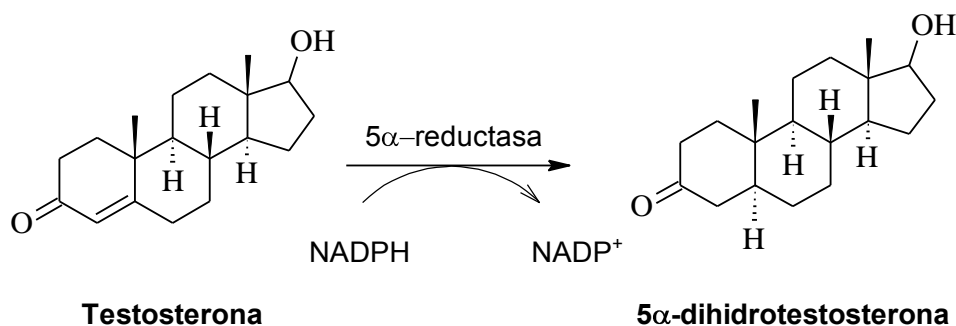
2.4.1.2. Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa

Hasta la fecha se ha descrito la existencia de tres isoformas de la enzima 5 α -reductasa: tipo 1 (5AR-1) la cual se expresa principalmente en folículo capilar, piel e hígado y es codificada por el gen *SRD5A1*; tipo 2 (5AR-2), codificada por el gen *SRD5A2*, se expresa principalmente en próstata, vesículas seminales, epidídimo y, en menor medida, en hígado. La isoenzima tipo 3 (5AR-3) ha sido recientemente hallada y descrita en cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC). En mamíferos es ubicua, es decir, también se ha encontrado en tejidos no androgénicos tales como páncreas y cerebro. La Tabla 2.1 muestra algunas propiedades de las isoenzimas 1 y 2.^{4,21}

Las isoformas 1 y 2 de la enzima 5AR son proteínas microsomales unidas a la membrana que actúan mediante la reducción del doble enlace entre los C4-C5 de esteroides con 19 y 21 carbonos, como la testosterona y la progesterona, respectivamente. Principalmente, estas proteínas catalizan la reducción de testosterona dependiente de NADPH a su metabolito más potente, la 5 α -dihidrotestosterona (DHT) (Figura 2.5). La enzima 5AR actúa mediante la donación directa de un hidruro por parte del cofactor NADPH a la cara alfa de la testosterona; una vez que la enona ha sido activada por una interacción electrostática entre la enzima y la testosterona, el enolato generado es estabilizado por la enzima y subsecuentemente es protonado para generar la 5 α -DHT. Cabe mencionar que ninguna isoforma se ha logrado purificar, esto debido a su naturaleza inestable, por lo que sus inhibidores han sido diseñados mediante diseños basados en ligandos.^{21,23}

Tabla 2.1. Propiedades de la enzima 5 α -reductasa (isoenzimas 1 y 2).²¹

Propiedades	5AR-1	5AR-2
Tamaño	259 aminoácidos	254 aminoácidos
Peso molecular	29.5 kDa	28.4 kDa
pH óptimo	6-8.5	5-5.5
Estado bioquímico	Hidrofóbico	Hidrofóbico
Distribución tisular	Hígado, piel, cerebro, ovarios, próstata, testículos.	Próstata, epidídimo, vesículas seminales, útero, pecho, folículo capilar, placenta, testículos.
Expresión en próstata	Baja (normal), alta en HPB y cáncer.	Alta en normal e HPB, baja en cáncer.
Gen que la codifica	<i>SRD5A1</i>	<i>SRD5A2</i>
Localización cromosómica	5p15	2p23


Figura 2.5. Síntesis de 5 α -DHT a partir de testosterona por acción de la enzima 5 α -reductasa.²³

Los azaesteroides son esteroides químicamente modificados en los cuales un átomo de carbono es sustituido por un átomo de nitrógeno; se ha encontrado que este tipo de moléculas son capaces de inhibir la actividad de la enzima 5AR. Los dos azaesteroides aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de HPB y CaP son la Finasterida y la Dutasterida (Figura 2.6), ambos actúan vía inhibición competitiva.^{21,22}

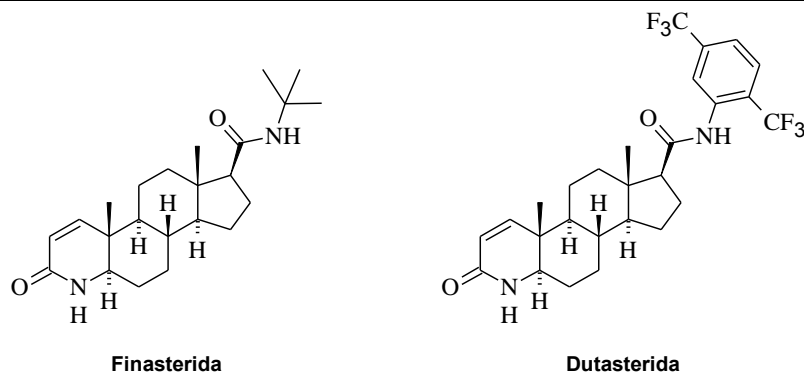
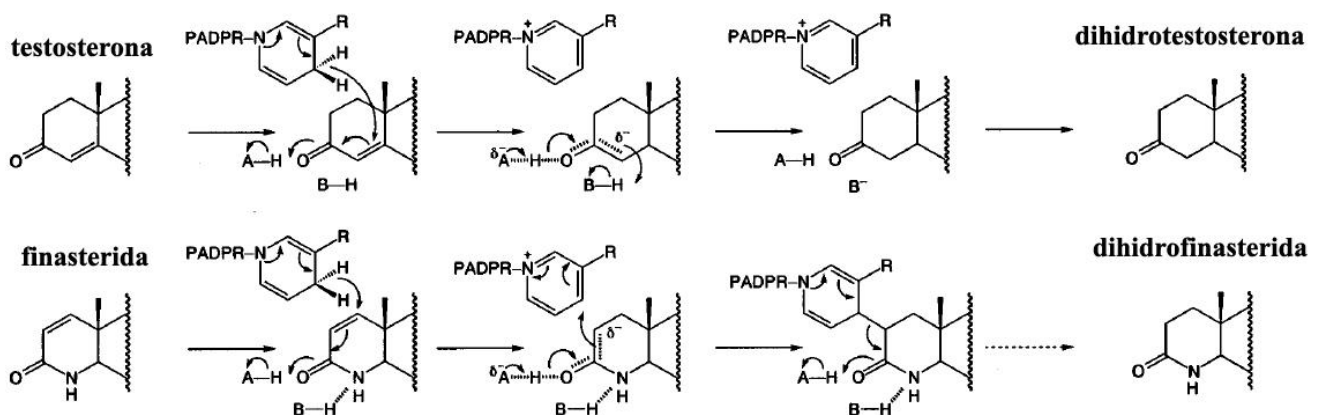


Figura 2.6. Estructura química de Finasterida y Dutasterida; fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de HPB y CaP.

La Finasterida (Proscar[®]) fue uno de los primeros inhibidores de esta enzima en llegar al mercado. Es considerado como un inhibidor selectivo de la isoforma 2; se une un 90% a proteínas plasmáticas y sufre un amplio metabolismo hepático, principalmente por CYP3A4, llevando a metabolitos inactivos, los cuales son eliminados a través de la bilis y la orina. Su biodisponibilidad es del 63%. Se ha encontrado que disminuye los niveles de DHT en suero en un 85% y en próstata en un 90%. La DHT remanente es sintetizada por acción de la isoforma 1, a la cual no es capaz de inhibir. Por otro lado, la Dutasterida (Avodart[®]) es un inhibidor no selectivo de ambas isoenzimas; comparado con la Finasterida, tiene un tiempo de vida media mayor, se une completamente a proteínas plasmáticas y es 60 veces más potente. También sufre un metabolismo primario por parte de CYP3A4 y reduce los niveles de DHT en suero en un 95%. Algunos de los efectos adversos que provocan estos fármacos son disfunción eréctil, disminución de la libido, impotencia sexual, entre otros.^{21,22} El mecanismo de inhibición propuesto se ilustra en el Esquema 2.3, en donde en el último paso, a diferencia de la testosterona, en la Finasterida ya no se lleva a cabo la transferencia de protón de un residuo de la enzima (letra B) al carbanión, lo que promueve la formación de un aducto entre el NADPH y el anillo lactámico.²⁴



Esquema 2.3. Mecanismo de inhibición de la enzima 5 α -reductasa por acción de la Finasterida (PADPR= fosfoadenosin difosforibosa).²⁴

Se ha estudiado también el farmacóforo y una Relación Estructura-Actividad (SAR, por sus siglas en inglés) de una serie de azaesteroides para determinar los requerimientos necesarios para la inhibición de la enzima 5AR, los cuales se ilustran en la siguiente figura (Figura 2.7).^{4,25}

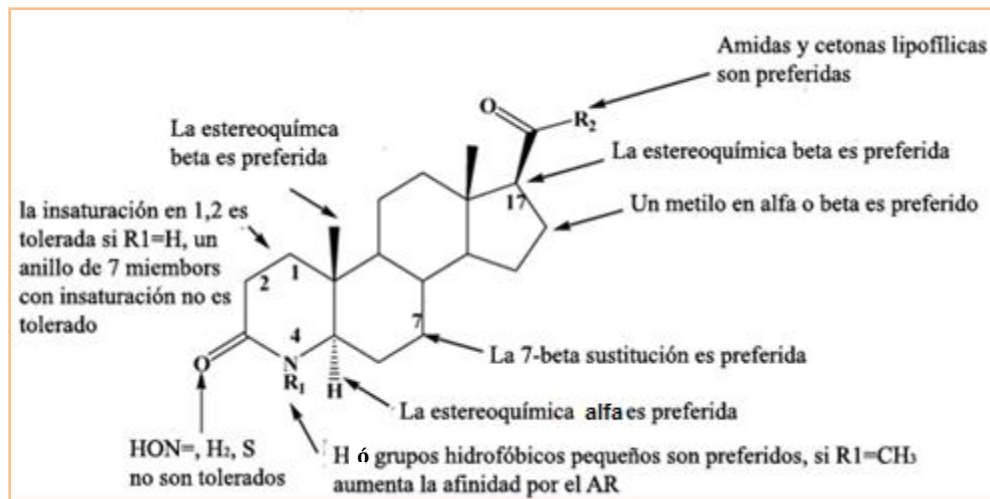


Figura 2.7. Relación Estructura-Actividad (SAR) de los azaesteroides.²⁵

2.4.1.3. Inhibidores del CYP17

Desde la década de los 60's se ha descrito al complejo P450 (CYP) como una familia de enzimas localizadas predominantemente en el hígado, cuya función principal es el metabolismo de fármacos y otros xenobióticos. Sin embargo, también se sabe que este complejo enzimático está involucrado en funciones celulares tales como el metabolismo de eicosanoides, biosíntesis de colesterol y ácidos biliares, síntesis y metabolismo de esteroides y, aún en estos tiempos, existen algunas enzimas CYP de las cuales se desconoce su función. Las mutaciones en los genes *CYP* son responsables de errores congénitos en el metabolismo, los cuales contribuyen a severas enfermedades clínicas.²⁶

Los citocromos P450 esteroideogénicos son un grupo único de enzimas responsables de la síntesis de hormonas vitales para la reproducción, manejo del estrés y control del balance electrolítico en el cuerpo. Estas enzimas catalizan la biosíntesis de mineralocorticoides, glucocorticoesteroides y andrógenos y, aunque estos citocromos esteroideogénicos comparten un mecanismo de reacción común con sus homólogos en órganos como hígado y pulmón, son sustancialmente órgano-específicos. Dentro de este ámbito, el CYP17A1 (también conocido como P450c17 y P450-17A1) presenta al menos dos actividades catalíticas diferentes: reacción 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa sobre C20-esteroides, colocando a esta enzima en un punto de ramificación clave en la biosíntesis de aldosterona, cortisol y andrógenos.^{27,28}

La enzima CYP17A1 es una monooxigenasa ubicada en retículo endoplásmico de la glándula adrenal, testículos, placenta y ovarios, contiene 508 aminoácidos con un grupo prostético hemo en su sitio activo. Su actividad 17 α -hidroxilasa cataliza la producción de glucocorticoides (cortisol) mientras que su actividad 17,20-liasa permite la biosíntesis de esteroides sexuales. De manera específica, esta enzima actúa sobre pregnenolona y progesterona; la 17 α -hidroxilación de ambos esteroides da lugar a 17 α -hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesterona, respectivamente. La reacción 17,20-liasa rompe el

grupo acetilo en el carbono 17 del anillo D del esteroide para convertir los intermediarios hidroxilados a deshidroepiandrosterona (DHEA) o androstenediona. La actividad catalítica de esta enzima es modulada por el citocromo b_5 , el cual juega un papel importante en la regulación intracelular en la biosíntesis de andrógenos. Se ha observado que el citocromo b_5 estimula, principalmente, la actividad 17,20-liasas (de 5 a 10 veces) de CYP17A1, no afectando la reacción de 17α -hidroxilación. Esta enzima es una diana importante para el tratamiento de cáncer de próstata y mama que proliferan en respuesta a la producción de andrógenos y estrógenos.²⁷⁻²⁹

En los últimos 50 años se ha previsto la importancia de la inhibición del CYP17A1 debido al paso catalítico que es crítico en la biosíntesis de todos los andrógenos y su consecuente aplicación en el tratamiento de enfermedades dependientes de andrógenos, como el cáncer de próstata. Generalmente, los inhibidores de CYP17A1 se han clasificado estructuralmente como esteroideos y no esteroideos. Los inhibidores esteroideos son similares a los sustratos naturales (pregnenolona y progesterona), sin embargo, tienen modificaciones en el anillo D, específicamente en el carbono C-17. Dentro de los inhibidores esteroideos se pueden clasificar a los inhibidores competitivos tipo 1 y tipo 2 que se distinguen en el modo de unión al sitio activo de la enzima. Los inhibidores tipo 1 desplazan el agua e interactúan con el hierro del grupo hemo permitiendo que este átomo exista en un estado pentacoordinado, esto induce un desplazamiento en el máximo de absorción del espectro UV entre 420nm y 390nm. Los inhibidores competitivos tipo 2 interactúan con el átomo de hierro en el grupo Hemo sin desplazar al agua teniendo este átomo en un estado hexacoordinado, además de que también interactúan con los aminoácidos cercanos a este grupo prostético, teniendo desplazamiento en el máximo de absorción en el espectro de UV entre 421-430nm.²⁸

El primer inhibidor del CYP17 fue el Ketoconazol (que aún es empleado en el tratamiento de cáncer prostático resistente a la castración), sin embargo, el uso de este fármaco ha sido limitado debido a su inespecificidad, ya que inhibe a otras enzimas de la familia del citocromo P450, como el CYP3A y el CYP24A1; lo que genera hepatotoxicidad, toxicidad gastrointestinal e insuficiencia renal (Figura 2.8).³⁰

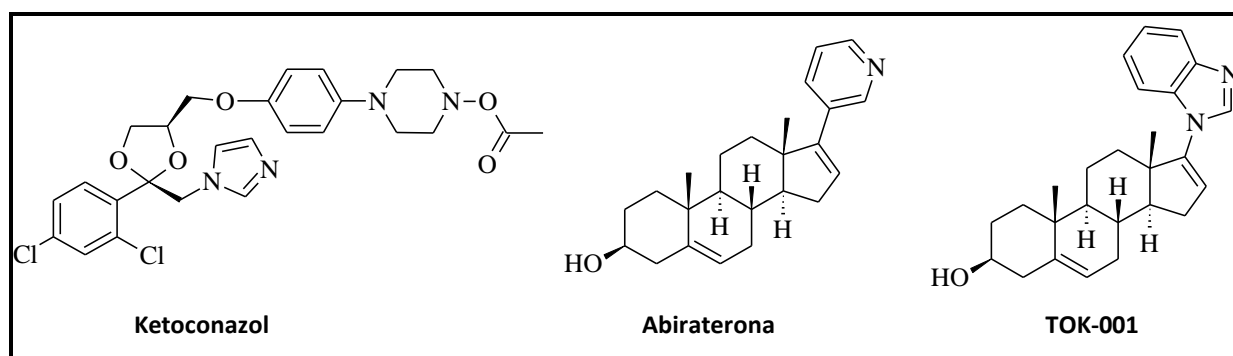


Figura 2.8. Inhibidores del CYP17.

La Abiraterona es un fármaco recientemente aprobado por la FDA y es tal vez uno de los antiandrógenos más exitosos en la actualidad, ya que a diferencia del Ketoconazol, si es selectivo hacia la enzima CYP17; este fármaco disminuye los niveles de estradiol, deshidroepiandrosterona y androstenediona. Debido a su pobre biodisponibilidad, la Abiraterona se comercializa como el profármaco

acetilado en el carbono C-3 (acetato de Abiraterona) que es rápidamente desacetilado *in vivo* a su metabolito activo.⁷

Recientemente se elucidó por cristalografía de rayos X la interacción de la Abiraterona y del TOK-001 con el CYP17 (Figura 2.9), observándose que uno de los nitrógenos del heterociclo (nitrógeno del grupo piridina para la Abiraterona y del benzimidazol para TOK-001) forma un enlace covalente coordinado (distancia de 2.2 Å) con el hierro del grupo hemo, así como la formación de un puente de hidrógeno entre el hidroxilo en C-3 y la asparagina 202 (N202) de la hélice F (distancia de 2.6 Å para la Abiraterona y 2.4 Å para TOK-001).²⁸

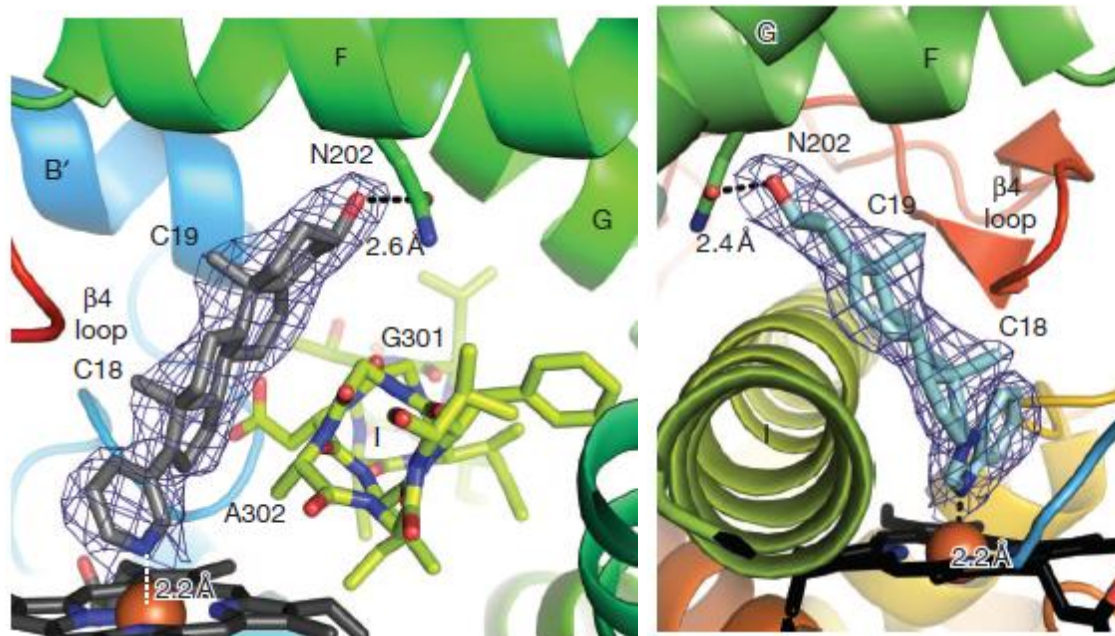
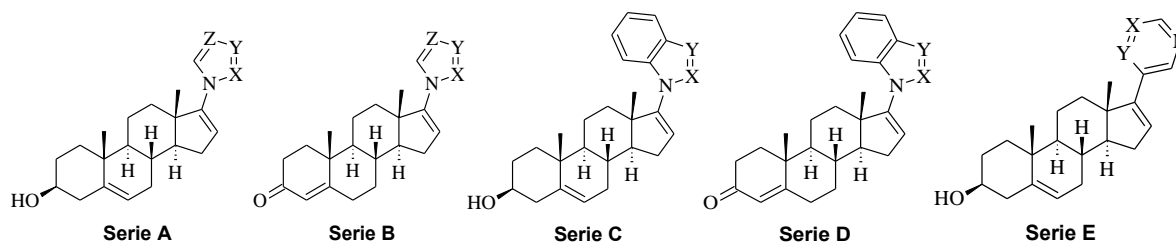


Figura 2.9. Interacción de la Abiraterona y el TOK-001 con la enzima CYP17.²⁸

En el grupo de trabajo del Dr. Njar se ha desarrollado una amplia gama de compuestos con la finalidad de inhibir a la enzima CYP17. Estos compuestos cuentan con el esqueleto de androstano y un heterociclo en el carbono C-17, y se ha observado la importancia de la posición y el número de átomos de nitrógeno del heterociclo en C-17. En la Tabla 2.2 se muestra el porcentaje de inhibición de esta enzima de algunos de los derivados obtenidos por el Dr. Njar.^{45,46}

Tabla 2.2. Inhibición de la enzima CYP17, 5 α -reductasa y receptor de andrógenos por parte de algunos derivados desarrollados por el grupo del Dr. Njar.^{45,46}



Serie/compuesto	X	Y	Z	CYP17 (CI ₅₀ nM)	% Inhibición de la 5 α - Reductasa a 10 μ M y [CI ₅₀ (nM)]	Unión al receptor androgénico. (CI ₅₀ nM)	
						LNCaP	PC-3 AR
Serie A							
I	N	C	N	90 \pm 14	SA	-	-
II	C	N	C	8 \pm 1.0	SA	-	-
III	N	N	C	13 \pm 1.0	SA	-	-
Serie B							
IV	N	C	N	55 \pm 11	[152 \pm 10 nM]	-	-
V	C	N	C	7 \pm 1	[142 \pm 5 nM]	-	-
VI	N	N	C	19 \pm 1	[198 \pm 33 nM]	-	-
Serie C							
VII	N	N	-	1250.0	17%	-	-
VIII (TOK-001)	C	N	-	300.0	53%	845	384
Serie D							
IX	N	N	-	5817.4	56%	-	-
X	C	N	-	915.0	[480 nM]	1200	242
Serie E							
XI	N	C	-	3810.0	-	-	366
XII	C	N	-	500.0	-	-	374
Abiraterona	-	-	-	800.0	-	-	-
Ketoconazol	-	-	-	1100.0	-	-	-
Flutamida	-	-	-	-	-	11600	10985

SA= sin actividad

Asimismo, Njar y colaboradores publicaron un modelo farmacofórico tridimensional a través del modelado molecular (Figura 2.10), en el cual encontraron los requerimientos necesarios de derivados de androstano para la unión con CYP17. Este modelo destaca la presencia de tres regiones hidrofóbicas (esferas color azul) y dos zonas aceptoras de puentes de hidrógeno (esferas color verde).⁶⁴

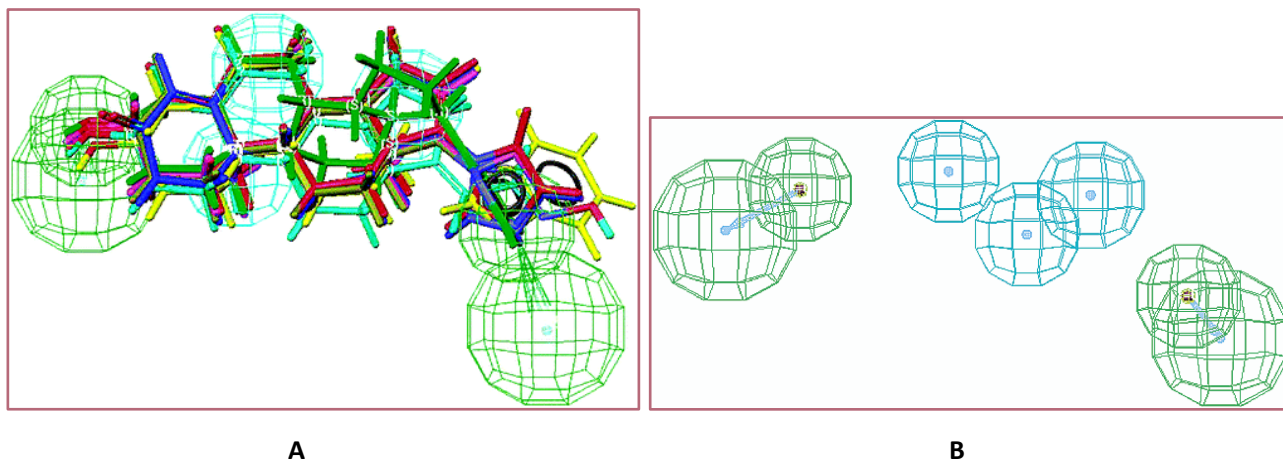
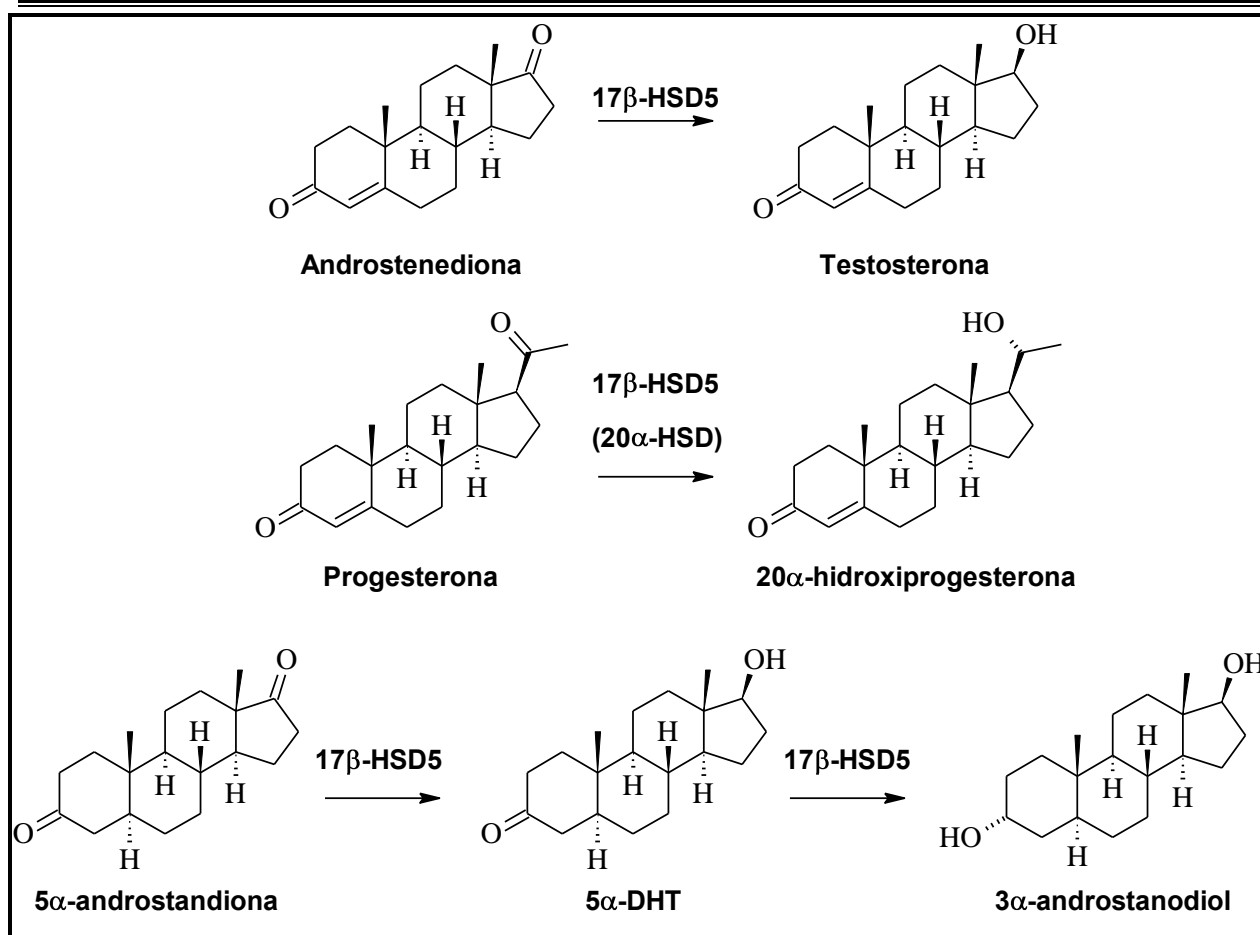


Figura 2.10. A) Superposición de derivados esteroideos inhibidores de CYP17; **B)** Modelo farmacofórico con comunes en los derivados esteroideos con un grupo azol. Las esferas azules denotan las regiones hidrofóbicas, mientras que las esferas verdes indican zonas capaces de aceptar puentes de hidrógeno. ⁶⁴

2.4.1.4. Inhibidores de la enzima 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (17 β -HSD)

La enzima 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (17 β -HSD, por sus siglas en inglés) controla el último paso de síntesis de todos los andrógenos y estrógenos. Estas enzimas son oxidoreductasas que comprenden dos familias: deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDRs, por sus siglas en inglés) y aldo-ceto reductasas (AKRs, por sus siglas en inglés). Hasta la fecha se han identificado 15 isoformas de la 17 β -HSD, siendo la tipo 5 la única AKR. Las hormonas son los principales sustratos de estas enzimas y, a pesar de que su mayor función radica en la oxidación o reducción de la posición 17 del núcleo esteroidal, también son capaces de llevar transformaciones de múltiples sustratos en la posición C-3 del esteroide. Entre ellas guardan un tamaño similar (250-350 aminoácidos), además todas requieren NADP⁺ o NADPH como cofactor para llevar a cabo su función oxidativa o reductora, respectivamente. La isoenzima 3 cataliza la formación de testosterona a partir de androstenediona en testículos mientras que la isoenzima 5 hace lo mismo pero en los tejidos periféricos como la próstata. Por tal motivo, la isoenzima 5 resulta de suma importancia como diana biológica para el tratamiento del CaP. ³¹⁻³³

La enzima 17 β -HSD tipo 5, también conocida como AKR1C3, es una enzima multifuncional con actividad 3 α - y 20 α -reductasa, incluyendo la conversión de DHT a 3 α -androstanol, y progesterona a 20 α -hidroxiprogestero (Esquema 2.4). Los productos de estas reacciones son promotores del crecimiento tumoral. Esta enzima también está involucrada en el desarrollo de CPRC a través de la formación intratumoral de testosterona. Incluso muchos estudios han demostrado que en la próstata, la síntesis de andrógenos biológicamente activos procede vía AKR1C3 y que en cáncer de próstata está sobre-expresada. ^{34,35}



Esquema 2.4. Actividad de 17β-HSD5 (AKR1C3).³¹

El desarrollo de inhibidores de la enzima 17β-HSD5 es todo un reto, ya que existen 3 isoenzimas que están estrechamente ligadas con ésta debido a su alto porcentaje de homología de secuencia (>84%). Esta enzima es inhibida por varias clases de compuestos, no obstante, todos estos compuestos contienen uno o más anillos y, al menos, un grupo carbonilo en su estructura. Curiosamente, muchos de los compuestos que inhiben a esta enzima han sido descritos como eficaces en la quimioprevención del cáncer (Figura 2.11), por ejemplo:³⁵

- Antiinflamatorios no esteroideos (AINES): Indometacina, *N*-(4-clorobenzoil)melatonina (CBM, análogo de la indometacina), análogos del ácido *N*-fenilantranílico (Ácido flufenámico).
- Esteroides: Acetato de medroxiprogesterona (MPA), EM1404 (espirolactona).
- Derivados de ciclopentano: Bimatoprost (fármaco para el tratamiento de glaucoma).
- Benzodiazepinas: en primera instancia empleadas como ansiolíticos, no obstante han mostrado inhibición AKR1C3, Cloxazolam es un ejemplo de ello.
- Flavonoides y ácidos cinámicos: muchos derivados de estos compuestos han mostrado tener efectos quimiopreventivos en cáncer.

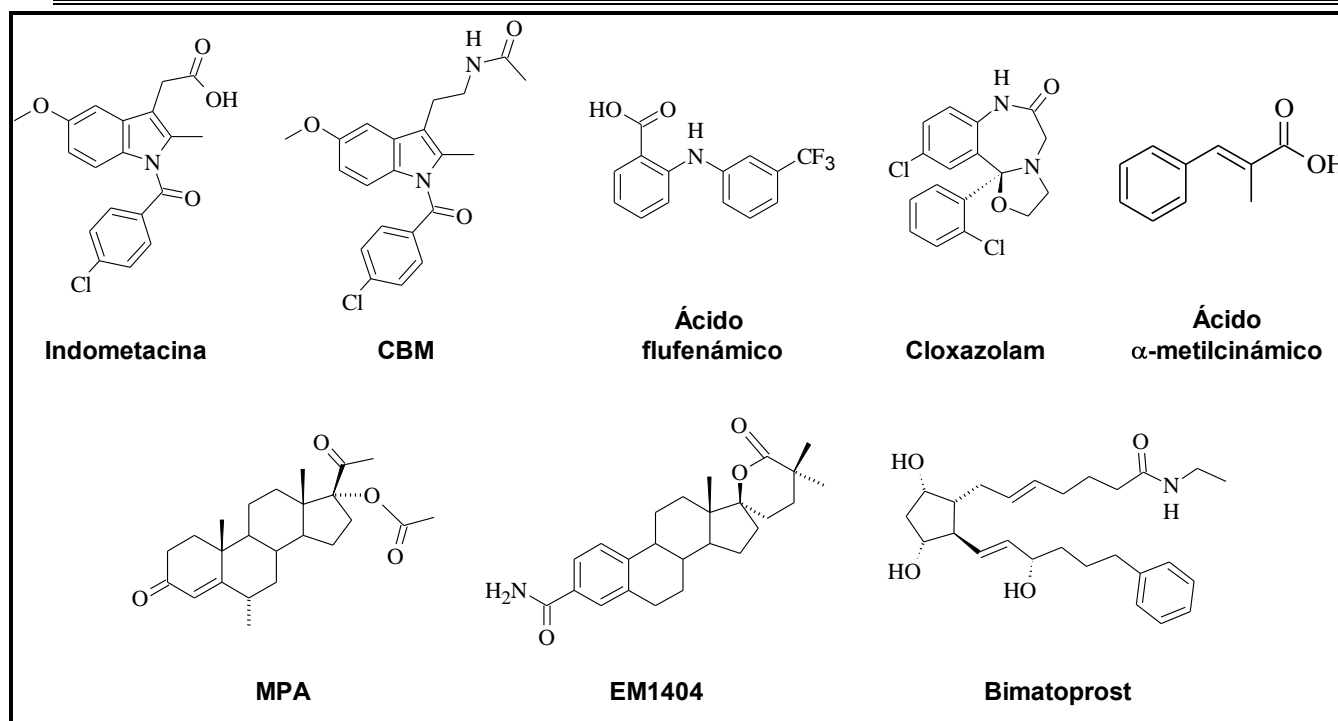


Figura 2.11. Inhibidores de la enzima 17β-HSD tipo 5 (AKR1C3).³⁵

2.4.1.4.1. Ácido cinámico como inhibidor de la enzima 17β-HSD tipo 5

El ácido cinámico (ácido 3-fenilpropenoico) es el constituyente mayoritario de la planta oriental *Cinnamomum cassia*. El ácido cinámico y sus derivados han sido descritos por poseer un amplio espectro terapéutico, incluyendo actividad antitumoral contra melanoma, glioblastoma y adenocarcinoma de próstata y pulmón. El ácido *trans*-cinámico es precursor en la biosíntesis de los flavonoides en las plantas; a estos compuestos polifenólicos que han sido aislados de una gran variedad de plantas, se les han atribuido actividades antivirales, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticarcinogénicas. De manera general se conocen, por medio de publicaciones, los siguientes efectos: suprimen la motilidad *in vitro* de células cancerosas de pulmón (antimetastásico, ya que reduce la actividad enzimática que degrada la matriz celular), protege a células medulares del estrés oxidante ocasionado por quimioterapia, reduce la inflamación producida por la producción de lipopolisacáridos de macrófagos y algunos ésteres del ácido cinámico poseen actividad antitumoral, limitando así la angiogénesis. Se ha estudiado también su influencia sobre enzimas metabolizadoras de esteroides encontrando que inhiben la aromatasa, sulfatasa, 5α-reductasa, 3β y 17β-HSD, entre otras.^{2, 36,38} En el año 2006, el grupo de investigación del Dr. Gobec se dio a la tarea de estudiar el efecto inhibitorio del ácido cinámico sustituido sobre la actividad de la isoforma 5 de la 17β-HSD, encontrando que el ácido α-metilcinámico fue el que presentó la menor CI_{50} (6.4 μM).⁵⁵

2.5. Hibridación Molecular: técnica de modificación estructural en la Química Farmacéutica

La modificación estructural de una molécula tiene por objeto optimizar su principal actividad farmacológica, a fin de disponer de moléculas más selectivas y menos tóxicas, con mejores propiedades farmacocinéticas o sin problemas de formulación farmacéutica debidos a una solubilidad y/o estabilidad inadecuadas.³⁸ En el área de la Química Farmacéutica existen numerosos métodos de búsqueda de moléculas activas, una de ellas es la hibridación molecular.

La hibridación molecular es una modificación molecular que tiene como objetivo generar nuevas moléculas activas, en las cuales las características de los componentes individuales son moduladas, amplificadas o modificadas.^{38,39} El término “ligandos múltiples”, propuesto por Morphy y colaboradores, aplica para fármacos capaces de reconocer más de un receptor. Las ventajas de los ligandos múltiples son: 1) su capacidad para activar diferentes blancos terapéuticos por una sola molécula, incrementando así su eficacia terapéutica y 2) su capacidad para cambiar el perfil de biodisponibilidad en la célula y ser eliminado completamente una vez que ha ejercido su efecto. De acuerdo con esta definición, los compuestos que demuestran una actividad significativa sobre otros blancos terapéuticos irrelevantes para la enfermedad son considerados como no selectivos.^{40,41} El punto de partida molecular para un proyecto de ligandos múltiples, se genera empleando uno de dos enfoques distintos, ya sea por el diseño racional de una combinación de farmacóforos o bien la selección de bibliotecas de compuestos o fármacos conocidos.⁴¹

Los compuestos híbridos pueden ser construidos por unión directa, mediante agentes espaciadores (*linkers*) o por traslape de las subunidades farmacofóricas (Figura 2.12).⁴⁰ Estas dos subunidades deben estar situadas a una distancia adecuada para que interaccionen de manera eficaz con los sitios activos de enzimas y/o receptores.³⁹ Cabe mencionar que la mayoría de las moléculas diseñadas por este método usan un grupo éster como agente espaciador, el cual es escindido por acción de las esterazas presentes en plasma, liberando así a los dos fármacos que, posteriormente, pueden actuar de manera independiente.⁴¹

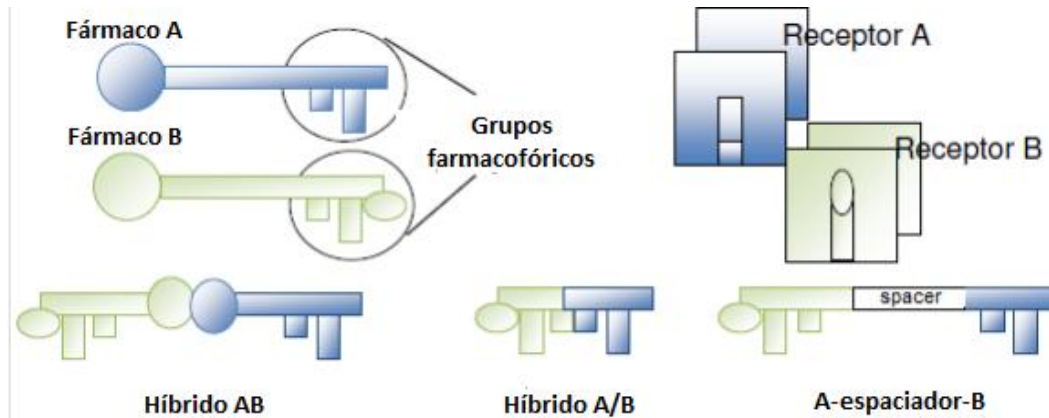


Figura 2.12. Técnicas de hibridación molecular. **Híbrido AB** (izquierda) obtenido por unión directa de las subunidades farmacofóricas; **híbrido A/B** (centro) obtenido por traslape de subunidades farmacofóricas; **híbrido A-B** (derecha) obtenido empleando un *linker*.⁴⁰

Dado que las dianas biológicas sobre las que actúan las moléculas híbridas pueden estar o no relacionadas, es necesaria una clasificación mecánica. Esto da lugar a tres tipos de híbridos (Figura 2.13): tipo A (una sola diana y ambas porciones interactúan en el mismo sitio activo de la diana); tipo B (dos dianas biológicas no relacionadas y ambas porciones interactúan en el sitio activo de las mismas de manera independiente) y tipo C (dos sitios de la misma diana y las dos porciones de la molécula híbrida actúan al mismo tiempo).^{38, 42}

Debido a su amplia disposición, particularmente en mamíferos, los esteroides han sido empleados en la construcción de sistemas híbridos. Algunos ejemplos de agentes anticancerígenos más comunes que se han combinado con vectores esteroideos son las nitrosoureas, aminoácidos N-prottegidos o péptidos, productos naturales como geldanamicina e isocianatos y algunos metalofármacos como el cisplatino (Figura 2.14).^{38, 39}

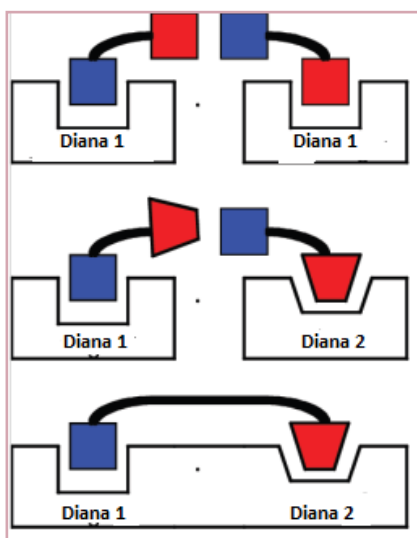


Figura 2.13. Tipos de interacción que presentan las moléculas híbridas.

Tipo A: solo una diana biológica.

Tipo B: dos dianas biológicas no relacionadas

Tipo C: dos dianas biológicas relacionadas.

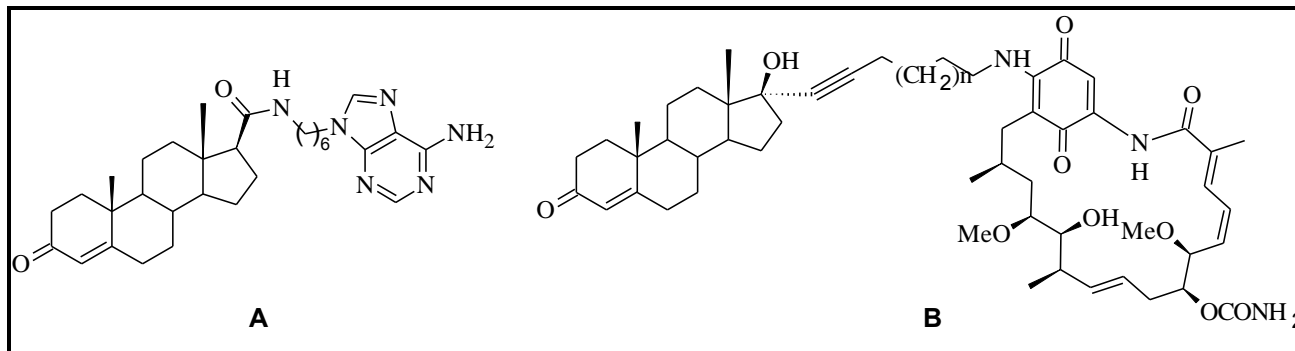


Figura 2.14. Ejemplos de moléculas híbridas teniendo el esqueleto ciclopentanoperhidrofenantreno como estructura base. **A)** Híbrido de progesterona con adenina como inhibidor de la glicoproteína P que presentó la mayor actividad sobre células de leucemia humana K562/R7 resistentes. **B)** Híbrido de testosterona con geldanamicina, es activo contra células de cáncer de mama (MCF-7).³⁸

2.6. Isosterismo y bioisosterismo

El isosterismo fue inicialmente un concepto puramente químico, en un intento de aplicar a las moléculas el hecho de que, en el caso de los átomos, una distribución electrónica similar conduce a propiedades similares. Así, Langmuir observó la semejanza de propiedades fisicoquímicas (densidad, solubilidad, etc.) que presentan ciertas moléculas, como el nitrógeno y el monóxido de carbono. Atribuyó dicha semejanza a que estos compuestos poseen el mismo número de átomos y de electrones de valencia y los definió como isósteros.⁴³

En 1925, H.G. Grimm formuló la *Ley de desplazamiento del hidruro* (Tabla 2.3), la cual extendió el concepto de isosterismo a especies que teniendo diferente número de átomos, poseen el mismo número de electrones de valencia. Por ejemplo, si se parte del ion O^{2-} y se añade un protón a su núcleo, resulta el anión F^- ; por otra parte, si se une un protón a la capa de electrones de valencia resulta el anión OH^- . Ambas especies son isoelectrónicas y muestran una considerable semejanza en sus propiedades químicas, por lo que pueden considerarse isósteras. Esta comparación entre los aniones F^- y OH^- sugiere que un átomo es isótero de la especie que resulta al agregar un protón y dos electrones al átomo que le precede en el sistema periódico.⁴³

Algunos átomos y grupos isósteros se muestran a continuación:

1. Monovalentes: H, F, Cl, Br, I, OH, SH, NH_2 , CH_3 , CF_3 .
2. Divalentes: -Se-, -S-, -CH=CH-, -O-, -NH-, - CH_2 -, - CF_2 -.
3. Trivalentes: -CH=, -N=, -P=, -As=.
4. Tetravalentes: =C=, =N=, =P=, C, Si.

Tabla 2.3. Ley del desplazamiento de “hidruro” de Grimm.

No. de e ⁻	6	7	8	9	10	11
	C	N	O	F	Ne	Na ⁺
	H ⁻ ↘	CH	NH	OH	FH	
		H ⁻ ↘	CH ₂	NH ₂	OH ₂	FH ₂
			H ⁻ ↘	CH ₃	NH ₃	OH ₃ ⁺
				H ⁻ ↘	CH ₄	NH ₄ ⁺

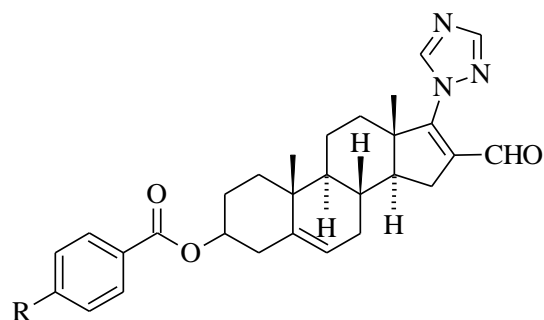
Existen también isósteros no clásicos, definidos como átomos o grupo de átomos que no cumplen con las propiedades electrónicas y estéricas para definir un isósteros clásico, sin embargo comparten propiedades físicas y químicas (acidez, polaridad, capacidad para formar puentes de hidrógeno, etc.).⁴³

El fenómeno por el que dos compuestos de estructuras relacionadas presentan propiedades semejantes fue descrito por Friedman como *bioisosterismo*. Un *bioisósteros* se define como un grupo que puede usarse para sustituir a otro dentro de una molécula manteniendo la actividad biológica de ésta. Friedman también consideró que los isósteros que presentan actividad biológica opuesta (antagónica) deben ser contemplados como bioisósteros, ya que estos compuestos generalmente actúan sobre el mismo sitio activo del receptor.^{43, 44}

2.7. Derivados de 1,2,4-triazol

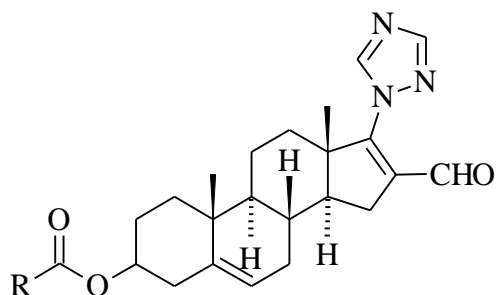
En nuestro grupo de trabajo se han desarrollado derivados de DHEA con un anillo 1,2,4-triazol en el carbono C-17 y ésteres aromáticos y alifáticos en el carbono C-3 del esteroide (Tablas 2.4 y 2.5), los cuales mostraron una importante actividad biológica sobre líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3), cáncer de mama (MCF-7) y cáncer de pulmón (SKLU1). En estos compuestos se observó la influencia del sustituyente en posición *para* del anillo aromático, observándose que el orden de citotoxicidad en las líneas antes mencionadas es: -CF₃> -CN> -NO₂>-H> -CH₃> -OCH₃,⁶⁰ mientras que para los compuestos con ésteres alifáticos se observó la influencia de la elongación de la cadena sobre la actividad de la enzima 17β-HSD, ya que conforme aumentó el número de metilenos (-CH₂-) la actividad fue decayendo (Tabla 2.5).¹⁶

Tabla 2.4. Porcentaje de inhibición del crecimiento en líneas celulares cancerosas promovido por derivados de DHEA con un grupo 1,2,4-triazol en C-17 y benzoatos en C-3. ⁶⁰



Compuesto	Sustituyente (R)	% de inhibición del crecimiento en líneas celulares de cáncer (50 μ M)		
		PC-3	MCF-7	SKLU-1
T1	-OCH ₃	SA	23.0 \pm 3.6	9.2 \pm 0.1
T2	-CH ₃	3.1 \pm 0.3	48.7 \pm 5.7	68.0 \pm 4.2
T3	-H	21.8 \pm 8.1	33.5 \pm 7.0	39.7 \pm 0.2
T4	-CN	100	100	89.9 \pm 5.9
T5	-NO ₂	85.7 \pm 14.3	100	100
T6	-CF ₃	100	100	89.1 \pm 7.0

Tabla 2.5. Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) sobre la enzima 17β -HSD promovido por derivados de DHEA con un anillo 1,2,4-triazol en C-17 y ésteres alifáticos en C-3.¹⁶



Compuesto	Sustituyente (R)	CI_{50} (nM)
Va	H	0.13
Vb	-CH ₃	0.12
Vc	-CH ₂ CH ₃	0.15
Vd	-(CH ₂) ₂ CH ₃	0.18
Ve	-(CH ₂) ₃ CH ₃	0.28
Vf	-(CH ₂) ₄ CH ₃	0.38

3. Hipótesis

Con base en todo lo anterior, sí los nuevos derivados de DHEA contienen en su estructura el anillo heterocíclico de 1,2,4-triazol en C-17 y ésteres de ácido cinámico en C-3, obtenidos mediante la técnica de hibridación molecular, entonces la actividad antiandrogénica de éstos derivados se mantendrá o superará a la actividad antiandrogénica mostrada por cada una de las entidades.

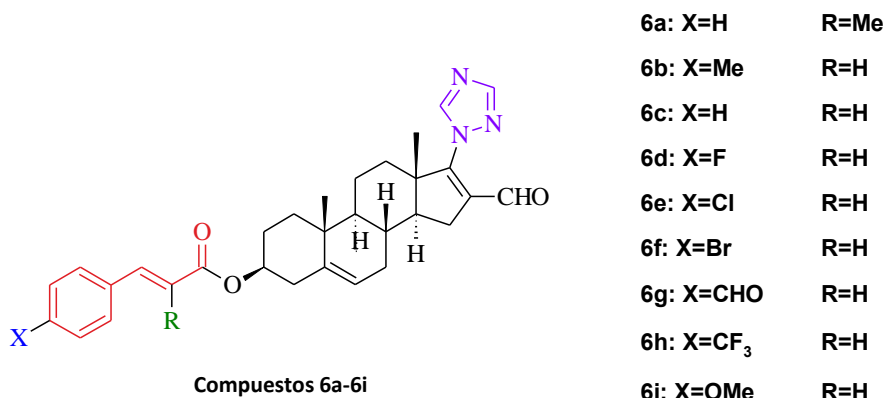
4. Objetivos

4.1. Objetivo general

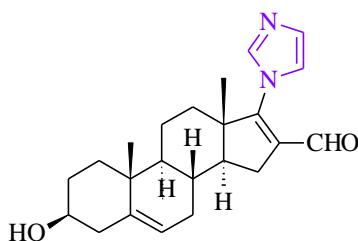
Síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de la deshidroepiandrosterona (DHEA) con el núcleo de 1,2,4-triazol en el carbono C-17 del esteroide, así como ésteres de ácido cinámico en el carbono C-3 para que sean evaluados en estudios *in vivo* e *in vitro*.

4.2. Objetivos particulares

1. Sintetizar derivados de DHEA con un grupo triazol en C-17 y ésteres de ácido cinámico en C-3 (6a-6i).

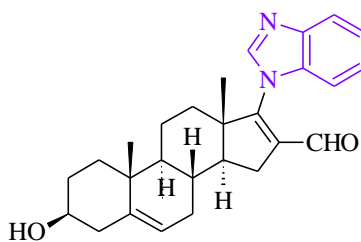


2. Sintetizar un derivado de DHEA con un grupo imidazol en C-17 y el alcohol libre en C-3.



Compuesto 7

3. Sintetizar un derivado de DHEA con un grupo benzimidazol en C-17 y el alcohol libre en C-3.



Compuesto 8

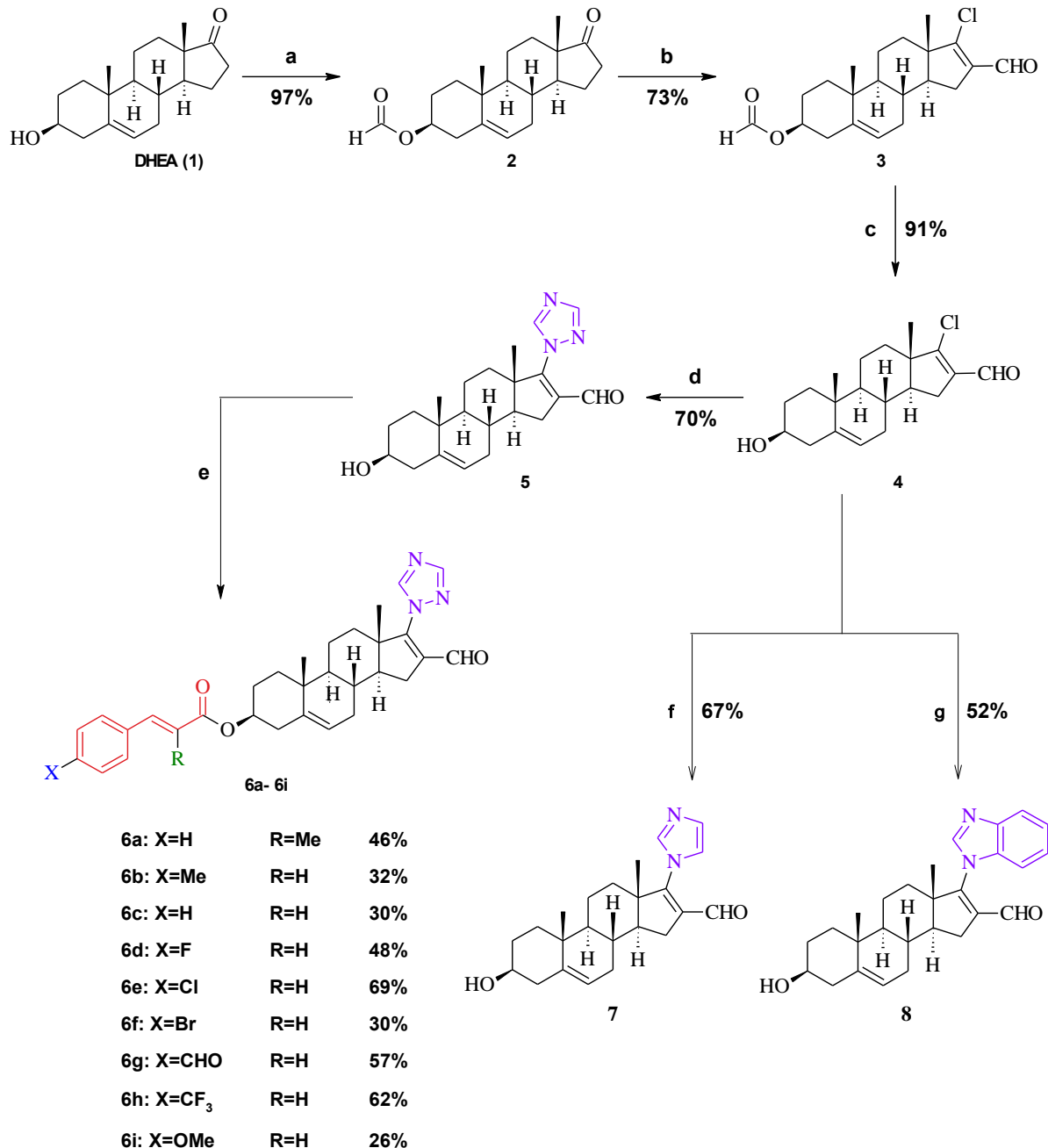
4. Someter a evaluación biológica los compuestos obtenidos:
 - a) Ensayos *in vitro*: Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) sobre las enzimas 5-AR tipo 2 y 17β -HSD.

Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento sobre líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP) así como en líneas celulares sanas (J774).
 - b) Ensayos *in vivo*: Determinación del peso de la próstata, diámetro de la mancha pigmentada y peso de vesículas seminales en hámsteres castrados.

5. Análisis de Resultados

5.1. Parte química

Los nuevos derivados fueron obtenidos mediante la siguiente ruta de síntesis:



Esquema 5.1. Reactivos y condiciones de síntesis. a) Ácido fórmico, 40°C, 45 min.; b) POCl₃/DMF, CHCl₃, 80°C, 10 h; c) H₂SO₄, CH₃COCH₃ /H₂O, 90°C, 2.5 h; d) 1,2,4-triazol, Na₂CO₃, DMF, 70°C, 5.5 h; e) *trans*-XC₆H₄CH=CR-COOH, DCC, DMAP, CHCl₃, 2h; f) 1,3-imidazol, Na₂CO₃, DMF, 80°C, 6 h; g) Benzimidazol, Cs₂CO₃, DMF, 60°C, 2h.

Para la obtención de los nuevos derivados se empleó deshidroepiandrosterona (DHEA) como materia prima.

De acuerdo con el Esquema 5.1, el compuesto **2** fue obtenido por medio de una reacción de esterificación de Fisher y su presencia se comprobó, en primera instancia, por espectroscopía de IR. La ausencia de una banda alrededor de 3300 cm^{-1} fue un indicativo de que no existía el alcohol de la posición C-3 del esteroide y la existencia de dos bandas alrededor de 1736 y 1702 , características de la vibración del grupo carbonilo (C=O), correspondientes a cetona y formiato, respectivamente.

La RMN- ^1H confirma la presencia del éster con una señal múltiple en un desplazamiento de 4.77-4.69 ppm que corresponde al protón del C-3 (H-3) del esteroide, así como el desplazamiento de la señal simple en 8.03 ppm, que pertenece al protón del formiato. La señal doble en 5.42 ppm fue asignada al protón de C-6. Las señales simples correspondientes a los metilos de las posiciones 18 y 19 presentaron un desplazamiento de 0.89 y 1.05 ppm, respectivamente. Por su parte, la RMN- ^{13}C evidencia la presencia del compuesto **2** presentando una señal con un desplazamiento de 160 ppm que corresponde al carbono carbonílico del éster.

En cuanto a la espectrometría de masas, se observó el ion molecular ($[\text{M}+1]$) con una relación m/z 317 y un pico base de 271, el cual se propone es debido a la pérdida del fragmento CHOO^- .

La obtención del derivado 17-clorovinilformilo (**3**) se llevó a cabo mediante la reacción de Vilsmeier-Haak en la cual se empleó oxiclorigenato de fósforo (POCl_3) y N,N' -dimetilformamida (DMF) para la obtención de un grupo formilo α, β insaturado en C-16 y un átomo de cloro en C-17; este compuesto es un intermediario clave para reacciones de adición-eliminación en C-17.

En la espectroscopía de IR, la ausencia de la banda alrededor de 1730 cm^{-1} indica la desaparición del grupo cetona en el carbono C-17, mientras que la aparición de una banda en 1665 cm^{-1} se atribuye a la presencia del grupo carbonilo α, β insaturado perteneciente al aldehído, así como en 2730 cm^{-1} una señal debido a la vibración C-H del grupo formilo conocida como resonancia de Fermi.

En la espectroscopía de RMN- ^1H , la incorporación del grupo formilo α, β insaturado se hace evidente con la presencia de una señal simple en 9.98 ppm. En RMN- ^{13}C las señales que se encuentran en 188.17 ppm, 162.36 ppm y 136.56 ppm, confirmaron la presencia de un grupo carbonilo α, β insaturado por adición de un grupo formilo sobre el carbono C-16.

El compuesto **4** se obtuvo con un alto rendimiento (91%) mediante una reacción de hidrólisis bajo condiciones ácidas. La espectroscopía de IR presentó una señal en 3417 cm^{-1} correspondiente a la vibración O-H del alcohol obtenido en C-3.

Por su parte, en RMN- ^1H se indica la ausencia del grupo formiato, lo que se hace evidente cuando el desplazamiento de la señal múltiple pasa de 4.77-4.69 en el intermediario **3**, a 3.59-3.44 ppm en el intermediario **4** para el protón en la posición C-3. Lo mismo ocurre en RMN- ^{13}C , ya que la señal en 73.74 ppm pasa a 71.71 ppm para el carbono C-3, esto aunado a la desaparición de la señal en 160.68 ppm del carbonilo del éster. La aparición del ion molecular 334 m/z en espectrometría de masas confirma, también, la obtención del intermediario **4**.

La síntesis del intermediario **5**, así como de los compuestos finales **7** y **8**, involucró una reacción de adición-eliminación sobre el carbono C-17 del núcleo esteroidal. Para ello se empleó carbonato de sodio o de cesio para llevar a cabo la abstracción del protón del azol y posteriormente llevar a cabo una reacción de sustitución nucleofílica-vinílica sustituyendo al átomo de cloro en C-17.

La espectroscopía de IR para los tres derivados mostró señales alrededor de $3360\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a vibraciones del grupo O-H, confirmando la presencia de este grupo en C-3. Señales entre $3180\text{-}3085\text{ cm}^{-1}$ pertenecientes al sistema aromático ($=\text{C-H}$); para el compuesto **7**, una señal en 649 cm^{-1} por la presencia del imidazol; para el compuesto **8**, dos señales en 853 cm^{-1} y 737 cm^{-1} debidas a la presencia del bencimidazol.

En RMN- ^1H , para estos compuestos, se observa una señal simple en $10.11\text{-}9.60\text{ ppm}$ que se atribuye al protón del grupo formilo en C-16, además de señales simples para los compuestos **5** y **7** en la zona de protones aromáticos entre $8.40\text{-}7.11\text{ ppm}$, mientras que aparición de señales dobles de dobles (dd) para los protones del grupo bencimidazol con desplazamientos que van de 7.98 a 7.35 ppm del compuesto **8**.

En la Tabla 5.1 se ilustran la asignación de señales así como los desplazamientos químicos más representativos obtenidos en RMN- ^1H para los intermediarios **2-5** y compuestos finales **7** y **8**.

En RMN- ^{13}C , para el compuesto **5** apareció una señal con desplazamiento de 153.18 ppm , la cual se asignó a los carbonos equivalentes (**A** y **B**) del anillo de triazol, mientras que para el compuesto **7** las señales de los carbonos del núcleo de imidazol (**A-C**) se ubican con desplazamientos que van de $137\text{-}120\text{ ppm}$; en el compuesto **8**, los desplazamientos correspondientes a los carbonos del núcleo de benzimidazol (**B-E**) abarcan de $124\text{-}122\text{ ppm}$, mientras que el carbono **A** se desplazó hacia campo bajo (141 ppm). En la Tabla 5.2 se enlistan los desplazamientos químicos más representativos en RMN- ^{13}C para los compuestos **2-5**, **7** y **8**.

Tabla 5.1. Desplazamientos químicos (δ , ppm) en RMN-¹H de los intermediarios **2-5** y compuestos finales **7** y **8**.

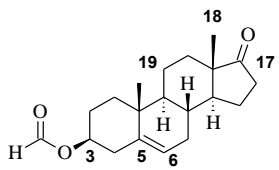
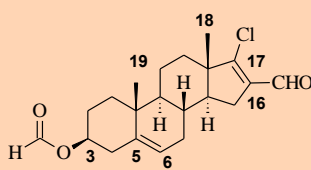
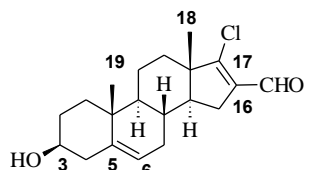
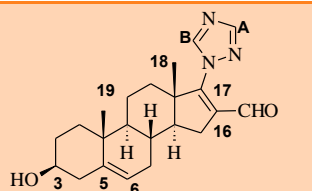
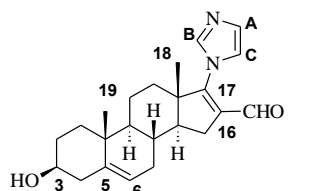
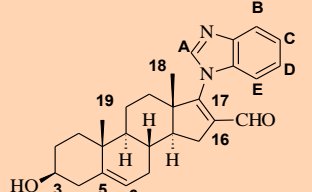
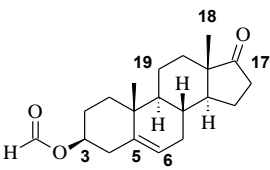
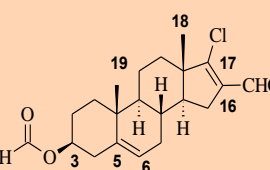
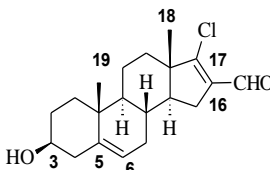
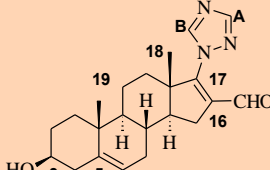
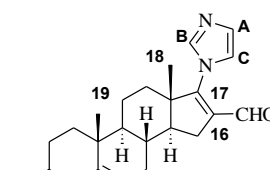
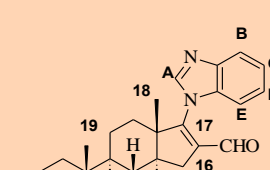
Compuesto	Estructura	Protón					
		H-18	H-19	H-3	H-6	16-CHO	Otros
2		1.05 (s, 3H)	0.89 (s, 3H)	4.69-4.77 (m, 3H)	5.4 (d, $J=4.7$ Hz, 1H)	-----	8.03 (s, 1H, 3- CHOOR)
3		0.89 (s, 3H)	1.07 (s, 3H)	4.69-4.77 (m, 3H)	5.41 (d, $J=4.7$ Hz, 1H)	9.98 (s, 1H)	8.03 (s, 1H, 3- CHOOR)
4		0.99 (s, 3H)	1.05 (s, 3H)	3.59-3.44 (m, 1H)	5.36 (s, 1H)	9.98 (s, 1H)	-----
5		1.06 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)	3.63-3.40 (m, 1H)	5.38 (d, $J=3.6$ Hz, 1H)	10.11 (s, 1H)	8.41 (s, 1H, H-B); 8.11 (s, 1H, H-A)
7		1.05 (s, 3H)	1.07 (s, 3H)	3.53 (m, 1H)	5.38 (dd, $J=3.2,$ 2.1 Hz, 1H)	9.73 (s, 1H)	7.63 (s, 1H, H-B); 7.22 (s, 1H, H-C); 7.11 (s, 1H, H-A)
8		1.05 (s, 3H)	1.05 (s, 3H)	3.55 (m, 1H)	5.40 (s, 1H)	9.59 (s, 1H)	7.98 (s, 1H, H-A); 7.85 (dd, $J=7.0,$ 2.8 Hz, 2H, H-B, H-E); 7.35 (dd, $J=6.0,$ 2.9 Hz, 2H, H-C, H-D)

Tabla 5.2. Desplazamientos químicos (δ , ppm) en RMN-¹³C de los intermediarios **2-5** y compuestos finales **7 y 8**.

Compuesto	Estructura	Carbono						
		C-18	C-19	C-3	C-6	16-CHO	C-17	Otros
2		13.69	19.47	73.81	122.36	-----	221.06	160.71 (3-COOR)
3		15.12	19.34	73.74	122.32	188.17	162.36	160.68 (3-COOR), 136.56 (C-16)
4		15.13	19.45	71.71	121.04	188.23	162.49	141.22 (C-5); 136.59 (C-16)
5		16.12	19.44	71.66	120.98	189.24	156.91)	153.18 (C-A); 153.18 (C-B); 141.20 (C-5); 132.50 (C-16)
7		16.31	20.61	71.65	120.97	187.83	160.81	141.22 (C-5); 137.96 (C-B); 134.07 (C-16); 130.86 (C-A); 120.09 (C-C)
8		19.46	20.67	71.62	120.63	187.91	141.66	141.26 (C-A); 124.91 (C-C); 123.66 (C-D); 122.68 (C-B); 120.92 (C-E)

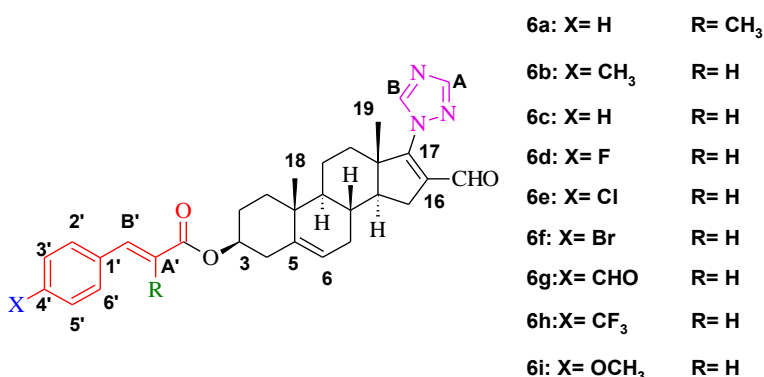
5.1.1. Derivados 3 β -cinamoiloxi-17-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6a-6i).

Los compuestos **6a-6i** fueron obtenidos a través de la reacción de Steglich⁴⁹ para la cual se hizo reaccionar el compuesto **5** con diciclohexilcarbodiimida (DCC), *N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP) y el ácido cinámico correspondiente, en cloroformo como disolvente. Los rendimientos obtenidos van de 26% a 69% generando, en la mayoría de los casos, un sólido color blanco.

La incorporación del ácido cinámico (y ácido α -metilcinámico para **6a**) para obtener un éster se demostró, inicialmente, por la espectroscopía de IR en la cual desapareció la banda de 3300 cm⁻¹ de la vibración O-H para el intermediario **5**, así como la presencia de señales en un rango de frecuencia de 3167-3100 cm⁻¹ que corresponden a vibraciones =C-H del anillo aromático, la intensa señal alrededor de 1700 cm⁻¹ del grupo C=O del éster y señales confirmatorias de sustitución 1,4 del anillo aromático entre 830 y 760 cm⁻¹.

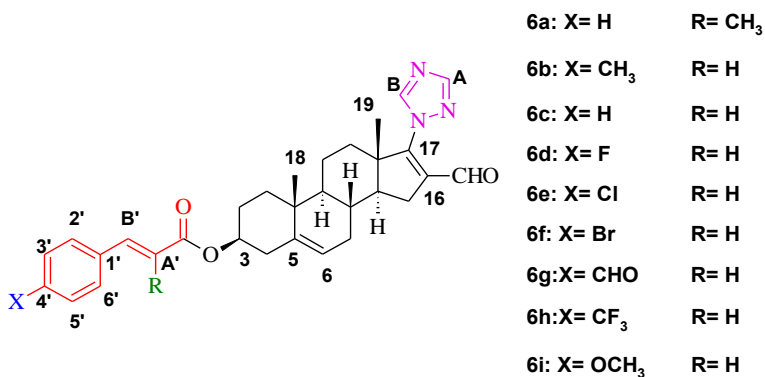
En RMN-¹H continúa la señal simple alrededor de 9.80 ppm que corresponde al protón del grupo formilo del carbono C-16 y las dos señales simples entre 8.42 y 8.12 ppm de los protones del anillo de 1,2,4-triazol. Los desplazamientos en un intervalo de 7.67-7.62 ppm y 6.53-6.28 ppm, con constantes de acoplamiento de 16 Hz, fueron asignados a los protones B' y A'; asimismo, se observan claramente los protones del sistema aromático en un intervalo de 7.52-7.42 ppm para los protones 2' y 6', y en un intervalo entre 7.38-6.89 ppm para los protones 3' y 5'. Para los compuestos **6a** y **6b** hay presencia de una señal simple con un desplazamiento de 2.10 y 2.37 ppm, respectivamente, correspondientes al grupo metilo que tienen ambos compuestos en su estructura, en posición alfa al carbonilo del éster para el compuesto **6a** y en posición *para* en el anillo aromático para el compuesto **6b**. En el derivado **6d**, que contiene al átomo de flúor, se observa el acoplamiento H-F, al igual que el compuesto **6h** con valores de constante de acoplamiento *J*=5.6 y 2.5 Hz, respectivamente, para los protones 2'-6'. El compuesto **6g** presentó una señal simple con un desplazamiento de 10.03 ppm que pertenece al protón del grupo formilo sustituido en la posición *para* del anillo aromático.

La incorporación de los ésteres de los compuestos **6a-6i** en RMN-¹³C se evidenció por la presencia de señales alrededor de 166 ppm, correspondientes al carbono carbonílico del éster. La aparición de señales en un intervalo de 136-122 ppm concernientes a los carbonos del anillo aromático y la señal en aproximadamente 70 ppm perteneciente al C-3 del esteroide. Las Tablas 5.3 y 5.4 presentan las señales más representativas en RMN-¹H y RMN-¹³C para los derivados **6a-6i**.

Tabla 5.3. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los compuestos **6a-6i** en RMN-¹H


Protón	Compuesto / Sustituyente (X)								
	6a (X= H, R=CH ₃)	6b (-CH ₃)	6c (-H)	6d (-F)	6e (-Cl)	6f (-Br)	6g (-CHO)	6h (-CF ₃)	6i (-OCH ₃)
H-18	1.12 (s, 1H)	1.11 (s, 3H)	1.11 (s, 3H)	1.11 (s, 3H)	1.11 (s, 3H)	1.10 (s, 3H)	1.11 (s, 1H)	1.11 (s, 1H)	1.10 (s, 1H)
H-19	1.20 (s, 1H)	1.20 (s, 3H)	1.21 (s, 3H)	1.20 (s, 3H)	1.21 (s, 3H)	1.20 (s, 3H)	1.21 (s, 1H)	1.21 (s, 1H)	1.20 (s, 1H)
H-3	4.75 (m, 1H)	4.74 (m, 1H)	4.76 (m, 1H)	4.76 (m, 1H, H-3)	4.75 (m, 1H)	4.74 (m, 1H)	4.76 (m, 1H)	4.77 (m, 1H)	4.74 (m, 1H)
H-6	5.45 (d, J=4.0 Hz, 1H)	5.44 (d, J=5.0 Hz, 1H)	5.45 (s, 1H)	5.44 (d, J=5.1 Hz, 1H)	5.45 (s, 1H)	5.44 (d, J=4.7 Hz, 1H)	5.45 (d, J=5.0 Hz, 1H)	5.46 (d, J=4.6 Hz, 1H)	5.44 (d, J=4.9 Hz, 1H)
H-3' y H-5'	7.39 (d, 2H)	7.18 (d, J=8.0 Hz, 2H)	7.38 (s, 3H)	7.07 (t, 2H)	7.35 (d, J=8.4 Hz, 2H)	7.38 (d, J=8.4 Hz, 2H)	7.90 (d, J=8.3 Hz, 2H)	7.63 (d, J=2.5 Hz, 2H)	6.89 (d, J=8.7 Hz, 2H)
H-2' y H-6'	7.39 (d, 2H)	7.42 (d, J=8.1 Hz, 2H)	7.52 (d, J=3.5 Hz, 2H)	7.51 (m, 2H)	7.45 (d, J=8.5 Hz, 2H)	7.51 (d, J=8.3 Hz, 2H)	7.67 (d, J=5.8 Hz, 2H)	7.62 (d, J=5.6 Hz, 2H)	7.47 (d, J=8.7 Hz, 2H)
H-A'	----	6.37 (d, J=16.0 Hz, 1H)	6.42 (d, J=16.0 Hz, 1H)	6.36 (d, J=16.0 Hz, 1H)	6.39 (d, J=16.0 Hz, 1H)	6.40 (d, J=16.0 Hz, 1H)	6.53 (d, J=16.1 Hz, 1H)	6.49 (d, J=16.0 Hz, 1H)	6.28 (d, J=15.9 Hz, 1H)
H-B'	7.67 (s, 1H)	7.65 (d, J=16.0 Hz, 1H)	7.67 (d, J=16.0 Hz, 1H,)	7.63 (d, J=16.0 Hz, 1H,)	7.62 (d, J=16.0 Hz, 1H,)	7.60 (d, J=16.0 Hz, 1H)	7.71 (s, 1H)	7.68 (d, J=16.2 Hz, 1H,)	7.62 (d, J=15.9 Hz, 1H,)

Carbono	Compuesto/ Sustituyente (X)								
	6a (X= H R=CH ₃)	6b (-CH ₃)	6c (-H)	6d (-F)	6e (-Cl)	6f (-Br)	6g (-CHO)	6h (-CF ₃)	6i (-OCH ₃)
H-A	8.12 (s, 1H)	8.12 (s, 1H)	8.12 (s, 1H)	8.12 (s, 1H)	8.12 (s, 1H)	8.12 (s, 1H)	8.12 (s, 1H)	8.12 (s, 1H)	8.12 (s, 1H)
H-B	8.42 (s. 1H)	8.42 (s. 1H)	8.42 (s. 1H)	8.43 (s. 1H)	8.42 (s. 1H)	8.42 (s. 1H)	8.42 (s. 1H)	8.42 (s. 1H)	8.42 (s. 1H)
16-CHO	10.11 (s, 1H)	10.11 (s, 1H)	10.12 (s, 1H)	10.12 (s, 1H)	10.11 (s, 1H)	10.11 (s, 1H)	10.03 (s, 1H)	10.12 (s, 1H)	10.11 (s, 1H)
Otros	2.10 (s, 3H, α-CH ₃); 7.32 (t, 1H, H-4')	2.37 (s, 3H, Ar-CH ₃)	7.38 (s, 3H, H-4')	----	----	----	10.11 (s, 1H, Ar-CHO)	----	3.83 (m, 1H, OCH ₃)

Tabla 5.4. Desplazamientos químicos (δ , ppm) de los compuestos **6a-6i** en RMN-¹³C


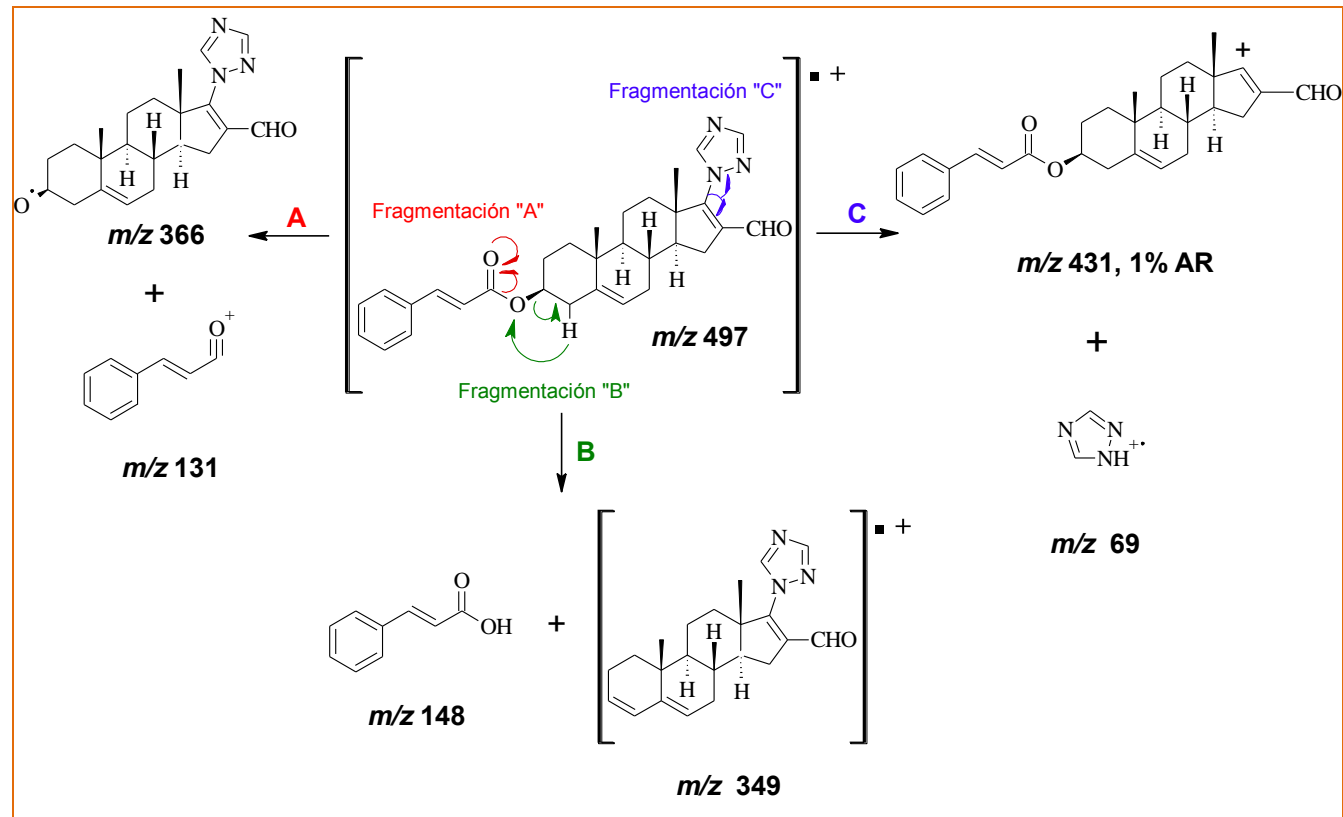
Carbono	Compuesto / Sustituyente (X)								
	6a (X=H R=CH ₃)	6b (-CH ₃)	6c (-H)	6d (-F)	6e (-Cl)	6f (-Br)	6g (-CHO)	6h (-CF ₃)	6i (-OCH ₃)
C-18	16.10	16.11	16.12	16.12	16.12	15.80	16.11	16.13	16.11
C-19	20.60	20.61	20.62	20.61	20.63	20.30	20.62	20.63	20.61
C-3	74.21	73.40	73.86	73.93	74.02	73.71	74.27	74.23	73.63

Carbono	Compuesto/ Sustituyente (X)								
	6a (X=H R=CH ₃)	6b (-CH ₃)	6c (-H)	6d (-F)	6e (-Cl)	6f (-Br)	6g (-CHO)	6h (-CF ₃)	6i (-OCH ₃)
C-5	132.46	140.19	134.62	132.48	140.10	133.21	137.29	140.02	132.49
C-6	128.36	121.94	121.99	122.02	122.06	121.74	122.14	122.14	121.90
C-3' y C-5'	129.74	129.74	129.02	116.28 116.06	132.52	131.95	130.29	125.98	114.45
C-2' y C-6'	128.96	128.17	128.18	130.07 129.98	129.33	129.22	128.61	126.02	129.81
C-1'	136.08	131.87	132.51	130.82	133.12	133.18	142.93	137.99	127.34
C-4'	128.47	132.50	130.36	156.88	136.28	124.28	132.49	128.29	161.47
C-A'	121.91	117.57	118.70	118.41	119.31	119.06	121.92	121.30	116.16
C-B'	138.70	144.71	144.70	143.41	143.82	142.99	143.83	143.82	144.36
C-A	153.18	153.20	153.21	143.80	153.22	152.89	153.21	153.23	153.21
C-B	143.80	140.77	143.82	140.09	143.24	139.75	140.29	142.81	140.22
16-CHO	189.20	189.18	189.16	189.22	189.16	188.84	189.14	189.15	189.16
3-COOR	168.15	166.68	166.49	166.39	166.23	165.88	165.89	165.90	166.80
C-16	140.20	140.77	140.16	140.09	143.24	139.75	140.00	132.50	140.22
C-17	156.87	156.88	156.88	153.19	156.88	156.55	156.86	156.87	156.88
Otros	14.22 (α-CH ₃)	19.40 (Ar-CH ₃)	-----	-----	-----	-----	191.53 (Ar-CHO)	122.95 (Ar-CF ₃)	55.50 (Ar-OCH ₃)

El peso molecular de estos compuestos fue confirmado mediante la espectrometría de masas. Además de obtener el ion molecular, en algunos casos, se proponen fragmentos representativos de estos derivados los cuales se ilustran en el Esquema 5.2.

En todos los casos se propone la pérdida del grupo éster por medio de la ruptura en el enlace C-O del carbono carbonílico (Fragmentación "A") para dar la especie [C₆H₅-CH=CH-CO]⁺ con relación *m/z* 131; se plantea también, la pérdida del grupo éster a través de un re arreglo obteniendo una especie con

relación m/z 349 (Fragmentación "B"). Además, es posible la pérdida del núcleo 1,2,4-triazol dando lugar a un fragmento m/z 431 y el catión-radical 1,2,4-triazol con m/z 69 (Fragmentación "C").



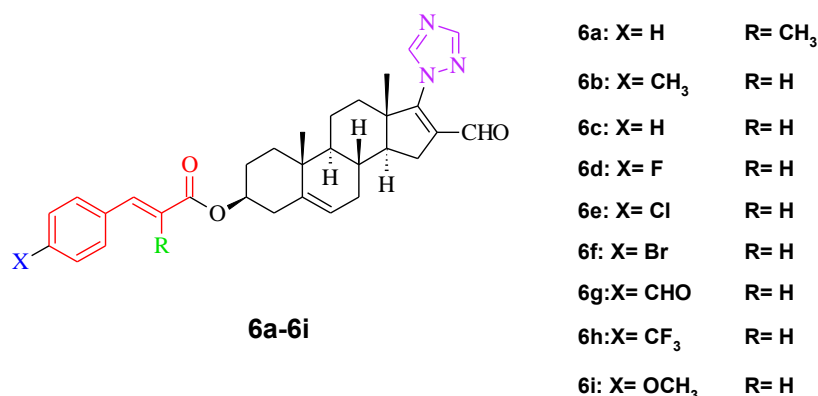
Esquema 5.2. Mecanismo de fragmentación propuesto para los compuestos 6a-6i.

5.2 Parte Biológica

5.2.1. Estudios *in vitro*

5.2.1.1. Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de los derivados 6a-6i, 7 y 8 sobre la enzima 5 α -reductasa tipo 2 de próstata humana.

La evaluación de concentración inhibitoria 50 de la serie 6a-6i y de los compuestos 7 y 8 se llevó a cabo en el Instituto de Pruebas Biológicas en el Laboratorio de Hormonas del Departamento de Sistemas Biológicos en la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). La Tabla 5.5 ilustra los resultados obtenidos de este ensayo.

Tabla 5.5. Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de los nuevos derivados de androstano sobre la enzima 5 AR-2.


Compuesto	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g	6h	6i	7	8	Finasterida
CI₅₀ (nM)	NA	69	NA	0.149	32	NA	0.97	55	4.18	>100μM	>100μM	8.5

NA= No activo.

En trabajos previos de Relación Cuantitativa Estructura-Actividad tridimensional por el método SOMFA (self-organizing molecular field analysis, por sus siglas en inglés) de derivados de pregnano y androstano, se observó que la presencia de grupos voluminosos y grupos electronegativos en C-3, C-6 y C-17 favorecen la actividad inhibitoria sobre la enzima 5α-reductasa tipo 2.⁵² A pesar de que no se conoce la estructura cristalina de esta enzima, con los resultados presentados en la Tabla 5.5 se puede inferir que los compuestos desarrollados en este trabajo cumplieron con alguno de los requisitos antes mencionados, ya que seis (**6b**, **6d**, **6e**, **6g**, **6h**, **6i**) de los once compuestos finales inhibieron la actividad catalítica de la isoenzima 2, teniendo en común la presencia de un anillo aromático unido al esqueleto esteroide mediante una función éster en C-3. Además, los compuestos **6d** y **6g** fueron los que presentaron una menor CI₅₀, teniendo en común que ambos tienen un grupo electronegativo unido al anillo aromático. Los derivados **7** y **8**, que no cuentan con el grupo cinamato en C-3, no presentaron actividad biológica sobre la enzima.

Cabe destacar que los compuestos **6d**, **6g** y **6i** tuvieron una CI₅₀ menor a la que se reportó para el fármaco de referencia, Finasterida (8.5 nM).

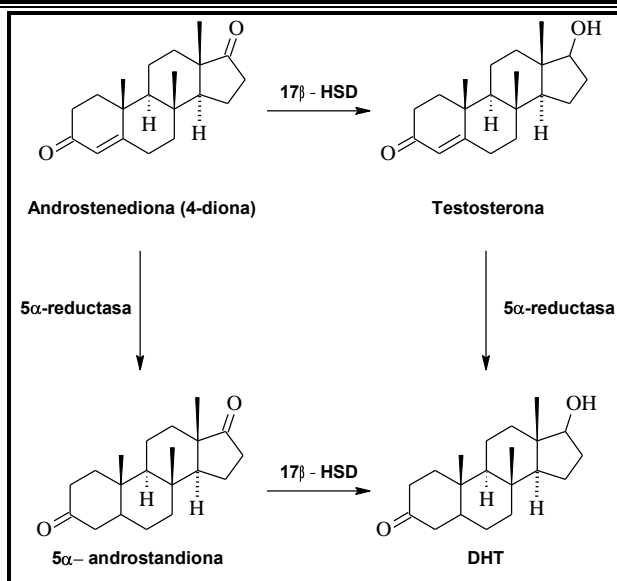
Como se mencionó anteriormente, el compuesto **6d**, que cuenta con un átomo de flúor en la posición *para* del anillo aromático, fue el que presentó la menor CI₅₀ sobre la actividad de la enzima, siendo este compuesto el más activo. El átomo de flúor suele ser muy usado en la búsqueda de agentes terapéuticos debido a sus características químicas. Contrario a lo que se piensa, el flúor está más relacionado, en cuestión de radio de Van der Waals, con el oxígeno que con el hidrógeno. Además, cuando está unido al átomo de carbono se crea un momento dipolar muy grande alrededor de este enlace debido a la diferencia de electronegatividad entre estos átomos. Este dipolo puede contribuir a la capacidad de la molécula para que presente mejores interacciones intermoleculares; aunado a esto, el flúor es capaz de

formar puentes de hidrógeno los cuales son más débiles que los que se forman entre H-O pero son lo suficientemente fuertes para contribuir a la unión de estos derivados fluorados con su sitio receptor.⁵¹ Los mismos criterios aplican para el grupo CF₃ (**6h**), el cual es un isómero de CH₃ e isómero no clásico del Cl (**6e**) y del ciano (CN). El cloro (**6e**) y el formilo (**6g**) como grupos sustituyentes, son grupos electroattractores los cuales modifican la densidad electrónica del anillo aromático llevando a una modificación en la forma de interacción de éste con su sitio receptor, además de que el grupo formilo en sí, es capaz de formar puentes de hidrógeno. El cloro sin embargo, debido a su naturaleza hidrofóbica puede presentar interacciones con sitios hidrofóbicos de la enzima.^{44,51} Por su parte, el metilo también es un sustituyente hidrofóbico que se puede unir a sitios de esta naturaleza mediante interacciones hidrofóbicas o de Van der Waals.⁴⁴

De manera general, es posible que para que exista una mejor inhibición de la enzima 5AR-2 por parte de estos derivados, además de contener un grupo hidrofóbico directamente unido a la posición C-3 del esteroide, como lo es el cinamato, también sea necesario que este mismo grupo se encuentre sustituido en posición *para* del anillo aromático con grupos aceptores de puentes de hidrógeno (puentes de hidrógeno no clásicos en el caso del flúor).

5.2.1.2. Ensayo de inhibición de la enzima 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa de los nuevos derivados (6a-6h).

Existen dos rutas mediante las cuales es posible la síntesis de DHT, una de ellas a partir de androstenediona, que por acción de la enzima 5 α -reductasa se transforma en 5 α -androstandiona y a su vez es transformada a DHT por acción de la enzima 17 β -HSD. La segunda ruta comprende la síntesis de testosterona a partir de androstenediona por acción de 17 β -HSD y la posterior conversión a DHT catalizada por 5AR (Esquema 5.3).^{16,53} Se ha reportado la inhibición de la enzima 17 β -HSD por sustratos estructuralmente diferentes, los cuales han sido divididos como inhibidores esteroideos (Acetato de Medroxiprogesterona) y no esteroideos (agentes antiinflamatorios y análogos).⁵⁴ En estudios previos realizados en el grupo de investigación del Dr. Bratoeff, se encontró que derivados del androstano con el anillo de 1,2,4-triazol en C-17 y ésteres alifáticos en C-3 del esteroide presentaron actividad inhibitoria sobre esta enzima.¹⁶ En otros estudios realizados por el grupo de investigación del Dr. Gobec se observó que derivados del ácido cinámico eran capaces de inhibir la actividad de esta enzima.⁵⁵ La obtención de los nuevos derivados se basó en la técnica de hibridación molecular, con la cual se esperaba actividad biológica de los compuestos sobre la enzima 17 β -HSD, no obstante, ninguno de los compuestos presentó actividad inhibitoria sobre la misma.



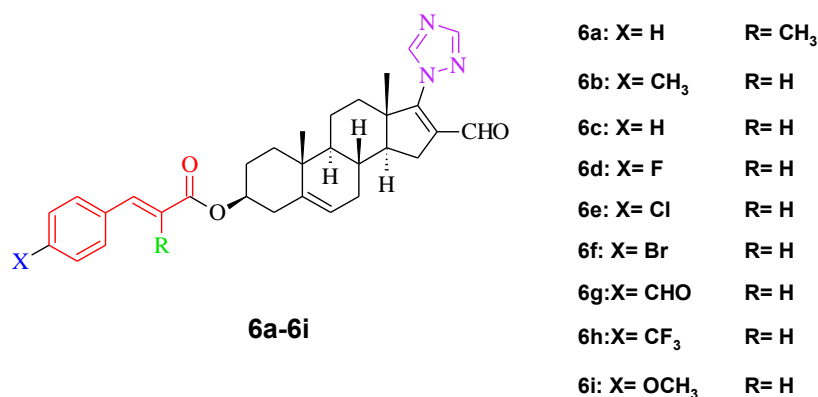
Esquema 5.3. Participación de 17β-HSD en la síntesis de DHT.

En trabajos realizados por Qiu⁵⁶ y colaboradores, considerando la estructura cristalina del complejo ternario Enzima-androstenediona-NADP, se determinaron los detalles de las interacciones responsables del reconocimiento enzimático, lo cual puede ser de utilidad para el diseño de nuevos inhibidores de esta enzima. En el complejo ternario se observó que, debido al impedimento estérico del sustrato (androstenediona), una vez que ha sido reconocido por los residuos Trp227 y Phe306, éste solo puede entrar a la cavidad del sitio de unión del sustrato con el grupo cetona del carbono C-17 orientado hacia el sitio catalítico de la enzima, y con la cara alfa orientada hacia el anillo de nicotinamida del cofactor NADP. Para los nuevos derivados obtenidos en este trabajo, se presume que el modo de unión del ligando con el sitio activo de la enzima no cumplió con este requisito aunado a que el volumen del sustituyente en C-3 impide tal interacción y por tales motivos fueron inactivos.

5.2.1.3. Ensayo de citotoxicidad de los nuevos derivados (6a-6i, 7 y 8) y de los intermediarios (4 y 5).

La evaluación del porcentaje de inhibición de la serie **6a-6i**, de los productos finales **7 y 8** y de los intermediarios **4 y 5**, se llevó a cabo en la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM, mediante el método de Sulforrodamina B⁶¹ sobre líneas celulares de cáncer de próstata humana, LNCaP (sensible a andrógenos) y PC-3 (independiente de andrógenos). Además se evaluó la actividad citotóxica de los mismos frente a cultivos primarios de macrófagos murinos (J774), mediante el modelo MTT,⁶¹ para determinar toxicidad en células normales. Los resultados están reportados como porcentaje de inhibición con su respectivo error estándar medio (EEM). Los compuestos fueron comparados con el Ketoconazol, el cual ha sido empleado en la terapia para el tratamiento de cáncer de próstata.⁶³ La Tabla 5.6 (**serie 6**), la Tabla 5.7 (productos finales **7 y 8** e intermediarios **4 y 5**) y el gráfico 5.1 muestran los valores de inhibición obtenidos a concentración 50 μM y a 25 μM, en algunos casos, para cada compuesto obtenido.

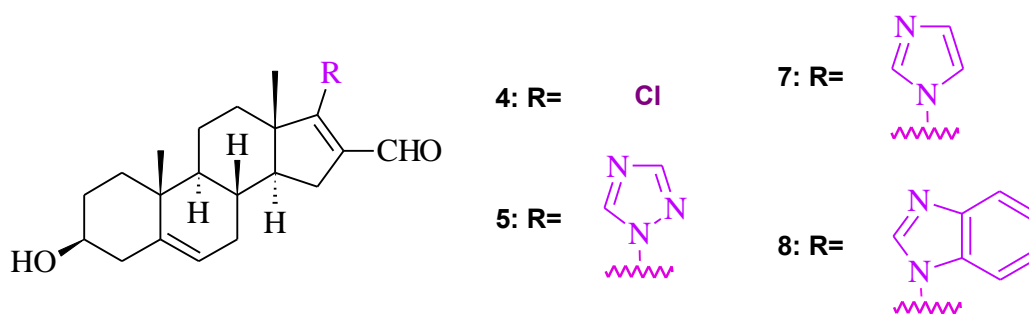
Tabla 5.6. Porcentaje de Inhibición de crecimiento promovido por los compuestos **6a-6i** y Ketoconazol sobre líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP) y células sanas (J774).



Porcentaje de inhibición a 50 μ M										
Línea Celular	Compuesto									KTZ
	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g	6h	6i	
PC-3	31.3 \pm 8.6	100	65.3 \pm 4.2	100*	84.8 \pm 15.2	44.7 \pm 15.2	100	100	NC	38.8 \pm 0.01*
LNCaP	35.8 \pm 3.4	89.4 \pm 10.6	23.8 \pm 12.2	85.9 \pm 10.0	43.0 \pm 17.7	26.0 \pm 7.3	97.8 \pm 2.1	53.8 \pm 10.7	NC	100
J774	29.3 \pm 6.9	100	96.4 \pm 2.9	100	30.4 \pm 0.5	10.6 \pm 2.1	91.9 \pm 2.1	100	NC	76.5 \pm 3.0*

NC= No citotóxico; * Concentración= 25 μ M; KTZ= Ketoconazol

Tabla 5.7. Porcentaje de inhibición de crecimiento mostrado por los compuestos **7** y **8** e intermediarios **4** y **5**, sobre líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP) y células sanas (J774).



Porcentaje de inhibición a 50 μ M					
Línea Celular	Compuesto				
	4	5	7	8	KTZ
PC-3	95.1 \pm 1.4*	68.4 \pm 6.1	71.8 \pm 6.6	93.2 \pm 6.7	38.8 \pm 0.01*
LNCaP	100*	88.6 \pm 11.2	28.7 \pm 2.8	88.7 \pm 11.3	100
J774	98.7 \pm 1.2*	46.1 \pm 2.2	89.2 \pm 5.6	58.3 \pm 2.2	76.5 \pm 3.0*

NC = No citotóxico; *Concentración=25 μ M; KTZ= Ketoconazol

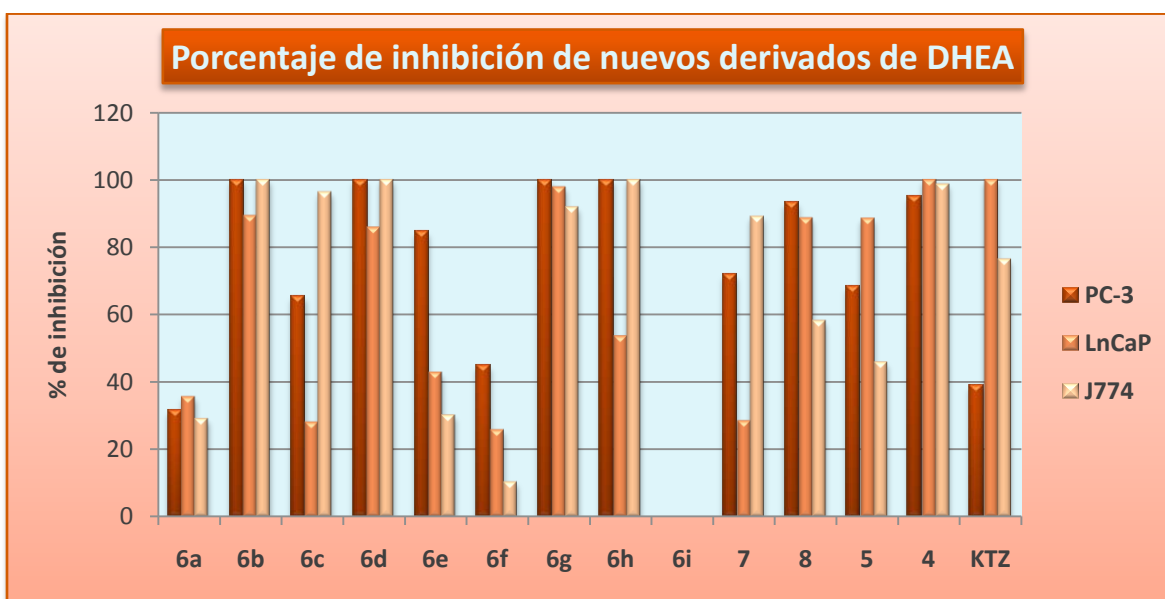


Gráfico 5.1. Porcentaje de inhibición de los nuevos derivados de DHEA sobre líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP).

Para la línea PC-3, todos los derivados, tanto intermediarios como productos finales (a excepción de **6a** y **6i**), presentaron un porcentaje de inhibición por arriba del 50%, y aquellos compuestos con una concentración de 25 μM (**6d** y **4**) tuvieron un valor superior (100% y 95%, respectivamente) al del fármaco de referencia Ketoconazol (38.8%).

Los compuestos **6b**, **6d**, **6e**, **6g**, **6h** y **8** así como el intermediario **4** mostraron un porcentaje de inhibición mayor o igual al 85%, para la línea celular PC-3, y el derivado **6e** mostró selectividad hacia esta línea celular con respecto LNCaP y J774. Estos resultados sugieren a estos nuevos derivados como candidatos en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna.

Los derivados **5**, **7** y **8**, que tienen un grupo azol, y un átomo de Cl en el caso del compuesto **4**, unido al carbono C-17 del esteroide así como el alcohol libre en C-3 mostraron buena actividad citotóxica sobre ambas líneas celulares cancerosas, siendo **4** y **8** los dos derivados más potentes de esta serie. Al revisar sus valores de Log P (Tabla 5.9) notamos que ambos compuestos fueron los que presentaron los valores más altos de este parámetro (2.39 y 3.0, respectivamente), con respecto a **5** (1.02) y **7** (1.51). Por lo tanto, se puede teorizar que la actividad de estos compuestos está relacionada con la lipofilia, siendo los derivados **4** y **8** lo suficientemente permeables para atravesar la membrana celular y llegar al sitio activo de la célula.

Para la línea LNCaP, ninguno de los compuestos presentó una potencia mayor a la del Ketoconazol (100%); no obstante, nuevamente los compuestos **6b**, **6d**, **6g**, **4**, **5** y **8** son los que presentaron la mejor actividad citotóxica (>85 % de inhibición), y en este caso el intermediario **5** fue quien presentó selectividad hacia esta línea celular con respecto a PC-3 y J774.

Al realizar un análisis más minucioso y comparar estos resultados con los reportados en el ensayo de concentración inhibitoria 50 de la enzima 5 α -reductasa 2, observamos que los compuestos que exhibieron una mejor actividad citotóxica sobre las dos líneas celulares de cáncer de próstata (**6b**, **6d**, **6e**, **6g**), son los mismos que mostraron la mejor actividad inhibitoria sobre la enzima antes mencionada. Cabe señalar que en ambas líneas celulares se expresan las tres isoformas de la enzima 5 α -reductasa,⁶⁶⁻⁶⁸ lo que sugiere que los nuevos derivados pueden estar actuando vía inhibición de esta enzima.

Con base en estas observaciones, se puede predecir que la presencia de grupos voluminosos en C-3 y C-17 del esteroide, así como la presencia de sustituyentes electroattractores en la posición *para* del anillo aromático, favorecen la actividad biológica de estos compuestos.

5.2.2. Estudios *in vivo*.

5.2.2.1. Determinación de la actividad antiandrogénica de los derivados de 1,2,4-triazol (**6a-6h**).

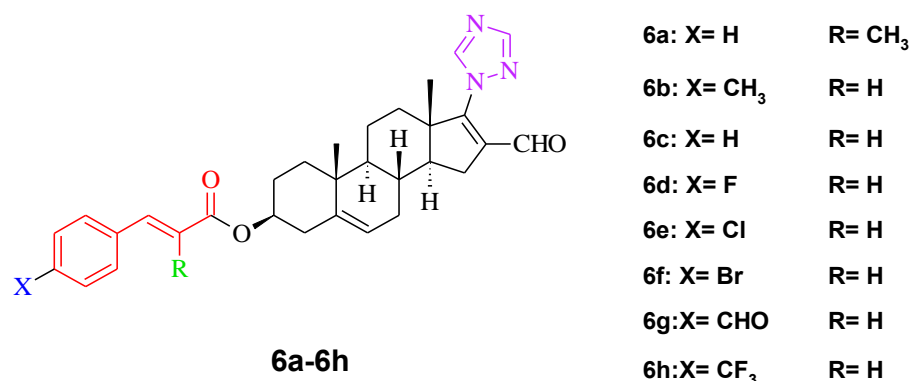
Este ensayo se llevó a cabo en el Instituto de Pruebas Biológicas en el Laboratorio de Hormonas del Departamento de Sistemas Biológicos en la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). En este estudio se emplearon hámsteres machos de la cepa *Syrian Golden* (150-200 g de peso) y se realizó en 11 grupos de 3 animales por experimento. Éstos fueron gonadectomizados 30 días antes del experimento, manteniéndolos a una temperatura controlada de 22°C y en periodos de luz-oscuridad por

12 hrs, la comida y el agua fueron suministradas *ad libitum* diariamente. Durante 6 días se administró por vía subcutánea:

- Un grupo control: 200 μL de aceite de sésamo (vehículo).
- Un segundo grupo: 200 μg de testosterona en 200 μL de aceite de sésamo
- Un tercer grupo: 200 μg de Finasterida más 200 μg de testosterona en 200 μL de aceite de sésamo.
- Ocho grupos a los cuales se les administró 200 μg de testosterona más 400 μg de los derivados de 1,2,4-triazol (**6a-6h**).

Los resultados obtenidos de este ensayo se resumen e ilustran en la tabla 5.8 y en los gráficos 5.2 (diámetro de mancha pigmentada) y 5.3 (tamaño de la próstata y vesículas seminales).

Tabla 5.8. Actividad antiandrogénica de los derivados **6a-6h**.



Tratamiento	Diámetro de la mancha pigmentada (mm)	Peso de la próstata (mg)	Peso de las vesículas seminales (mg)
CONTROL	1.95±0.8	46.2±12.2	92.8±13.8
T	3.6±1.5	83±15.96	169.1±52
T+F	3.9±0.6	69.5±23.9	110.9±33.15
T + 6a	3.5±0.32	84.18±9.1	174.25±19.4
T + 6b	4.13±1.2	72.90±10.5	173.4±30.3
T + 6c	3.16±1.15	75.5±16.74	154.7±50
T + 6d	2.5±1.35	69.33±8.64	137.8±33.3
T + 6e	2.33±1.9	74.75±25.9	177.48±19.6
T + 6f	3.5±1.5	85.0±12.0	178±24
T + 6g	2.41±1.9	93.1±35.4	183.2±22.9
T + 6h	2.7±1.26	59.43±0.7	198.3±62.5

T= Testosterona; F= Finasterida

5.2.2.1.1. Diámetro de la mancha pigmentada

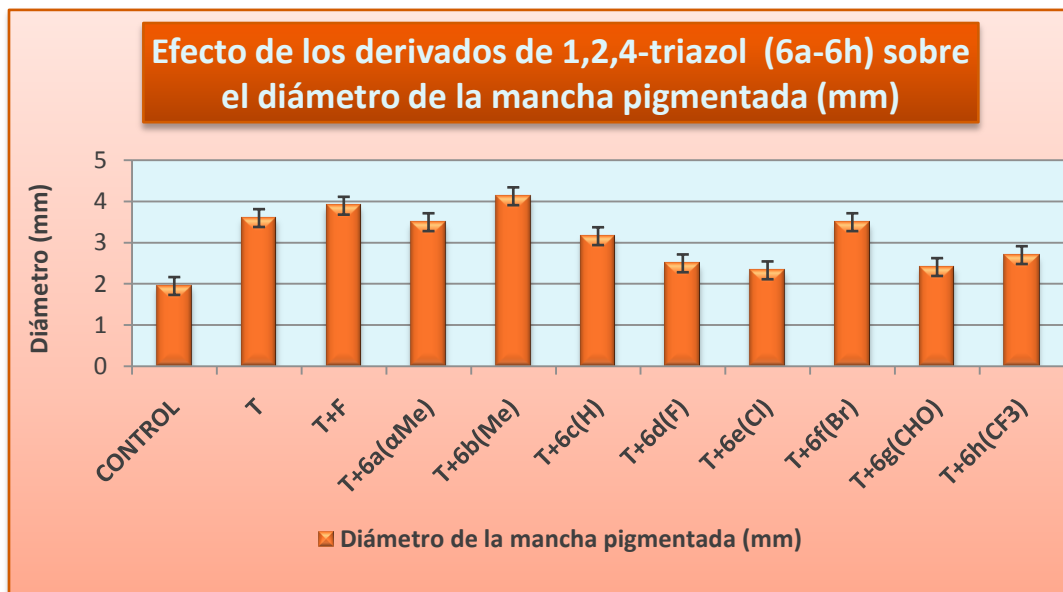


Gráfico 5.2. Actividad antiandrogénica de los compuestos **6a-6h** mediante la determinación del diámetro de la mancha pigmentada.

En este ensayo se determinó la actividad de los compuestos sobre los órganos flanco, que se encuentran en la parte dorsal de la piel del roedor y que son andrógeno-dependientes. Cuando los órganos flanco de un hámster castrado son tratados con testosterona, éstos tienden a hacerse más grandes y oscuros; la actividad de la isoforma 1 de la enzima 5α -reductasa se hace presente en esta zona. Al comparar la actividad presentada por los compuestos con respecto a la presentada por la Finasterida (Gráfico 5.2), todos (excepto **6b**), tuvieron un efecto en la disminución del diámetro de la mancha pigmentada, lo que es un indicativo de que, probablemente, estos compuestos están actuando sobre la isoenzima 1 de la 5α -reductasa.

5.2.2.1.2. Peso de la próstata y de vesículas seminales

Otros dos ensayos que se llevaron a cabo para la determinación de la actividad antiandrogénica de los nuevos derivados de DHEA, fueron la determinación del peso de la próstata y de vesículas seminales (Gráfico 5.3). En ambos órganos se encuentra activa la isoforma 2 de la enzima 5α -reductasa, pero a diferencia de la próstata, la concentración de esta isoenzima en las vesículas seminales es aproximadamente 30% menor.

La evaluación de los ocho derivados de 1,2,4-triazol (Tabla 5.8) muestra que, a excepción de **6f** y **6g**, todos tienen la capacidad de disminuir el peso de la próstata, pero solo **6h** (59.43 mg) disminuye, de manera significativa, el peso de este órgano en comparación con la Finasterida (69.5 mg). En lo concerniente al peso de las vesículas seminales solo **6c** y **6d** (154.7 mg y 137.8 mg, respectivamente) presentaron una disminución en el peso de estos órganos con respecto a los otros compuestos análogos, no obstante, su actividad no fue mejor a la reportada para la Finasterida (110.9 mg).

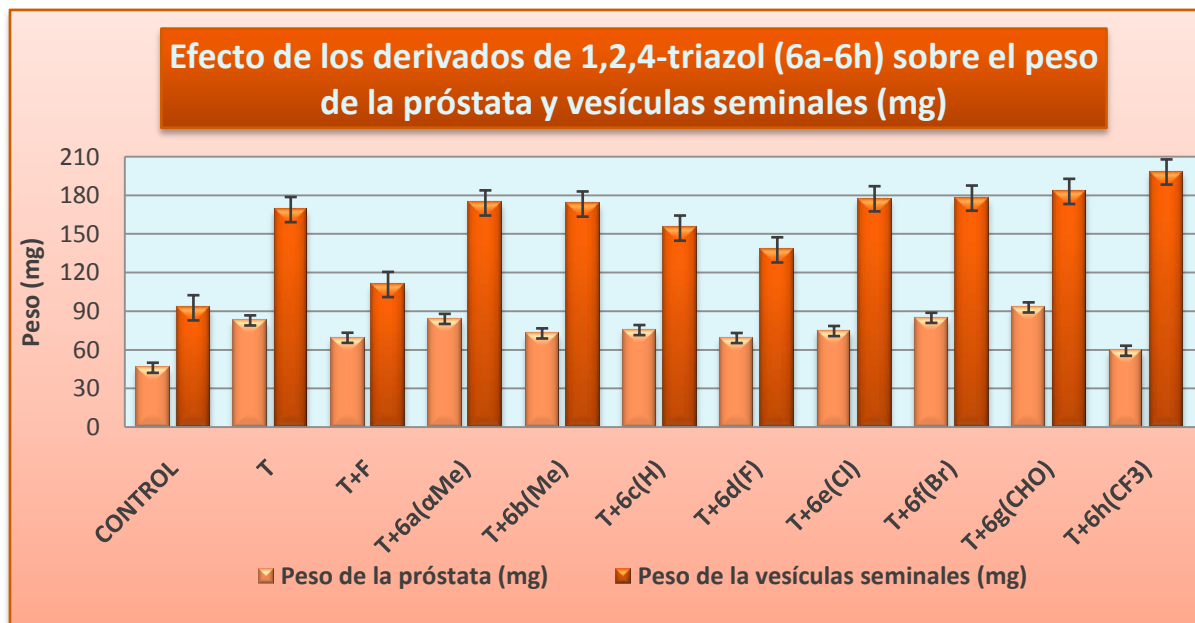


Gráfico 5.3. Actividad antiandrogénica de los compuestos **6a-6h** mediante la determinación del peso de la próstata y de vesículas seminales.

5.3. Parte computacional

Con el fin de determinar si existe una correlación entre la actividad biológica observada para los derivados **6a-6i** y algún parámetro fisicoquímico o electrónico, se llevó a cabo un análisis exploratorio computacional. Para ello se modelaron los derivados de la **serie 6** y derivados 1,2,4-triazol obtenidos en estudios previos (**T1-T6**, Tabla 2.4).⁶¹

5.3.1. Modelado molecular

Las estructuras fueron pre-optimizadas utilizando el campo de fuerza Merck (MMFF94), eligiendo al confórmero de mínima energía de cada derivado. Una vez obtenidos estos confórmeros, se optimizó nuevamente su geometría con el método semiempírico PM-6. Esta geometría se optimizó de nuevo por el método de funcionales de la densidad DFT/B3LYP 6-31G*, empleando agua como disolvente implícito en ambos casos y, posteriormente, se calcularon los descriptores QSAR.

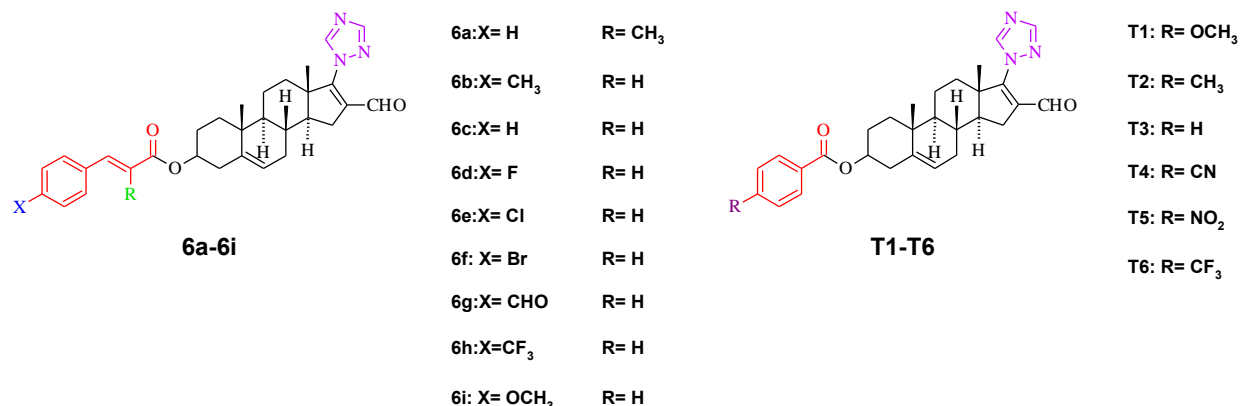
5.3.2. Análisis de los descriptores QSAR para los derivados de 1,2,4-triazol

Con el fin establecer relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) para los ensayos de citotoxicidad, se analizaron los descriptores moleculares obtenidos en los estudios de modelado molecular mediante el programa BuildQSAR^{®51} para las dos líneas celulares evaluadas (LNCaP y PC-3).

Se analizaron todos los parámetros obtenidos en función de la actividad citotóxica, expresada como porcentaje de inhibición de crecimiento (% inhibición). Se plantearon posibles ecuaciones mediante el protocolo de búsqueda sistemática, realizando primeramente el cálculo de la matriz de correlación de

los parámetros para determinar cuáles de ellos eran colineares con una relación de más del 80% y realizar simplificaciones al modelo. En la tabla 5.9 se enlistan, para las series de compuestos **6a-6i** y **T1-T6**,⁶¹ los descriptores calculados utilizando el programa *Marvin Sketch*⁶⁹, algunos fueron obtenidos de la bibliografía,⁵⁰ y el cálculo del descriptor de función condensada de Fukui (f^-), el cual se detalla en la sección 7.4.

Tabla 5.9. Descriptores QSAR para los derivados 1,2,4-triazol (**6a-6i** y **T1-T6**)



Compuesto	Log P (VG)	Log P (Klopman)	Log S	Polarizabilidad	Impedimento estérico del sustituyente en posición para del anillo aromático	Volumen de Van der Waals (Å ³)	Area polar superficial (Å ²)
6a	4.99	5.42	-6.55	57.39	1.08	490.08	74.08
6b	5.18	5.51	-6.79	57.32	3.72	490.04	74.08
6c	4.72	5.00	-6.32	55.55	1.07	473.35	74.08
6d	4.86	5.12	-6.55	55.21	0.67	478.09	74.08
6e	5.23	5.63	-6.98	54.71	0.37	487.18	74.08
6f	5.51	5.78	-7.20	58.25	0.29	491.66	74.08
6g	4.39	4.69	-6.16	57.44	2.69	492.90	91.15
6h	5.60	5.88	-7.18	56.54	3.46	504.40	74.08
6i	4.46	4.86	-6.26	58.07	4.50	499.27	83.31
T1	3.53	4.63	-5.94	54.53	4.54	471.36	83.31
T2	4.25	5.27	-6.47	53.77	3.74	462.13	74.08
T3	3.78	4.76	-5.99	52.01	1.06	445.46	74.08
T4	3.60	3.60	-6.48	54.36	1.91	462.79	97.87
T5	3.73	4.67	-5.97	53.90	2.63	469.02	119.90
T6	4.66	5.65	-6.87	53.03	3.47	476.52	74.08

VG= Viswanadhan and Ghose

Compuesto	Refractividad molar	E_s^{50}	Momento dipolar (Debye)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	f en el nitrogeno 4 del anillo de triazol	Hammett ⁵⁰ (σ)
6a	161.85	0.0	8.8257	-0.35062	-0.04380	0.00278	0.0
6b	162.53	-1.24	10.7905	-0.34506	-0.04325	0.00091	-0.170
6c	157.49	0.0	9.5521	-0.35024	-0.04389	0.00626	0.0
6d	157.71	-0.46	7.7161	-0.35029	-0.04343	0.00774	0.062
6e	162.30	-0.97	7.3426	-0.35029	-0.04276	0.00358	0.227
6f	165.11	-1.16	7.2049	-0.35039	-0.04230	0.00401	0.232
6g	167.04	N/R	5.6047	-0.35048	-0.04939	0.00880	0.42
6h	163.46	-2.40	5.9860	-0.35067	-0.05114	0.00895	0.540
6i	163.95	-0.55	10.483	-0.33521	-0.04304	0.0001	-0.268
T1	154.21	-0.55	9.3979	-0.23888	-0.08405	0.00151	-0.268
T2	152.79	-1.24	9.8783	-0.23946	-0.08420	0.00939	-0.170
T3	147.74	0.0	9.0753	-0.23975	-0.08450	0.01085	0.0
T4	173.51	-0.51	4.8324	-0.24042	-0.08940	0.01302	0.660
T5	155.07	-2.52	4.9009	-0.35111	-0.07172	0.03354	0.778
T6	153.72	-2.40	5.3922	-0.24042	-0.08325	0.01353	0.540

N/R= No reportado

5.3.2.1. PC-3, cáncer de próstata independiente de andrógenos.

En el análisis de matriz de correlación (datos no mostrados), el descriptor que tuvo una mayor relación con la actividad citotóxica fue solo el descriptor de Hammett (σ), para el cual se muestran las ecuaciones de correlación encontradas para esta línea celular.

$$\% \text{ Inhibición} = 83.8173 (\pm 50.9592) \sigma + 48.0133 (\pm 19.1214) \dots \text{Ec. 1.}$$

$$(n=15, r^2=0.702, F= 12.617, Q_2= 0.322)$$

La correlación de la actividad observada contra la pronosticada se muestra en el gráfico 5.4. En éste se percibe que los compuestos **6b** y **6d** se encuentran lejos de la línea de tendencia de regresión, siendo el compuesto **6b** el que más se aleja de la misma; al excluir este compuesto del análisis, se observó una mejora en el mismo, la ecuación 2 describe este modelo.

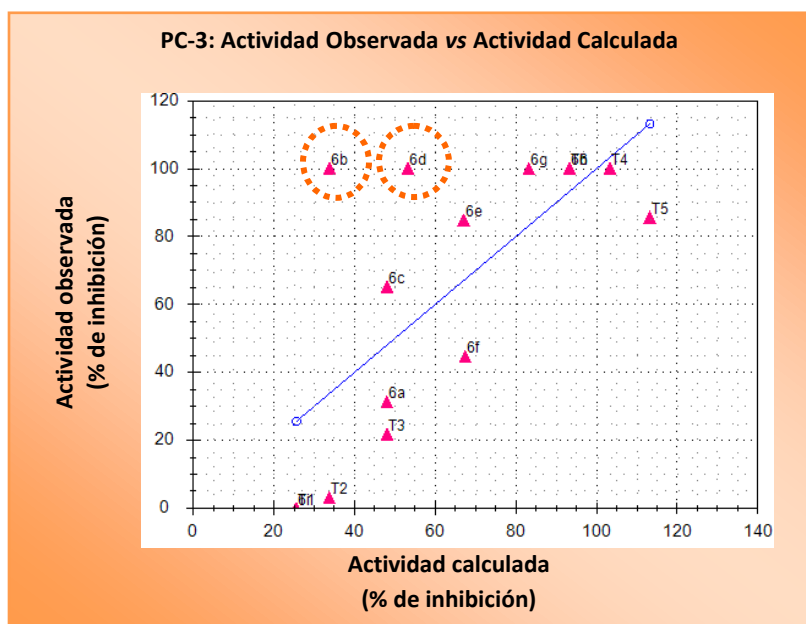


Gráfico 5.4. Correlación entre actividad observada vs actividad calculada obtenida de ecuación 1.

$$\% \text{ Inhibición} = +99.5778 (\pm 42.3319) \sigma + 40.1830 (\pm 16.3256) \dots \text{Ec. 2.}$$

$$(n = 14; r^2 = 0.829; F = 26.273; Q2 = 0.577)$$

En esta ecuación se percibe que al excluir el compuesto **6b** el modelo mejoró considerablemente en cuanto a la colinealidad haciéndose evidente que, nuevamente, el parámetro de Hammet es el que sigue correlacionando de manera positiva con la actividad biológica observada para la línea celular PC-3. Si en esta ocasión se excluye el compuesto **6d**, obtenemos el siguiente modelo:

$$\% \text{ Inhibición} = +104.6905 (\pm 33.3403) \sigma + 34.9983 (\pm 13.3309) \dots \text{Ec. 3.}$$

$$(n = 13; r^2 = 0.902; F = 47.766; Q2 = 0.730)$$

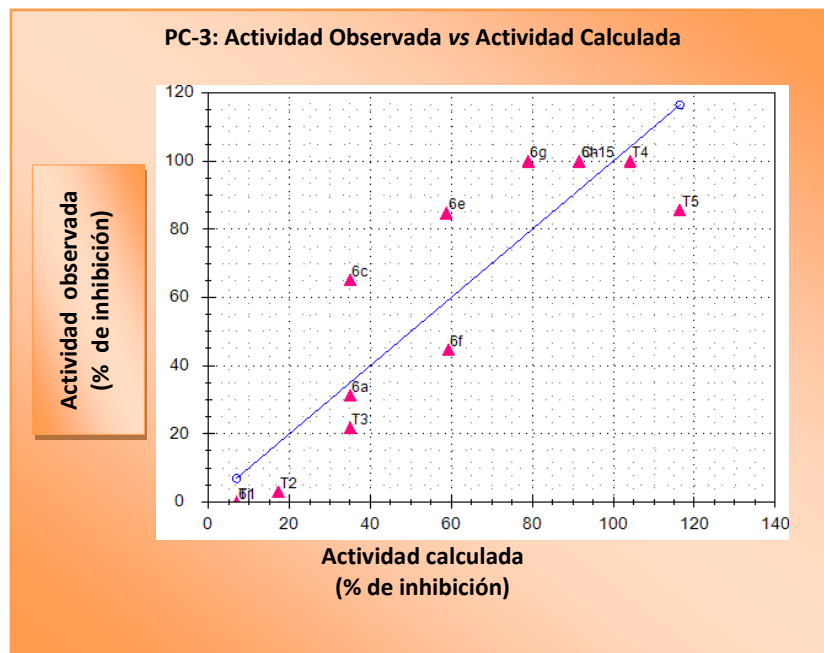


Gráfico 5.5. Correlación entre actividad observada vs actividad calculada obtenida de ecuación 3.

De acuerdo con los tres modelos obtenidos anteriormente (Ec.1-Ec.3), se hace evidente que el efecto predominante de los compuestos en la actividad biológica de los mismos es meramente electrónico. Revisando los coeficientes de correlación de actividad biológica observada *versus* la actividad calculada para cada uno de ellos, la constante de Hammet (σ) es la que presentó mayor significancia con la actividad biológica. Si se grafica este parámetro *versus* la actividad biológica observada se obtiene la siguiente correlación (Gráfico 5.6):

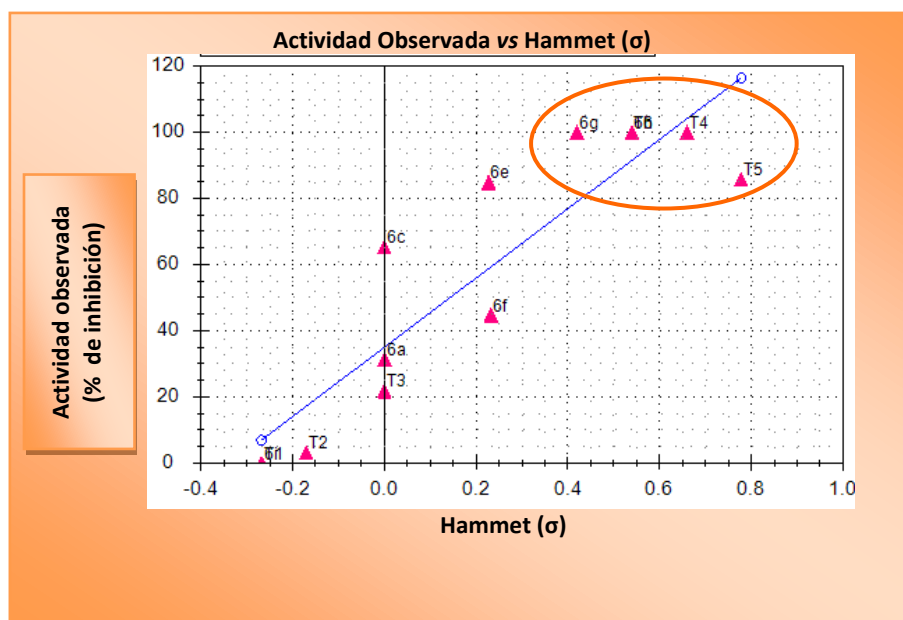


Gráfico 5.6. Correlación de actividad biológica observada contra constante de Hammet (σ).

Con base en este gráfico (5.6) y los dos previos (5.4 y 5.5), se observa claramente que aquellos compuestos con un valor de σ mayor a 0.4 (parte superior derecha), son los que presentaron una mayor actividad inhibitoria en el crecimiento sobre la línea celular PC-3, teniendo en común que todos presentan grupos electroattractores, además de que conforme aumenta la fuerza electroattractora de éstos también aumenta la actividad biológica sobre esta línea celular. Es posible que en este caso se esté llevando una interacción π - π (π -stacking en inglés) entre el anillo del cinamato en C-3 con un residuo aromático, como lo es la fenilalanina, tirosina o triptofano, en el hipotético sitio receptor. Asimismo, se sabe que la fuerza de este tipo de interacción es directamente proporcional al carácter electroattractor de uno de los sustituyentes sobre uno de los anillos aromáticos que están próximos entre sí.⁷⁵

5.3.2.2. LNCaP, cáncer de próstata sensible a andrógenos.

Para llevar a cabo el análisis QSAR de esta línea celular únicamente se consideraron los compuestos de la serie **6a-6i**. En este caso, de acuerdo a la matriz de correlación, el descriptor que tuvo una mejor correlación con la actividad citotóxica fue el descriptor de la función condensada de Fukui (f^-). Las ecuaciones de correlación generadas del análisis se muestran a continuación:

$$\% \text{ Inhibición} = + 4791.4363 (\pm 7953.3764) f(-) + 28.1495 (\pm 45.4651) \dots \text{Ec. 4.}$$

$$(n = 9; r^2 = 0.474; F = 2.030; Q_2 = \text{No Pred})$$

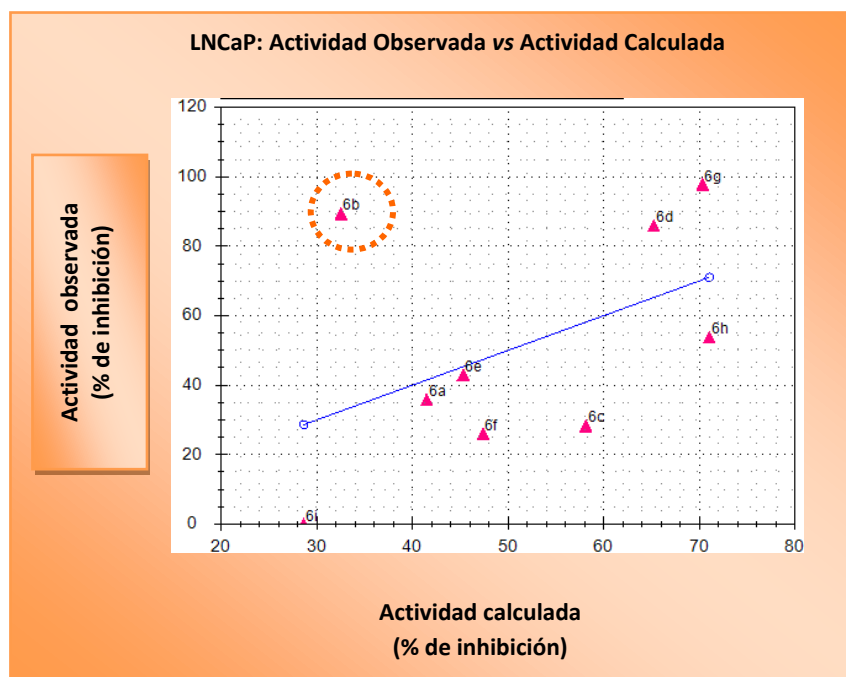


Gráfico 5.7. Correlación de actividad observada vs actividad calculada obtenida de ecuación 4.

En el gráfico 5.7 se observa que el compuesto **6b** se aleja considerablemente de la línea de correlación. Al eliminar este compuesto del modelo se percibe el siguiente cambio en la ecuación del mismo (Ec. 5):

$$\% \text{ Inhibición} = + 8317.9846 (\pm 5833.8250) f(-) + 2.4268 (\pm 35.3219) \dots \text{Ec.5.}$$

$$(n = 8; r^2 = 0.818; F = 12.173; Q2 = 0.427)$$

Este segundo modelo muestra que el principal parámetro de correlación con la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre la línea celular LNCaP es el índice y/o función de Fukui (parámetro que mide la capacidad de reactividad de una molécula o un sitio en particular de ésta frente a un agente nucleofílico f^+ , electrofílico f^- o radicalario f^0)⁵⁸⁻⁶⁰ del nitrógeno de la posición cuatro (N-4) del anillo 1,2,4-triazol. A todos los átomos de la molécula se les determinó este valor (datos no mostrados) encontrándose que este átomo fue el que presentó un valor de mayor significancia. Este modelo sugiere que, de manera general, los sustituyentes con carácter electroattractor en la posición *para* del anillo aromático de las nuevas moléculas influyen en el aumento de la densidad electrónica en el átomo de nitrógeno (N-4) del 1,2,4-triazol, haciéndolo, posiblemente, capaz de formar puentes de hidrógeno de una manera más efectiva, por ejemplo, con residuos de cisteína o tirosina que son donadores de puentes de hidrógeno en un hipotético sitio receptor, aunque es necesario ampliar la biblioteca de compuestos sobre esta línea celular para corroborar esta declaración. El gráfico 5.8 ilustra la correlación de la función de Fukui con la actividad biológica observada.

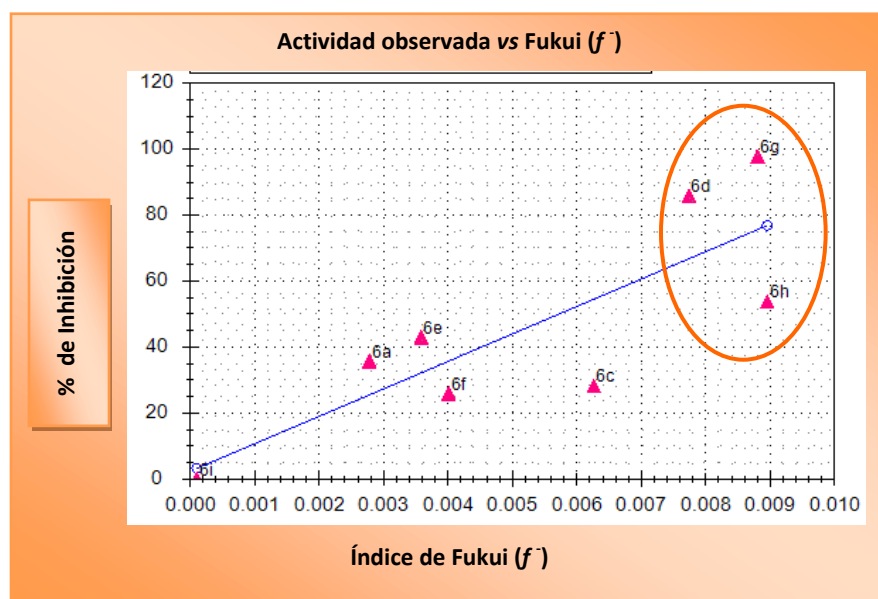


Gráfico 5.8. Correlación de actividad biológica observada vs índice de Fukui (f^-).

6. Conclusiones

Se obtuvieron once nuevos derivados de la deshidroepiandrosterona (**6a-6i, 7 y 8**), los cuales fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas (IR, $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$) y espectrométricas (EM).

La presencia de ésteres aromáticos *para* sustituidos con grupos electroattractores, unidos al C-3 del núcleo esteroidal, es esencial para la inhibición de la actividad catalítica de la enzima 5α -reductasa tipo 2.

Todos los compuestos finales (**6a-6i, 7 y 8**) y los intermediarios (**4 y 5**) fueron evaluados *in vitro* sobre líneas celulares mediante el ensayo de porcentaje de inhibición del crecimiento. De manera general, se observó que la presencia de grupos electroattractores en la posición *para* en el anillo aromático del cinamato o el alcohol libre en la posición C-3 favorece su actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP).

Los derivados de la **serie 6** fueron sometidos a estudios *in vivo* para determinar su actividad antiandrogénica. De acuerdo a los resultados obtenidos, estos compuestos, aparentemente, actúan vía inhibición de las dos isoformas de la enzima 5α -reductasa.

Empleando herramientas de la química computacional se pudo determinar que, para los derivados de 1,2,4-triazol presentados en este trabajo junto con los presentados en estudios previos, el parámetro de Hammet (σ) está directamente relacionado con la actividad biológica mostrada por los compuestos. Derivados con valor $\sigma > 0.4$ tuvieron una mejor actividad para PC-3.

Los derivados que cumplen con el punto anterior fueron aquellos que en su estructura cuentan con grupos electroattractores, además de que la fuerza de éstos está directamente relacionada con la actividad biológica, es decir, entre mayor es la fuerza electroattractora del grupo sustituyente mayor es la actividad citotóxica en la línea celular PC-3.

Asimismo, para la línea celular LNCaP el parámetro que mejor correlacionó con la actividad citotóxica de los derivados fue la función de Fukui (f^-), ya que derivados con valores de $f^- > 0.75$ fueron los más activos en esta línea celular de CaP.

Finalmente, con los resultados obtenidos de actividad biológica y de análisis QSAR se puede concluir, de manera general, que los principales factores implicados en la actividad biológica de los nuevos derivados de DHEA son electrónicos. No obstante, es necesario aumentar la biblioteca de compuestos para llevar a cabo un análisis más detallado en estudios posteriores.

7. Metodología Experimental

7.1. Reactivos y equipo

Todas las materias primas empleadas se obtuvieron comercialmente en grado reactivo y se utilizaron sin purificar.

Para la evaporación de los disolventes se empleó un rotaevaporador G1 Heidolph modelo 02389372. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C se realizaron en un aparato Varian VxR-300S (400 MHz) y Varian 300 (75 MHz), respectivamente. Como referencia interna se empleó tetrametilsilano (TMS) y cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente.

Los desplazamientos químicos están reportados en ppm (δ) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz); la multiplicidad de las señales se expresa como s=simple, d= señal doble, dd= señal doble de doble y m= señal múltiple.

La espectroscopía de infrarrojo (IR) se determinó en un aparato Perkin Elmer Spectrum 400, FT-IR/FT-FIR mediante la técnica de Reflectancia por ATR. Las unidades se reportan en cm^{-1} .

Los espectros de masas se determinaron por la técnica de ionización de bombardeo de átomos rápidos (FAB por sus siglas en inglés) en un espectrómetro de masas Termo-Electron modelos DFS (por sus siglas en inglés, Double Focus Sector) empleando alcohol 3-nitrobencílico como matriz interna; la introducción de la muestra fue mediante sonda directa a una temperatura menor a 50°C , detectando los iones positivos. El ión molecular se indica como $[\text{MH}]^+$ y la nomenclatura m/z = masa/carga se reporta con su respectiva abundancia relativa (AR).

7.1.1. Cromatografía

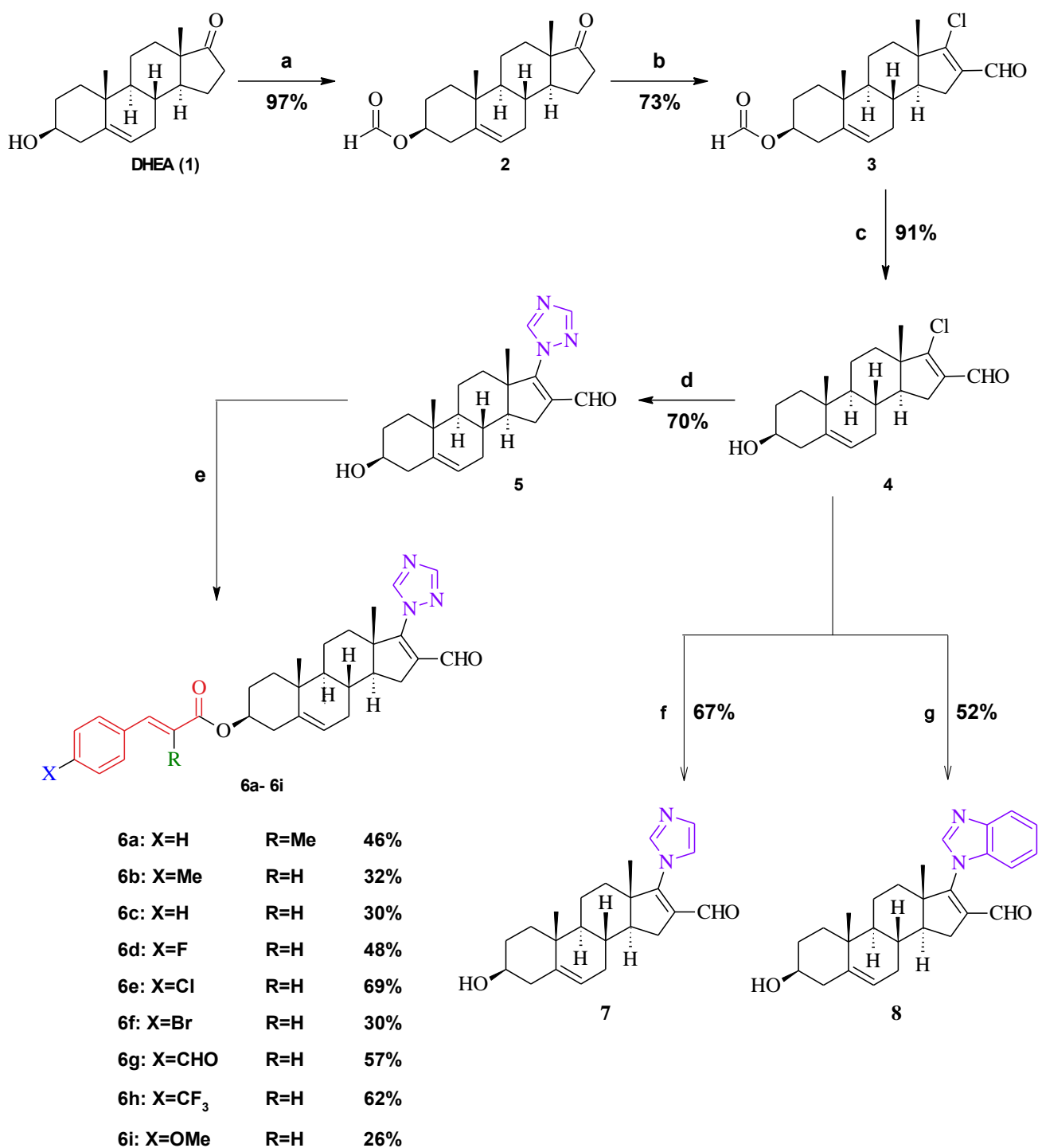
Para la cromatografía abierta en columna se empleó como fase estacionaria gel de sílice 60 (Aldrich[®]) y/o Fluorisil 200 (Aldrich[®]).

Los análisis cromatográficos se realizaron mediante técnicas convencionales, empleando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice marca Aldrich[®] con 0.2 mm de espesor. La visualización de las mismas se realizó con ayuda de una cámara de luz UV y, posteriormente, se revelaron con una solución de cloruro de cobalto al 2% en H_2SO_4 2N. Los sistemas de elución se muestran en la 7.1.

Tabla 7.1. Sistemas de elución empleados en cromatografía en capa fina CCF

Sistema	Mezcla de disolventes	Proporción
I	Hexano: Acetato de Etilo	6:4
III	Hexano: Acetato de Etilo	8:2
III	Hexano: Acetato de Etilo	1:1
IV	Acetato de Etilo	----

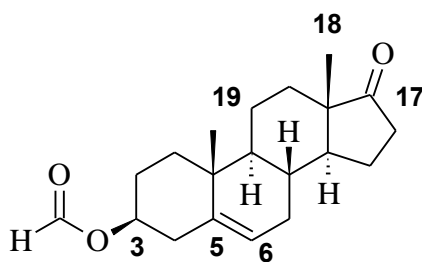
7.2. Descripción de la ruta de síntesis



Esquema 6.1. Reactivos y condiciones de síntesis. a) Ácido fórmico, 40°C, 45 min.; b) POCl₃/DMF, CHCl₃, 80°C, 10 h; c) H₂SO₄, CH₃COCH₃ /H₂O, 90°C, 2.5 h; d) 1,2,4-triazol, Na₂CO₃, DMF, 70°C, 5.5 h; e) *trans*-XC₆H₄CH=CR-COOH, DCC, DMAP, CHCl₃, 2h; f) 1,3-imidazol, Na₂CO₃, DMF, 80°C, 6 h; g) Benzimidazol, Cs₂CO₃, DMF, 60°C, 2h.

7.2.1. Método para la obtención de 3β-(formiloxi)-androst-5-en-17-ona (2).

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se hizo reaccionar 1 g (3.5 mmol) de deshidroepiandrosterona (**1**) en 10 mL (3 mmol) de ácido fórmico a una temperatura de 40°C. Transcurridos 45 minutos se vació sobre 100 mL de agua, dando lugar a la formación de un precipitado blanco el cual se filtró, se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio y se secó mediante sistema de vacío obteniendo un polvo blanco, el cual se utilizó en la reacción posterior.



Aspecto: polvo blanco fino

Rendimiento: 97% $R_f = 0.40$ (Sistema I)

p.f. = 143-145 °C

Fórmula molecular: C₂₀H₂₈O₃

Peso molecular (uma): 316

IR (Espectro 1, FTIR-ATR, cm⁻¹): 2964.45, 2941.61, 2890.43, 2824.65 (C-H alifático); 1736.86 (C=O cetona); 1702.53 (C=O formiato); 1172.75 (C-O).

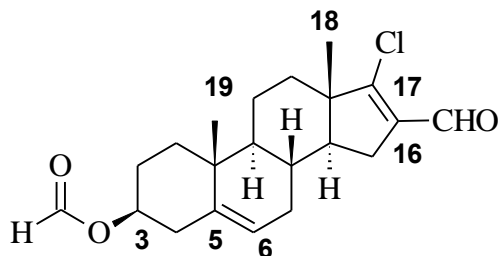
RMN-¹H (Espectro 2, CDCl₃, δ ppm): 8.03 (s, 1H, 3-CHOOR); 5.42 (d, *J*=4.7 Hz, 1H, H-6); 4.77-4.69 (m, 1H, H-3); 1.05 (s, 3H, H-19); 0.89 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 3, CDCl₃, δ ppm): 221.06 (17-C=O); 160.71 (3-COOR); 139.72 (C-5); 122.36 (C-6); 73.81 (C-3); 19.47 (C-19); 13.69 (C-18).

EM (Espectro 4, FAB⁺, *m/z*): 317 [M+1], 4% AR.

7.2.2. Método para la obtención de 3β-formiloxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (3).

En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 50 mL adaptado a un sistema de reflujo, con agitación magnética y en condiciones anhidras, se colocaron 5 mL (53.6 mmol) de oxicluro de fósforo y 5 mL de *N,N*-dimetilformamida anhidra (DMF, 64.6 mmol), los cuales se agregaron lentamente; esta mezcla de reacción se mantuvo en agitación y, transcurridos 10 minutos, se agregó, de manera lenta, 1 g (3.2 mmol) del compuesto 2 disuelto en 10 mL de cloroformo. La mezcla se calentó a 80°C por 10 horas. Posteriormente se retiró el calentamiento, se dejó enfriar, se diluyó con 100 mL de cloroformo y se depositó sobre 200 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio con agitación vigorosa. La fase orgánica se extrajo, se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (3x100 mL) y agua (3x 100 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro y se purificó mediante columna de gel de sílice, eluyendo por gradiente con una mezcla de hexano-acetato de etilo.



Aspecto: sólido blanco cristalino

Rendimiento: 73% $R_f = 0.56$ (Sistema II)

p.f. = 168-169 °C

Fórmula molecular: $C_{21}H_{27}ClO_3$

Peso molecular (uma): 362

IR (Espectro 5, FTIR-ATR, cm^{-1}): 2952.66, 2922.09, 2905.63, 2893.77, 2866.14, 2854.18, 2830.75 (C-H alifático); 2730.23 (C-H formilo); 1712.49 (C=O formiato); 1665.69 (C=O α,β insaturado); 1584.80 (C=C); 1164.75 (C-O).

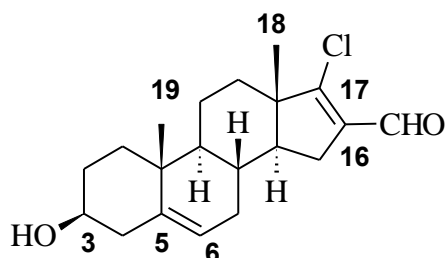
RMN-¹H (Espectro 6, $CDCl_3$, δ ppm): 9.98 (s, 1H, CHO); 8.03 (s, 1H, 3-CHOOR); 5.41 (d, $J=4.7$ Hz, 1H, H-6); 4.77-4.69 (m, 1H, H-3); 1.07 (s, 3H, H-19); 0.89 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 7, $CDCl_3$, δ ppm): 188.17 (16-CHO); 162.36 (C-17); 160.68 (3-COOR); 139.79 (C-5); 136.56 (C-16); 122.32 (C-6); 73.74 (C-3); 19.34 (C-19); 15.12 (C-18).

EM (Espectro 8, FAB^+ , m/z): 363 $[M+1]^+$, 2% AR, 365 $[M+3]^+$, 0.5% AR.

7.2.3. Método para la obtención de 3β-hidroxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (4).

En un matraz de fondo redondo de 150 mL con agitación continua, se pesaron 1.290 g (3.6 mmol) del compuesto **3**, se agregaron 80 mL de acetona y 10 mL de agua; esta mezcla de reacción se colocó sobre un baño de hielo-agua donde se adicionaron, lentamente, 8 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, se calentó a 90°C durante 2.5 horas, después de las cuales se dejó enfriar y se vació sobre 300 mL de agua, formándose un precipitado blanco que se filtró y secó por sistema de vacío.



Aspecto: polvo blanco fino

Rendimiento: 91% $R_f = 0.5$ (Sistema I)

p.f. = 109-111 °C

Fórmula molecular: $C_{20}H_{27}ClO_2$

Peso molecular (uma): 334

IR (Espectro 9, FTIR-ATR, cm^{-1}): 3417.55 (O-H); 2935.27-2850.11 (C-H alifático); 2743.03 (C-H formilo); 1666.23 (C=O α,β insaturado); 1585.14 (C=C).

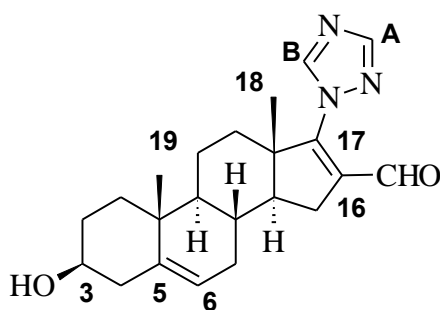
RMN-¹H (Espectro 10, $CDCl_3$, δ ppm): 9.98 (s, 1H, CHO); 5.36 (s, 1H, H-6); 3.59-3.44 (m, 1H, H-3); 1.05 (s, 3H, H-19); 0.99 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 11, $CDCl_3$, δ ppm): 188.23 (16-CHO); 162.49 (C-17); 141.22 (C-5); 136.59 (C-16); 121.04 (C-6); 71.71 (C-3); 19.45 (C-19); 15.13 (C-18).

EM (Espectro 12, FAB⁺, *m/z*): 335 [M+1]⁺, 4% AR; 337 [M+3]⁺, 1.2% AR.

7.2.4. Método para la obtención de 3β-hidroxi-17-(1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (5).

En un matraz de fondo redondo de 25 mL, acondicionado a agitación continua y con trampa de humedad, se hicieron reaccionar 829 mg (1.2 mmol) de 1,2,4-triazol y 1.272 g (1.2 mmol) de carbonato de sodio en 5 mL de *N,N*-dimetilformamida anhidra. Transcurridos 10 minutos se agregó 1 g (3 mmol) del compuesto **4** y se calentó a 70°C durante 5.5 horas, se vació sobre 50 mL de una mezcla agua-hielo obteniendo un precipitado amarillo, el cual se filtró y se sometió a purificación mediante cromatografía en columna de fluorisil, eluyendo por gradiente con una mezcla de hexano-acetato de etilo.



Aspecto: polvo blanco.

Rendimiento: 70% $R_f = 0.55$ (Sistema III)

p.f. = 229-230 °C

Fórmula molecular: C₂₂H₂₉N₃O₂

Peso molecular (uma): 367

IR (Espectro 13, FTIR-ATR, cm⁻¹): 3300.96 (O-H); 3112.27, 3104.31 (=C-H); 2963.60, 2937.70, 2905.75, 2862.74 (C-H alifático); 1665.77 (C=O α,β insaturado); 1618.30 (C=C).

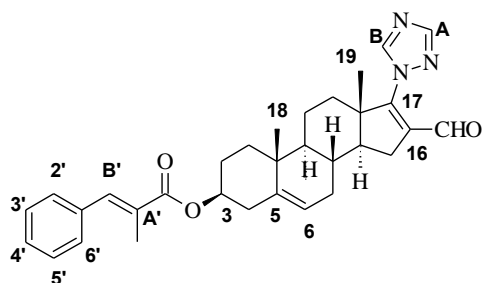
RMN-¹H (Espectro 14, CDCl₃, δ ppm): 10.11 (s, 1H, CHO); 8.41 (s, 1H, H-B); 8.11 (s, 1H, H-A); 5.38 (d, *J*=3.6 Hz, 1H, H-6); 3.63-3.40 (m, 1H, H-3); 1.19 (s, 3H, H-19); 1.06 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 15, CDCl₃, δ ppm): 189.24 (16-CHO); 156.91 (C-17); 153.18 (C-A); 153.18 (C-B); 141.20 (C-5); 132.50 (C-16); 120.98 (C-6); 71.66 (C-3); 19.44 (C-19); 16.12 (C-18).

EM (Espectro 16, FAB⁺, *m/z*): 368 [M+1]⁺, 2% AR.

7.2.5. Método general para la obtención de los derivados 3β-cinamoiloxi-17-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6a-6i).

En un matraz de fondo redondo de 25 mL se pesaron 186 mg de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 0.9 mmol), 110 mg de 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0.9 mmol) y 0.9 mmol del ácido 4-cinámico con el patrón de sustitución deseado, se agregaron 10 mL de cloroformo y se puso en agitación. Transcurridos 10 minutos, se agregaron de manera lenta 100 mg (0.3 mmol) del compuesto **5**. La reacción se monitoreó por aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente después de las cuales se eliminó el disolvente, se agregaron 25 mL de acetato de etilo, se agitó durante 20 minutos más y el precipitado obtenido (exceso de DCU) se filtró por gravedad. La fase líquida se lavó con solución de ácido clorhídrico al 5% v/v (4x15 mL), solución saturada de bicarbonato de sodio (4x15 mL) y agua (4x15 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El sólido obtenido se recrystalizó de cloroformo-metanol (compuestos **6a,6c-6g**) y/o se sometió a cromatografía en columna de fluorisil, eluyendo por gradiente con mezcla de hexano-acetato de etilo (compuestos **6b, 6h, 6i**).

7.2.5.1. 3β-(α-metilcinamoiloxi)-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6a).


Aspecto: polvo fino blanco.

Rendimiento: 46% $R_f = 0.40$ (Sistema I)

p.f. = 195-197 °C

Fórmula molecular: C₃₂H₃₇N₃O₃

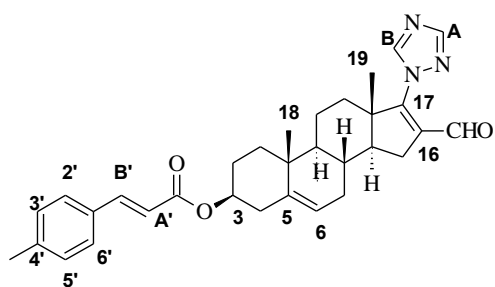
Peso molecular (uma): 511

IR (Espectro 17, FTIR-ATR): 3123.36 (=C-H); 2978.69-2841.79 (C-H alifático); 1705.58 (C=O éster); 1660.93 (C=O formilo); 1615.14 (C=C); 1252.39 (C-C); 1198.74 (C-O); 770.23 (benceno monosustituido).

RMN-¹H (Espectro 18, CDCl₃, δ ppm): 10.11 (s, 1H, CHO); 8.42 (s, 1H, H-B); 8.12 (s, 1H, H-A); 7.67 (s, 1H, H-B'); 7.39 (d, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'); 7.32 (t, 1H, H-4'); 5.45 (d, *J*=4.0 Hz, 1H, H-6); 4.75 (m, 1H, H-3); 2.10 (s, 3H, α-CH₃); 1.20 (s, 1H, H-19); 1.12 (s, 1H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 19, CDCl₃, δ ppm): 189.20 (16-CHO); 168.15 (3-COOR); 156.87 (C-17); 153.18 (C-A); 143.80 (C-B); 140.20 (C-16); 138.70 (C-B'); 136.08 (C-1'); 132.46 (C-5); 129.74 (C-3', C-5'); 128.96 (C-2', C-6'); 128.47 (C-4'); 128.36 (C-6); 121.91 (C-A'); 74.21 (C-3); 20.60 (C-19); 16.10 (C-18); 14.22 (α-CH₃).

EM (Espectro 20, FAB⁺, *m/z*): 512 [M+1]⁺, 100% AR; 145 [C₆H₅-CH=CH(CH₃)-CO]⁺, 9% AR.

7.2.5.2. 3β-(4-metilcinamoiloxi)-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6b).


Aspecto: polvo blanco compacto.

Rendimiento: 32% $R_f = 0.44$ (Sistema I)

p.f. = 225-227 °C

Fórmula molecular: C₃₂H₃₇N₃O₃

Peso molecular (uma): 511

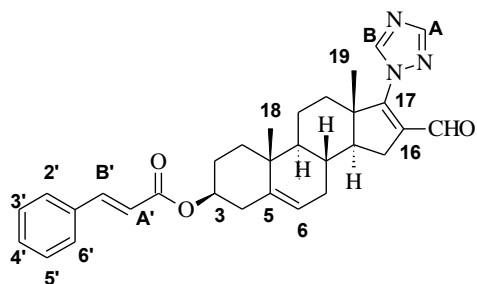
IR (Espectro 21, FTIR-ATR): 3123.71 (=C-H); 2930.19-2855.64 (C-H alifático); 1708.32 (C=O éster); 1680.88 (C=O formilo); 1633.72 (C=C); 1205.26 (C-O); 1171.77 (C-C); 814.96 (benceno 1,4-disustituido).

RMN-¹H (Espectro 22, CDCl₃, δ ppm): 10.11 (s, 1H, CHO); 8.42 (s, 1H, H-B); 8.12 (s, 1H, H-A); 7.65 (d, 1H, *J*=16.0 Hz, H-B'); 7.42 (d, *J*=8.1 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.18 (d, *J*=8.0 Hz, 2H, H-3', H-5'); 6.37 (d, *J*=16.0 Hz, 1H, H-A'); 5.44 (d, *J*=5.0 Hz, 1H, H-6); 4.74 (m, 1H, H-3); 2.37 (s, 3H, Ar-CH₃); 1.20 (s, 3H, H-19); 1.11 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 23, CDCl₃, δ ppm): 189.18 (16-CHO); 166.68 (3-COOR); 156.88 (C-17); 153.20 (C-A); 144.71 (C-B'); 140.77 (C-B, C-16); 140.19 (C-5); 132.5 (C-4'); 131.87 (C-1'); 129.74 (C-3', C-5'); 128.17 (C-2', C-6'); 121.94 (C-6); 117.57 (C-A'); 73.40 (C-3); 20.61 (C-19); 19.40 (Ar-CH₃); 16.11 (C-18).

EM (Espectro 24, FAB⁺, *m/z*): 512 [M+1]⁺, 79% AR; 145 [4-CH₃-C₆H₄-CH=CH-CO]⁺, 100% AR.

7.2.5.3. 3β-(cinamoiloxi)-17-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6c).



Aspecto: polvo fino blanco.

Rendimiento: 30% $R_f = 0.42$ (Sistema I)

p.f. = 189-191 °C

Fórmula molecular: C₃₁H₃₅N₃O₃

Peso molecular (uma): 497

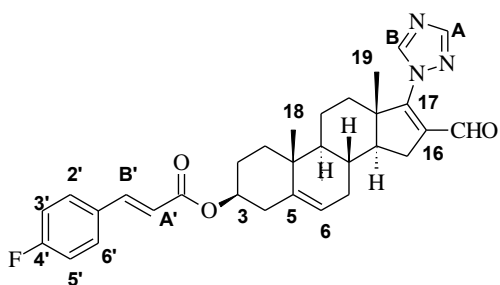
IR (Espectro 25, FTIR-ATR): 3137.91 (=C-H); 2985.19-2841-34 (C-H alifático); 1708.96 (C=O éster); 1661.97 (C=O formilo); 1614.57 (C=C); 1202.70 (C-O); 1173.56 (C-C); 772.01 (benceno monosustituido).

RMN-¹H (Espectro 26, CDCl₃, δ ppm): 10.12 (s, 1H, CHO); 8.42 (s, 1H, H-B); 8.12 (s, 1H, H-A); 7.67 (d, 1H, *J*=16.0 Hz, H-B'); 7.52 (d, *J*=3.5 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.38 (s, 2H, H-3', H-4', H-5'); 6.42 (d, *J*=16.0 Hz, 1H, H-A'); 5.45 (s, 1H, H-6); 4.76 (m, 1H, H-3); 1.21 (s, 3H, H-19); 1.11 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 27, CDCl₃, δ ppm): 189.16 (16-CHO); 166.49 (3-COOR); 156.88 (C-17); 153.21 (C-A); 144.70 (C-B'); 143.82 (C-B); 140.16 (C-16); 134.62 (C-5); 132.51 (C-1'); 130.36 (C-4'); 129.02 (C-3', C-5'); 128.18 (C-2', C-6'); 121.99 (C-6); 118.70 (C-A'); 73.86 (C-3); 20.62 (C-19); 16.12 (C-18).

EM (Espectro 28, FAB⁺, *m/z*): 498[M+1]⁺, 100% AR; 131 [C₆H₅-CH=CH-CO]⁺, 47% AR.

7.2.5.4. 3β-(4-fluorcinamoiloxi)-17-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6d).



Aspecto: sólido blanco cristalino.

Rendimiento: 48% $R_f = 0.43$ (Sistema I)

p.f. = 199-200 °C

Fórmula molecular: C₃₁H₃₄FN₃O₃

Peso molecular (uma): 515

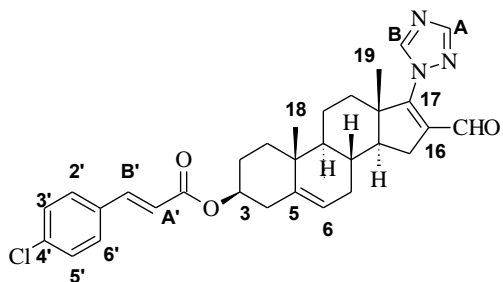
IR (Espectro 29, FTIR-ATR): 3105.20 (=C-H); 2946.48-2851.55 (C-H alifático); 1696.35 (C=O éster); 1663.07 (C=O formilo); 1615.32 (C=C); 1199.85 (C-O); 1182.06 (C-C); 833.93 (benceno 1,4-disustituido).

RMN-¹H (Espectro 30, CDCl₃, δ ppm): 10.12 (s, 1H, CHO); 8.43 (s, 1H, H-B); 8.12 (s, 1H, H-A); 7.63 (d, 1H, *J*=16.0 Hz, H-B'); 7.51 (m, 2H, H-2', H-6'); 7.07 (t, 2H, H-3', H-5'); 6.36 (d, *J*=16.0 Hz, 1H, H-A'); 5.44 (d, *J*=5.1 Hz, 1H, H-6); 4.76 (m, 1H, H-3); 1.20 (s, 3H, H-19); 1.11 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 31, CDCl₃, δ ppm): 189.22 (16-CHO); 166.39 (3-COOR); 156.88 (C-4'); 153.19 (C-17); 143.80 (C-A); 143.41 (C-B'); 140.09 (C-B, C-16); 132.48 (C-5); 130.82 (C-1'); 130.07 (C-2'); 129.98 (C-6'); 122.02 (C-6); 118.41 (C-A'); 116.28 (C-3'); 116.06 (C-5'); 73.93 (C-3); 20.61 (C-19); 16.12 (C-18).

EM (Espectro 32, FAB⁺, *m/z*): 516 [M+1]⁺, 48% AR; 149 [4-F-C₆H₄-CH=CH-CO]⁺, 65% AR.

7.2.5.5. 3β-(4-clorocinamoiloxi)-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6e).



Aspecto: polvo blanco compacto.

Rendimiento: 69% $R_f = 0.47$ (Sistema I)

p.f. = 235-237°C

Fórmula molecular: C₃₁H₃₄ClN₃O₃

Peso molecular (uma): 531

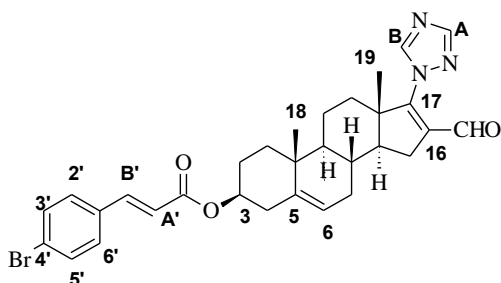
IR (Espectro 33, FTIR-ATR): 3099.61 (=C-H); 2947.13-2850.07 (C-H alifático); 1695.21 (C=O éster); 1664.47 (C=O formilo); 1613.42 (C=C); 1199.13 (C-O); 1180.17 (C-C); 828.90 (benceno 1,4-disustituido).

RMN-¹H (Espectro 34, CDCl₃, δ ppm): 10.11 (s, 1H, CHO); 8.42 (s, 1H, H-B); 8.12 (s, 1H, H-A); 7.62 (d, 1H, *J*=16.0 Hz, H-B'); 7.45 (d, *J*=8.5 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.35 (d, *J*=8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'); 6.39 (d, *J*=16.0 Hz, 1H, H-A'); 5.45 (s, 1H, H-6); 4.75 (m, 1H, H-3); 1.21 (s, 3H, H-19); 1.11 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 35, CDCl₃, δ ppm): 189.16 (16-CHO); 166.23 (3-COOR); 156.88 (C-17); 153.22 (C-A); 143.82 (C-B'); 143.24 (C-B, C-16); 140.10 (C-5); 136.28 (C-4'); 133.12 (C-1'); 132.52 (C-3', C-5'); 129.33 (C-2', C-6'); 122.06 (C-6); 119.31 (C-A'); 74.02 (C-3); 20.63 (C-19); 16.12 (C-18).

EM (Espectro 36, FAB⁺, *m/z*): 532 [M+1]⁺, 13% AR; 534 [M+3]⁺, 3% AR; 166 [4-³⁵Cl-C₆H₄-CH=CH-CO]⁺, 6% AR; 168 [4-³⁷Cl-C₆H₄-CH=CH-CO]⁺, 2.5% AR.

7.2.5.6. 3β-(4-bromocinamoiloxi)-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6f).



Aspecto: polvo blanco cristalino.

Rendimiento: 30% $R_f = 0.46$ (Sistema I)

p.f. = 209-211°C

Fórmula molecular: C₃₁H₃₄BrN₃O₃

Peso molecular (uma): 575

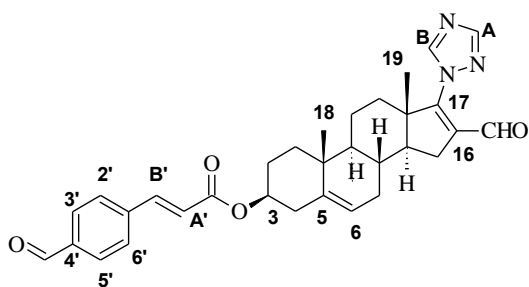
IR (Espectro 37, FTIR-ATR): 3099.10 (=C-H); 2946.83-2850.15 (C-H alifático); 2742.33 (C-H aldehído); 1695.91 (C=O éster); 1664.32 (C=O formilo); 1612.17 (C=C); 1199.25 (C-O); 1181.78 (C-C); 826.65 (benceno 1,4-disustituido).

RMN-¹H (Espectro 38, CDCl₃, δ ppm): 10.11 (s, 1H, CHO); 8.42 (s, 1H, H-B); 8.12 (s, 1H, H-A); 7.60 (d, 1H, *J*=16.0 Hz, H-B'); 7.51 (d, *J*=8.3 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.38 (d, *J*=8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'); 6.40 (d, *J*=16.0 Hz, 1H, H-A'); 5.44 (d, *J*=4.7 Hz, 1H, H-6); 4.74 (m, 1H, H-3); 1.20 (s, 3H, H-19); 1.10 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 39, CDCl₃, δ ppm): 188.84 (16-CHO); 165.88 (3-COOR); 156.55 (C-17); 152.89 (C-A); 142.99 (C-B'); 139.75 (C-B, C-16); 133.21 (C-5); 132.18 (C-1'); 131.95 (C-3', C-5'); 129.22 (C-2', C-6'); 124.28 (C-4'); 121.74 (C-6); 119.06 (C-A'); 73.71 (C-3); 20.30 (C-19); 15.80 (C-18).

EM (Espectro 40, FAB⁺, *m/z*): 576 [M+1]⁺, 26% AR; 578 [M+3]⁺, 25% AR; 209 [4-⁷⁹Br-C₆H₄-CH=CH-CO]⁺, 8% AR; 211 [4-⁸¹Br-C₆H₄-CH=CH-CO]⁺, 8% AR.

7.2.5.7. 3β-(4-formilcinamoiloxi)-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6g).



Aspecto: polvo blanco cristalino.

Rendimiento: 57% $R_f = 0.45$ (Sistema I)

p.f. = 242-244°C

Fórmula molecular: C₃₂H₃₅N₃O₄

Peso molecular (uma): 525

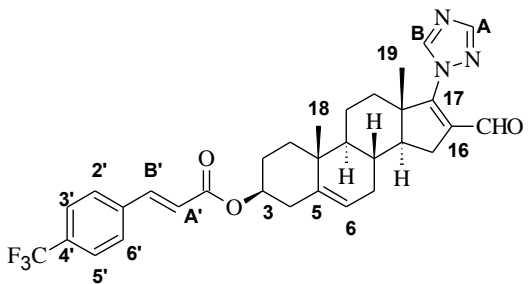
IR (Espectro 41, FTIR-ATR): 3128.95 (=C-H); 2933.12-2853.32 (C-H alifático); 2747.35 (C-H aldehído); 1713.95 (C=O éster); 1673.94 (C=O formilo); 1623.34 (C=C); 1193.38 (C-O); 1176.31 (C-C); 758.42 (benceno 1,4-disustituido).

RMN-¹H (Espectro 42, CDCl₃, δ ppm): 10.11 (s, 1H, CHO aromático); 10.03 (s, 1H, 16-CHO); 8.42 (s, 1H, H-B); 8.12 (s, 1H, H-A); 7.90 (d, *J*=8.3 Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.71 (s, 1H, H-B'); 7.67 (d, *J*=5.8 Hz, 2H, H-2', H-6'); 6.53 (d, *J*=16.1 Hz, 1H, H-A'); 5.45 (d, *J*=5.0 Hz, 1H, H-6); 4.76 (m, 1H, H-3); 1.21 (s, 3H, H-19); 1.11 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 43, CDCl₃, δ ppm): 191.53 (Ar-CHO); 189.14 (16-CHO); 165.89 (3-COOR); 156.86 (C-17); 153.21 (C-A); 143.83 (C-B'); 142.93 (C-1'); 140.29 (C-B); 140.00 (C-16); 137.29 (C-5); 132.49 (C-4'); 130.29 (C-3', C-5'); 128.61 (C-2', C-6'); 122.14 (C-6); 121.92 (C-A'); 74.27 (C-3); 20.62 (C-19); 16.11 (C-18).

EM (Espectro 44, FAB⁺, *m/z*): 526 [M+1]⁺, 1% AR; 159 [4-CHO-C₆H₄-CH=CH-CO]⁺, 7% AR.

7.2.5.8. 3β-(4-trifluorocinamoiloxi)-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6h).



Aspecto: polvo blanco compacto.

Rendimiento: 62% $R_f = 0.49$ (Sistema I)

p.f. = 227-228°C

Fórmula molecular: C₃₂H₃₄F₃N₃O₃

Peso molecular (uma): 565

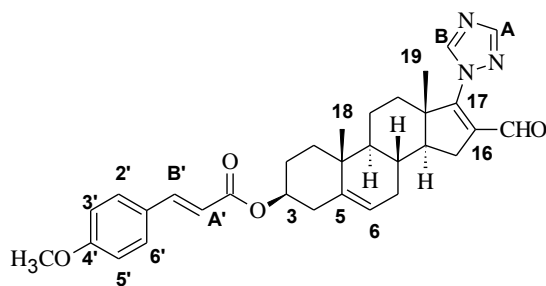
IR (Espectro 45, FTIR-ATR): 3162.23 (=C-H); 2974.89-2844.15 (C-H alifático); 1693.43 (C=O éster); 1651.66 (C=O formilo); 1600.58 (C=C); 1208.47 (C-O); 1174.41 (C-C); 829.34 (benceno 1,4-disustituido).

RMN-¹H (Espectro 46, CDCl₃, δ ppm): 10.12 (s, 1H, CHO); 8.42 (s, 1H, H-B); 8.12 (s, 1H, H-A); 7.68 (d, 1H, *J*=16.2 Hz, H-B'); 7.63 (d, *J*=2.5 Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.62 (d, *J*=5.6 Hz, 2H, H-2', H-6'); 6.49 (d, *J*=16.0 Hz, 1H, H-A'); 5.46 (d, *J*=4.6 Hz, 1H, H-6); 4.77 (m, 1H, H-3); 1.21 (s, 3H, H-19); 1.11 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 47, CDCl₃, δ ppm): 189.15 (16-CHO); 165.90 (3-COOR); 156.87 (C-17); 153.23 (C-A); 143.82 (C-B'); 142.81 (C-B); 140.02 (C-5); 137.99 (C-1'); 132.50 (C-16); 128.29 (C-4'); 126.02 (C-2', C-6'); 125.98 (C-3', C-5'); 125.95 (Ar-CF₃); 122.14 (C-6); 121.30 (C-A'); 74.23 (C-3); 20.63 (C-19); 16.13 (C-18).

EM (Espectro 48, FAB⁺, *m/z*): 566 [M+1]⁺, 43% AR; 199 [4-CF₃-C₆H₄-CH=CH-CO]⁺, 25% AR.

7.2.5.9. 3β-(4-metoxicinamoiloxi)-17-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (6i).



Aspecto: polvo blanco compacto.

Rendimiento: 26% $R_f = 0.40$ (Sistema I)

p.f. = 244-245°C

Fórmula molecular: C₃₂H₃₇N₃O₄

Peso molecular (uma): 527

IR (Espectro 49, FTIR-ATR): 3136.59 (=C-H); 2937.06-2844.69 (C-H alifático); 2731.15 (C-H aldehído); 1707.33 (C=O éster); 1672.18 (C=O formilo); 1602.28 (C=C); 1205.17 (C-O); 1167.10 (C-C); 826.96 (benceno 1,4-disustituido).

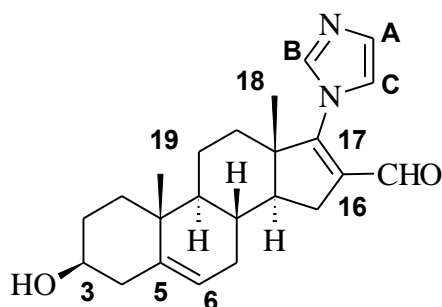
RMN-¹H (Espectro 50, CDCl₃, δ ppm): 10.11 (s, 1H, CHO); 8.42 (s, 1H, H-B); 8.12 (s, 1H, H-A); 7.62 (d, 1H, *J*=15.9 Hz, H-B'); 7.47 (d, *J*=8.7 Hz, 2H, H-2', H-6'); 6.89 (d, *J*=8.7 Hz, 2H, H-3', H-5'); 6.28 (d, *J*=15.9 Hz, 1H, H-A'); 5.44 (d, *J*=4.9 Hz, 1H, H-6); 4.74 (m, 1H, H-3); 3.83 (m, 1H, OCH₃); 1.20 (s, 3H, H-19); 1.10 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 51, CDCl₃, δ ppm): 189.16 (16-CHO); 166.80 (3-COOR); 161.47 (C-4'); 156.88 (C-17); 153.21 (C-A); 144.36 (C-B'); 140.22 (C-B, C-16); 132.49 (C-5); 129.81 (C-2'-C-6'); 127.34 (C-1'); 121.90 (C-6); 116.16 (C-A'); 114.45 (C-3', C-5'); 73.63 (C-3); 55.50 (Ar-OCH₃); 20.61 (C-19); 16.11 (C-18).

EM (Espectro 52, FAB⁺, *m/z*): 528 [M+1]⁺, 77% AR; 161 [4-CH₃O-C₆H₄-CH=CH-CO]⁺, 100% AR.

7.2.6. Método para la obtención de 3β-hidroxi-17-(1H-imidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (7).

En un matraz de fondo redondo de 25 mL, acondicionado con agitación continua y trampa de humedad, se hicieron reaccionar 579 mg (8.5 mmol) de 1,3-imidazol y 901 mg (8.5 mmol) de carbonato de sodio en 5 mL de *N,N*-dimetilformamida. Transcurridos 10 minutos se agregaron 550 mg (1.7 mmol) del compuesto **4** y se calentó a 80°C durante 6 horas, se vació sobre 30 mL de una mezcla agua-hielo, obteniendo un precipitado amarillo, el cual se filtró y se sometió a purificación mediante cromatografía en columna de fluorisil, eluyendo por gradiente con una mezcla de hexano-acetato de etilo.



Aspecto: polvo beige.

Rendimiento: 67% $R_f = 0.53$ (Sistema IV)

p.f.: 216-217°C

Fórmula molecular: $C_{23}H_{30}N_2O_2$

Peso molecular (uma): 366

IR (Espectro 53, FTIR-ATR): 3356.74 (O-H); 3182.57 (=C-H); 2959.91-2821.13 (C-H alifático); 1647.96 (C=O formilo); 1592.58 (C=C).

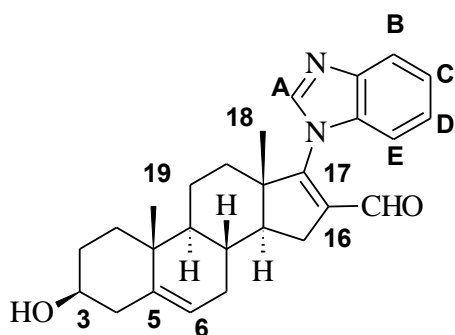
RMN-¹H (Espectro 54, $CDCl_3$, δ ppm): 9.73 (s, 1H, CHO); 7.63 (s, 1H, H-B); 7.22 (s, 1H, H-C); 7.11 (s, 1H, H-A); 5.38 (dd, $J=3.2, 2.1$ Hz, 1H, H-6); 3.53 (m, 1H, H-3); 1.07 (s, 3H, H-19); 1.05 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 55, $CDCl_3$, δ ppm): 187.83 (16-CHO); 160.81 (C-17); 141.22 (C-5); 137.96 (C-B); 134.07 (C-16); 130.86 (C-A); 120.97 (C-6); 120.09 (C-C); 71.65 (C-3); 20.61 (C-19); 16.13 (C-18).

EM (Espectro 56, FAB^+ , m/z): 367 $[M+1]^+$, 39% AR.

7.2.7. Método para la obtención de 3β-hidroxi-17-(1H-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (8).

En un matraz de fondo redondo de 25 mL, acondicionado con agitación continua y trampa de humedad, se hicieron reaccionar 71 mg (0.6 mmol) de benzimidazol y 195 mg (0.6 mmol) de carbonato de cesio en 3 mL de *N,N*-dimetilformamida. Transcurridos 10 minutos se agregaron 100 mg (0.3 mmol) del compuesto **4** y se calentó a 60°C durante 2 horas, se vació sobre 30 mL de una mezcla agua-hielo, obteniendo un precipitado amarillo, el cual se filtró y se sometió a purificación mediante cromatografía en columna de fluorisil, eluyendo por gradiente con una mezcla de hexano-acetato de etilo.



Aspecto: polvo fino blanco.

Rendimiento: 52% $R_f = 0.55$ (Sistema IV)

p.f.: 203-204°C

Fórmula molecular: $C_{27}H_{32}N_2O_2$

Peso molecular (uma): 416

IR (Espectro 56, FTIR-ATR): 3334.38 (O-H); 3087.34 (=C-H); 2958.71-2865.77 (C-H alifáticos); 1671.68 (C=O formilo); 1618.42 (C=C); 737.25 (benceno 1,2-disustituido).

RMN-¹H (Espectro 57, $CDCl_3$, δ ppm): 9.59 (s, 1H, CHO); 7.98 (s, 1H, H-A); 7.85 (dd, $J=7.0, 2.8$ Hz, 2H, H-B, H-E); 7.35 (dd, $J=6.0, 2.9$ Hz, 2H, H-C, H-D); 5.40 (s, 1H, H-6); 3.55 (m, 1H, H-3); 1.05 (s, 6H, H-19, H-18).

RMN-¹³C (Espectro 58, $CDCl_3$, δ ppm): 187.91 (16-CHO); 141.56, 141.25 (C-A); 124.21 (C-C); 123.66 (C-D); 122.68 (C-B); 120.92 (C-6); 120.63 (C-E); 71.62 (C-3); 20.57 (C-19); 19.45 (C-18).

EM (Espectro 59, FAB⁺, m/z): 417 [M+1]⁺, 100% AR.

7.3. Parte biológica

7.3.1. Material biológico.

- 36 hámsteres machos de la cepa *Syrian Golden* con peso promedio entre 200-250 g.
- Tejido de próstata humana de cadáver conservado a -70°C, proporcionado por el Departamento de Patología del Hospital General de México.

7.3.1.1. Sustancias y equipos.

- Testosterona [³H] (T [³H]) actividad específica 85-105 Ci/mmol, suministrada por NEN Life Science Products. Inc. (Boston, MA):
- Mibolerona [³H] actividad específica 70-87 Ci/mmol, suministrado por NEN Perkin Elmer Life Science Products. Inc. (Boston, MA).
- Ultracentrífuga marca Beckman modelo Óptima L-70K.
- Centrífuga marca Beckman modelo Allegra 6R.
- Analizador de Centelleo Packard modelo Tri-Carb 2100 TR.
- Placas cromatográficas de Sílice gel 60 GF254 en soporte de aluminio (20X20 cm, Merck).

7.3.2. Ensayo *in vitro*: citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.

Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento para los compuestos **4**, **5**, **6a-6i**, **7** y **8** sobre las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 y LNCaP. Dicho ensayo fue llevado a cabo por la M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apán en la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM. El ensayo se realizó mediante el método de Sulforodamina B (SRB).⁶² Las células se cultivaron en un medio RPMI-1640, enriquecido con un 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de Penicilina G, 100 µg/mL de anfotericina B y 1% de aminoácidos no esenciales; se incubaron a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂.

Posteriormente se tomaron 100 µL de la línea celular correspondiente, el contenido de células por pozo varía entre 5 000 a 15 000, dependiendo de la línea celular, y se incubó por 24 h. Se preparó una solución stock en dimetilsulfóxido (DMSO) de cada compuesto a evaluar, dicha solución se adicionó a cada pozo de las líneas celulares en 100 µL de medio de cultivo, quedando una solución final de cada compuesto de 50 µM, posteriormente las líneas celulares se incubaron por 48 horas. Adicionalmente se preparó un blanco, el cual consiste en un pozo que contiene únicamente medio de cultivo, éste se cultivó solamente por una hora. Ambas incubaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 37°C con una atmósfera con 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa.

Finalizado el tiempo de incubación, se procedió a la fijación de los cultivos celulares *in situ* por la adición de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 50% (p/v) frío, se incubaron por 60 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante, se hicieron cinco lavados con agua ionizada y se dejó secar por 24 horas. Posteriormente se realizó el teñido adicionando 100 µL de Sulforodamina B (0.4% p/v en ácido acético) a cada pozo, se mantuvo en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente, a continuación se hicieron lavados con ácido acético al 1% y se dejó secar durante 24 h. Las células fijadas se resuspendieron utilizando 10 mM de buffer Tris en agitación por 5 minutos. Finalmente, se determinó la densidad óptica a

515 nm utilizando un lector ELISA. Los resultados del análisis primario muestran el porcentaje de inhibición \pm desviación estándar.

7.3.3. Ensayo de viabilidad del macrófago.

7.3.3.1. Aislamiento del cultivo primario de macrófagos murinos. ⁶³

Los macrófagos fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones Swiss hembras de peso entre 25-30 g. Bajo condiciones de asepsia, se administraron por vía intraperitoneal 0.5 mL de medio de trioglicolato estéril al 3% p/v. Después de 72 hrs, los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂. Bajo condiciones de esterilidad, se inyectaron 7 mL de buffer de fosfatos (PBS) en la cavidad peritoneal y se realizó un masaje abdominal vigoroso. Con la ayuda de una jeringa se extrajo el líquido peritoneal, el cual fue depositado en placa de cultivo para favorecer la separación de los macrófagos de otras células del fluido del peritoneo. La placa se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante dos horas. Al concluir este tiempo, la placa fue lavada 3 veces con PBS y, con la ayuda de un cosechador de células, se procedió al desprendimiento de los macrófagos murinos. La cuenta de los macrófagos se realizó con azul de tripano y de esta manera se ajustó la densidad del inóculo a 1.0×10^6 cél/mL en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino. En placas de 96 pozos se depositaron 100 μ L de la suspensión de células, dejándolas en reposo por un lapso de 60 minutos para que los macrófagos se adhirieran al sustrato del pozo. Los compuestos de prueba se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) o agua a una concentración de 20 mM. Se agregaron 100 μ L de la solución del compuesto de prueba cuya concentración final en cada pozo correspondió a 50 μ M. Cada compuesto de prueba se agregó en 3 pozos, así como su respectivo vehículo, al finalizar se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 24 horas.

7.3.3.2. Viabilidad del macrófago. ⁶⁴

La actividad de los compuestos de ensayo sobre la viabilidad celular se determinó por el método colorimétrico de MTT ⁶² (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). El MTT se preparó en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a una concentración de 5 mg/mL. Se adicionaron 20 μ L/pozo y se incubó durante 4 horas a 37°C con 5% de CO₂. Al finalizar este periodo se descartó el sobrenadante; los cristales de formazán generados en cada pozo fueron disueltos agregando 100 μ L de DMSO. La placa se mantuvo en agitación durante 10 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de viabilidad se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$Viabilidad = \left(\frac{\text{promedio de absorbancia compuesto de prueba}}{\text{promedio absorbancia vehículo}} \right) \times 100$$

7.3.4. Ensayo *in vitro*: inhibición de la enzima 5 α - reductasa.

El ensayo consistió en 2 partes. La primera de ellas fue la extracción de la enzima 5 α -reductasa y en la segunda se realizó la determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de los compuestos **6a-6i, 7 y 8**.

7.3.4.1. Extracción de la enzima 5 α -reductasa.

La próstata de cadáver humano se cortó y homogeneizó utilizando una solución A (20 mM de fosfato de sodio, 0.32 M de sacarosa. 0.1 mM ditiotreitól, pH=6.5). Este homogeneizado se centrifugó a 1500 rpm durante 20 minutos. El pellet formado se separó y se lavó 3 veces con el medio A y nuevamente se centrifugó a 4400 rpm durante 10 min. Finalmente, el pellet se resuspendió en el medio A y se almacenó a -70 °C. Se determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford⁷⁴ utilizando como referencia albúmina sérica bovina. El contenido de proteínas fue de 5 mg de proteína/mL de próstata humana.

7.3.4.2. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de la enzima 5 α -reductasa en glándulas prostáticas humanas.

Para cada uno de los compuestos, **6a-6h**, se prepararon dos series de 6 tubos cada una, con concentraciones de 10^{-10} – 10^{-4} disueltos en metanol y conteniendo testosterona tritlada (T [³H]) a una concentración final de 2 nM; asimismo, se incluyeron los tubos controles a los que se adicionó T [³H] a la misma concentración de 2nM. Los tubos fueron colocados en baño de agua y bajo atmósfera de nitrógeno, hasta evaporar totalmente el disolvente; enseguida se añadieron 720 μ L de búfer de fosfatos (40mM, pH= 6.5), 80 μ L de fracción microsomal de próstata de cadáver humano, la cual contenía 360 μ g/mL de proteína. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de DTT (1mM) y 100 μ L de NADPH (2mM) dando así inicio a la reacción.

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

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

Los resultados obtenidos para este ensayo mostraron que la actividad de la T+Finasterida dio un valor de concentración inhibitoria 50 de 8.5×10^{-9} M, para la enzima prostática humana.

7.3.5. Ensayo *in vitro*: Ensayo de inhibición de la enzima 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (17 β -HSD).

En este ensayo se preparó una serie de tubos, los cuales contenían:

Androstenediona tritiada (Δ^4 A [3 H]) (4nM), androstenediona (Δ^4 A) fría (174 μ M), DMSO y las soluciones de los compuestos **6a-6h**.

En primera instancia, se evaporó el disolvente de Δ^4 A [3 H] (4nM), Δ^4 A –fría (174 μ M) y del inhibidor (para que solo quedara en DMSO,) con ayuda de un baño de agua.

Posteriormente, a cada tubo de ensayo se le adicionaron 10 μ L de la solución que contenía buffer de fosfatos (40mM, pH 7.5), 100 μ L de DTT (1mM) y 100 μ L de NADPH (25mM); finalmente se adicionaron 60 μ L de fracción microsomal de próstata de cadáver humano, con lo que se dio inicio a la reacción enzimática.

A continuación, los tubos se incubaron a 37.5 °C con agitación constante durante 30 minutos; pasado este tiempo, se agregaron 100 μ L de diclorometano para detener la reacción, se agitó nuevamente en vórtex por 1 minuto, se centrifugó a 3700 rpm durante 5 min y se extrajo el diclorometano (fase inferior), éste se colocó en tubos cónicos, donde posteriormente se adicionaron 100 μ L de acetato de etilo, se agitó nuevamente en vórtex por 1 minuto y se extrajo el acetato de etilo (fase superior) y se repitió el mismo procedimiento 5 veces y se colocó en el mismo tubo cónico. Se dejó evaporar el disolvente y se agregaron 100 μ L de una mezcla cloroformo–metanol (1:1) y se aplicó gota a gota sobre una placa cromatográfica, el procedimiento se repitió 5 veces; adicionalmente se aplicaron los estándares de Δ^4 A, T, DHT, 5 α A (Androstenediol) y androstandiol y se dejó secar por 30 minutos, Se eluyó dos veces en un sistema cloroformo:acetona (9:1).

Los estándares de T y de Δ^4 A se observaron bajo luz UV ($\lambda=254$ nm) y posteriormente se revelaron con una solución de ácido fosfomolibdico en metanol al 8% y calor. Se marcó y cortó la zona de DHT y androstandiol. El 5 α A se reveló con una solución de KOH 2.5N: *meta*-dinitrobenceno 2% (1:1) y calor.

Finalmente, los pedazos de sílice se colocaron en viales en donde se les adicionaron 10 mL de líquido de centelleo Ultima Gold (packard) y se determinó la Cl_{50} [nM] de la enzima.

7.3.6. Ensayo *in vivo*: determinación del peso de la próstata y de vesículas seminales, y diámetro de la mancha pigmentada en hámsteres castrados.

Se llevó a cabo la evaluación biológica de los compuestos **6a-6h** para medir su actividad antiandrogénica en hámsteres castrados. El ensayo se realizó en el Instituto de Pruebas en el Laboratorio de Hormonas del Departamento de Sistemas Biológicos de la Unidad Xochimilco en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), en el que se utilizaron hámsteres machos de la cepa *Syrian Golden* (entre 150-200g), se realizó en 11 grupos de 3 animales por experimento, éstos son gonadectomizados 30 días antes del experimento, manteniéndolos a una temperatura controlada de 22°C y en periodos de luz-

oscuridad 12 hrs, la comida y el agua fue suministrada *ad libitum* diariamente. Durante 6 días se le administró por vía subcutánea:

- Un grupo control: 200 μL de aceite de sésamo (vehículo).
- Un segundo grupo: 200 μg de testosterona en 200 μL de aceite de sésamo
- Un tercer grupo: 200 μg de Finasterida más 200 μg de testosterona en 200 μL de aceite de sésamo.
- Ocho grupos a los cuales se les administró 200 μg de testosterona más 400 μg de los derivados de 1,2,4-triazol (**6a-6h**).

Después del tratamiento, los hámsteres se sacrificaron en una cámara de CO_2 y posteriormente los órganos fueron diseccionados para ser analizados.

7.4. Parte computacional

El diseño molecular se realizó en una computadora Lenovo con un procesador Intel[®] Core[™] 2 Duo de 3 GHz y 4 GB de memoria. De manera inicial se llevó a cabo un análisis conformacional, mediante el uso del programa *Spartan 08*[®],⁷¹ en el cual las moléculas fueron pre-optimizadas utilizando el campo de fuerza Merck (MMFF94) y se eligió el conformero de mínima energía. Una vez obtenido este conformero, con el programa Gaussian 09[®],⁷² se llevó a cabo la optimización de las moléculas aplicando el método Semiempírico PM-6 (Parameterization Method 6, por sus siglas en inglés) y posteriormente se calculó la energía empleando el método de funcionales de la densidad (DFT) con el híbrido de Becke-Lee-Yang-Parr tres con una polarizada (B3LYP 631G^{*}), agregando cargas $q = -1, 0$ y $+1$. En ambos métodos se empleó agua como disolvente implícito. De los resultados obtenidos se tomaron las cargas de Orbitales Naturales de Enlace (NBO, por sus siglas en inglés). Se determinó la función de Fukui $f^-(r)$ para el átomo de nitrógeno (N2) y el átomo de nitrógeno (N4) del anillo 1,2,4-triazol, así como la función Fukui $f^+(r)$ para el carbono carbonílico del grupo éster (COOR) del C-3 del núcleo esteroidal. El cálculo de la función de Fukui se llevó a cabo utilizando las siguientes ecuaciones:

$$f^+(r) = \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r)$$

$$f^-(r) = \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r)$$

donde ρ_{N+1} , ρ_N y ρ_{N-1} son las densidades electrónicas de las moléculas con carga negativa, neutra y positiva respectivamente, todas teniendo la misma estructura geométrica. En la tabla 7.2 se ilustra cómo se calcularon las funciones condensadas de Fukui.

Tabla 7.2. Funciones condensadas de Fukui obtenidas a partir de las cargas NBO.

Compuesto	COOR	COOR	N2	N2	N4	N4	$f^+(r)$	$f^-(r)$	$f^-(r)$
	(q=0)	(q=-1)	(q=0)	(q=+1)	(q=0)	(q=+1)	COOR	N2	N4
6a	0.7837	0.784	-0.30118	-0.30005	-0.5207	-0.51792	0.0003	0.00113	0.00278
6b	0.75149	0.75145	-0.30141	-0.30096	-0.52072	-0.51981	-0.00004	0.00045	0.00091
6c	0.75219	0.75214	-0.30115	-0.29904	-0.51849	-0.51223	-0.00005	0.00211	0.00626
6d	0.75395	0.7539	-0.30138	-0.29881	-0.52075	-0.51301	-0.00005	0.00257	0.00774
6e	0.75527	0.75522	-0.30144	-0.30007	-0.52068	-0.5171	-0.00005	0.00137	0.00358
6f	0.75413	0.75408	-0.30149	-0.29998	-0.52112	-0.51711	-0.00005	0.00151	0.00401
6g	0.76445	0.75907	-0.30140	-0.29855	-0.52089	-0.51209	-0.00538	0.00285	0.0088
6h	0.7645	0.76463	-0.30141	-0.2985	-0.52099	-0.51204	0.00013	0.00291	0.00895
6i	0.7451	0.74506	-0.30146	-0.30139	-0.52072	-0.52062	-0.00004	0.00007	0.0001

Por otro lado, con los resultados obtenidos de la optimización por el método semiempírico PM6, con ayuda del programa *MarvinSketch*[®],⁷³ se calcularon descriptores QSAR y, con el programa *BuildQSAR*[®],⁵¹ se construyeron los modelos para los compuestos **6a-6i** y **T1-T6**.

8. Referencias bibliográficas

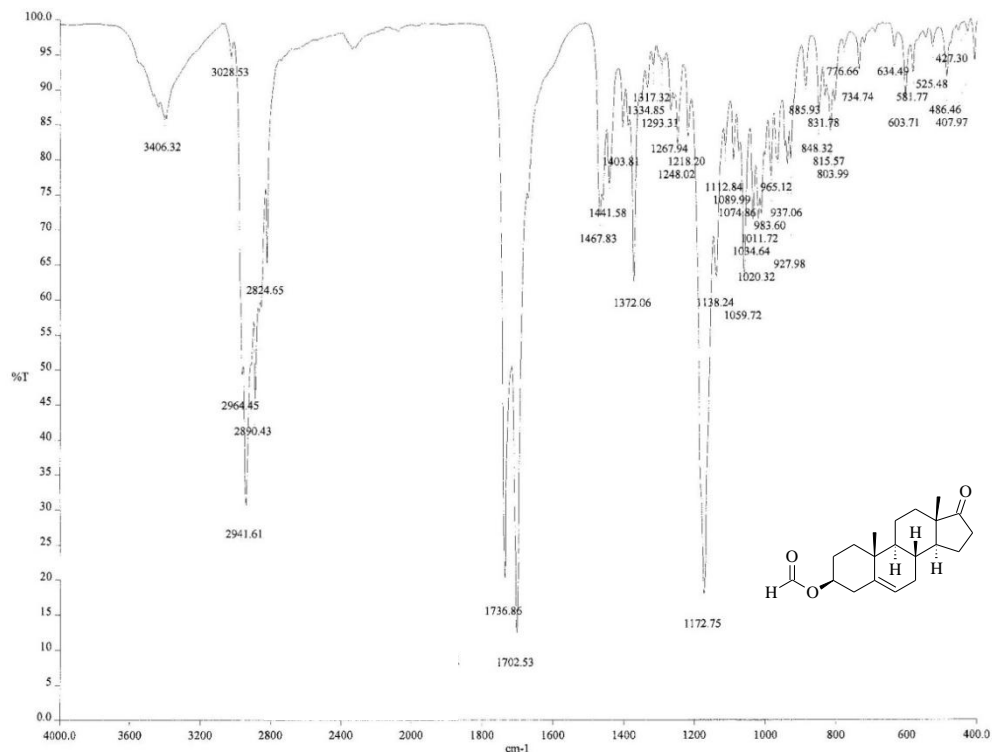
1. Segura Moctezuma, Tania. *Síntesis de ésteres derivados de la progesterona con un átomo de halógeno en C-4*, Tesis de Maestría, UNAM, México, **2008**.
2. Mendoza Jasso, María Eugenia, *Obtención de nuevos 16-haloderivados de la pregnenolona*, Tesis de Licenciatura, UNAM, México, **2012**.
3. Thurston David G., *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*, Ed. CRC Press, (USA), **2007**.
4. Cortés Benítez, Juan Francisco, *Síntesis y evaluación biológica de derivados de Deshidroepiandrosterona con un grupo azul en C-17 como antiandrógenos*, Tesis de Maestría, UNAM, México, **2012**.
5. MedlinePlus, página web consultada el día 12 de junio de 2014 en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/prostatediseases.html>
6. Rodríguez López, M.R.; Baluja Conde, I.B.; Bermúdez Velásquez, S. *Revista Biomédica*, **2007**, *18*, 47-59.
7. Vasaitis, T.S.; Brunoe, R.D.; Njar, V.C. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2011**, *12*, 23-31.
8. Bratoeff, E.; Ramírez, E.; Murillo, E.; Flores, G.; Cabeza, M. *Curr. Med. Chem.*, **1999**, *6*, 1107-1123.
9. Rojas Durán, F.; Manzo Denes, J.; Soto Cid, AH.; Aranda Abreu, GE.; Juárez Aguilar, E.; Coria Ávila, G.; Toledo Cárdenas, R.; Hernández Aguilar, ME. *eNeurobiología*, **2011**, *2*, 230511.
10. Nicholson T.M.; Ricke W.A. *Differentiation*, **2011**, *82*, 184-199.
11. Adeniji, A.O.; Mo Chen; Penning, T.V. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2013**, *137*, 136-149.
12. a) *Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI)*, página web consultada el día 23 de junio de 2014 en: <http://www.inegi.org.mx/> ; b) *Organización Mundial de la Salud (OMS)*, página web consultada el día 23 de junio de 2014 en: www.who.int/es/
13. Neoplasm, University of Virginia School Medicine, página web consultada el día 23 de junio de 2014 en: <http://www.webcitation.org/5yHQ19Rrp>
14. Sciarra, A.; Mariotti, G.; Salciccia, S.; Autran Gomez, A.; Monti, S.; Toscano, V.; Di Silverio, F. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2008**, *108*, 254-260.
15. Chávez Riveros, Alejandra, *Síntesis y evaluación biológica de nuevos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa basados en el esqueleto del pregnano con un grupo éster en C-3*, Tesis de Maestría, UNAM, México, **2012**.
16. Silva Ortíz, Aylin Viviana, *Síntesis y evaluación biológica de derivados de Deshidroepiandrosterona con un carbazol y un triazol en C-17 como posibles antiandrógenos*, Tesis de Maestría, UNAM, México, **2013**.
17. Soronen, P.; Laiti, M.; Torn, S.; Härkönen, P.; Patrikainen, L.; Li, Y.; Pulkka, A.; Kurkela R.; Herrala A.; Kaija, H.; Isomaa, V.; Vihko, P. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2004**, *92*, 281-286.
18. Stewart, A.B.; Lwaleed, B.A.; Douglas, D.A.; Birch, B.R. *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, **2005**, *5*, 603-612.

19. Avendaño, C.; Menéndez, J.C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Ed. Elsevier, 1ª edición, **2008**, p. 75-80.
20. Instituto Nacional del Cáncer, página web consultada el día 24 de junio de 2014 en: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/prostata/>
21. Schmidt, L.J.; Tindall, D.J. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2011**, *125*, 32-38.
22. Kumar, Vijay L.; Wahane, Vishal D. *Indian J. Med. Sci.*, **2008**, *62*, 167-175.
23. Arellano Salazar, Guillermina Yazmín, *Nuevos derivados de la Deshidroepiandrosterona como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa y/o antagonistas del receptor androgénico*, Tesis de Doctorado, UNAM, México, **2013**.
24. Bull, H.G., et.al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 2359-2365.
25. Aggarwal, S.; Thareja, S.; Verma, A.; Bhardwaj, T.R.; Kumar, M. *Steroids*, **2010**, *75*, 109-153.
26. Nebert, D.W.; Dalton, T.P. *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, *6*, 947-960.
27. Swart, A.C.; Kolar, N.W.; Lombard, N.; Mason, J.I.; Swart, P. *Eur. J. Biochem.*, **2002**, *269*, 5608-5616.
28. DeVore, N.M.; Scott, E.E. *Nature*, **2012**, *482*, 116-119.
29. Sushko, T.A.; Gilep, A.A.; Usanov, S.A. *Biochem. (Moscow)*, **2012**, *77*, 585-592.
30. Barrie, S.E. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1986**, *33*, 1191-1195.
31. Day, J.M.; Tutill, J.E.; Purohit, A.; Reed, J.M. *Endocr. Relat. Cancer*, **2008**, *15*, 665-692.
32. Labrie, F.; Luu-The, V.; Lin, S.X.; Labrie, C.; Simard, J.; Breton, R.; Bélanger, A. *Steroids*, **1997**, *62*, 148-158.
33. Sharifi, N.; Auchus, R.J. *Steroids*, **2012**, *77*, 719-726.
34. Byrns, M.C.; Mindnich, R.; Duan, L.; Penning, T.M. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2012**, *130*, 7-15.
35. Byrns, M.C.; Yi Jin; Penning, T.M. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2011**, *125*, 95-104.
36. Nagasaka, R.; Chatchawan Chotimarkorn. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**, *358*, 615-619.
37. Reyes Mosso, Alfonsina, *Síntesis de ésteres del grupo cinamoilo por radiación de microondas con potencial actividad citotóxica*, Tesis de Licenciatura, UNAM, México, **2012**.
38. Acevedo Hernández, Iván Leobardo, *Síntesis de 17 α -saliciloxiderivados de la progesterona, asistida por radiación de microondas y su evaluación como potenciales agentes citotóxicos*, Tesis de Licenciatura, UNAM, México, **2012**.
39. Metha, G.; Singh, V. *Chem. Soc. Rev.*, **2002**, *31*, 324-334.
40. Longhin Bosquesi, P.; Ferreira Melo, T.R.; Oliveira Vizioli, E.; dos Santos, J.L.; Ching Chung, M. *Pharmaceuticals*, **2011**, *4*, 1450-1474.
41. Morphy, R.; Kay, C.; Rankovic, Z. *Drug Discov. Today*, **2004**, *9*, 641-651.

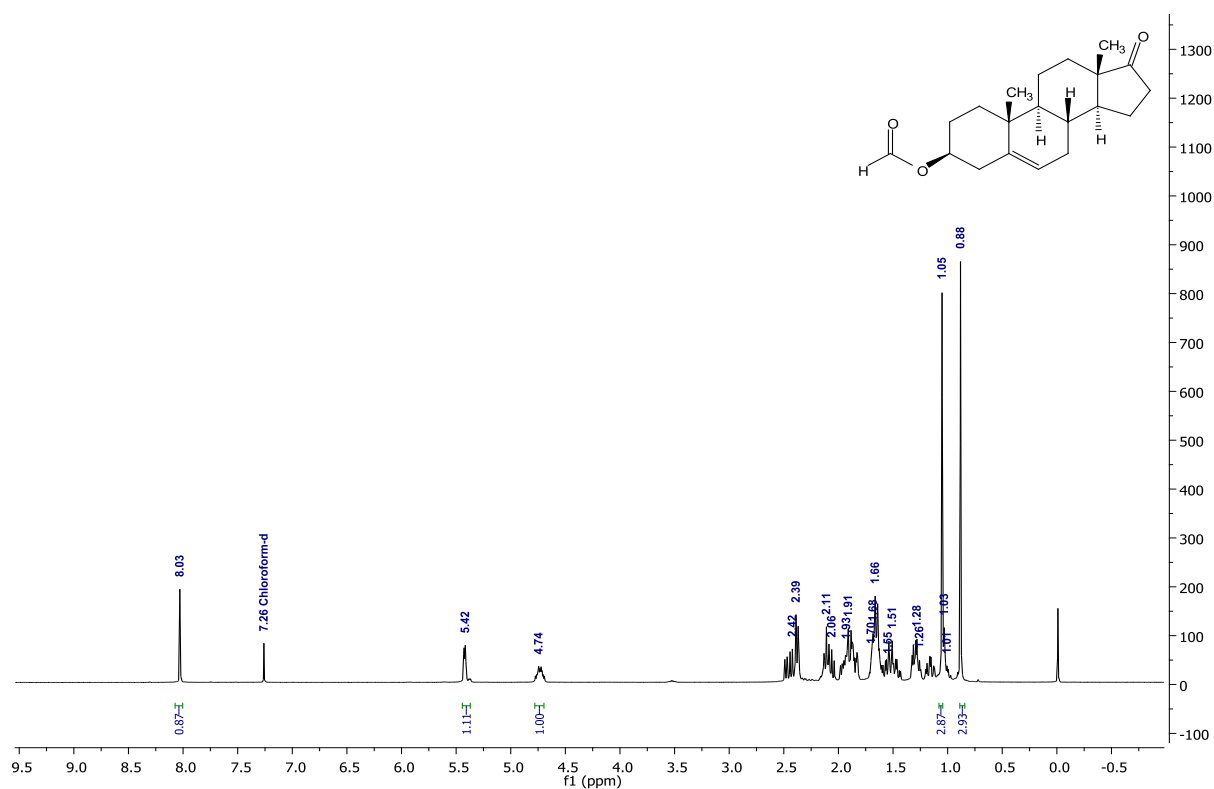
42. Meunier, B. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 69-77.
43. Avendaño López, C. *Introducción a la Química Farmacéutica*, 2ª ed., Mc Graw Hill, España, **2001**, p. 73-76.
44. Patrick, G.L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4a ed., Oxford, University Press, Gran Bretaña, **2009**, p. 222, 231.
45. Handratta, V.D.; Vasaitis, T.S.; Njar, V.C.; Gediya, L.K.; Kataria, R.; Chopra, P.; Newman, D.; Farquhar R.; Guo, Z.; Qiu, Y. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 2972-2984.
46. Njar, V.C.; Kato, K.; Nnane, I.P.; Grigoryev, D.N.; Long, B.J.; Brodie, A.M. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 902-912.
47. Arellano, Y.; Bratoeff, E.; Garrido, M.; Soriano, J.; Heuze, Y.; Cabeza, M. *Steroids*, **2011**, *76*, 1241-1246.
48. Neises B.; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1978**, *17*, 522-524.
49. *Wired Chemist*, página web consultada el día 20 de Julio de 2014 en:
<http://www.wiredchemist.com/chemistry/data/hammett-sigma-constants>
50. De Oliveira, D.B.; Gaudio, A. C. BuildQSAR: A New Computer Program for QSAR Analysis. *Quant. Struct. Activ. Relat.*, **2001**, *19*, 599-601.
51. Georges Wermuth, Camille. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 3a ed., Academic Press, Elsevier, **2008**, p. 326-330, 448-452.
52. Aggarwal, S.; Thareja, S.; Verma, A.; Bhardwaj, T.R.; Kumar, M. *Steroids*, **2010**, *75*, 411-418.
53. Adeniji, A.O. Twenter, B.M.; Byrns, M.C.; Yi Jin, Mo Chen; Winkler, J.D.; Penning, T.P. *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 2311-2323.
54. Endo, S.; Matsunaga, T.; Kanamori, A.; Otsuji, Y.; Nagai, H.; Sundaram, K.; El-Kabbani, O.; Toyoka, Naoki, Ohta S.; Hara, A. *J. Nat. Prod.*, **2012**, *75*, 716-721.
55. Brožič, P.; Golob, B.; Gomboc, N.; Lanišnik Rižner, T.; Gobec, S. *Mol. Cell. Endo.*, **2006**, *248*, 233-235.
56. Qiu, W.; Zhou, M.; Labrie, F.; Lin, S-X. *Mol. Endocrinol.*, **2004**, *18*, 1798-1807.
57. Yang, W.; Parr, R.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1985**, *82*, 6723-6726.
58. Virginia Popa, M. *Rev. Mex. Fis.*, **2007**, *53*, 241-253.
59. Ayers, P.W.; Yang, W.; Bartolotti, L.J. *Chemical Reactivity Theory: A Density Functional View*, CRC Press, **2009**, p. 255-265.
60. Garrido, M.; Cabeza, M.; Cortés, F.; Gutiérrez, J.; Bratoeff, E. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *68*, 301-311.
61. Montoya Hernández, Alin Amanda, *Revisión bibliográfica de los modelos experimentales en fase preclínica para evaluar actividad antineoplásica*, Tesis de Licenciatura, UNAM, México, **2011**.
62. Martínez, R.; Menes Arzate, M.; Ramírez-Apán, M.T. *Bioorg. Med. Chem. Curr.*, **2009**, *17*, 1849-1856.
63. Long, B.J.; Grigoryev, D.N.; Nnane, I.P.; Liu, Y.; Ling, Y-Z.; Brodie, A.M. *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 6630-6640.

64. Zhang, X.; Goncalves, R.; Mosser, D.M. *Curr. Protoc. Immunol.*, **2008**, *83*, 14.1.1-14.1.14.
65. Clement O.O.; Freeman, C.M.; Hartmann, R.W.; Handratta, V.D.; Vasatis, T.S.; Brodie, A.M.H.; Njar, V.C. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 2345-2351.
66. Uemura, M.; Tamura, K.; Chung, S.; Honma, S.; Okuyama, A.; Nakamura, Y.; Nakagawa, H. *Cancer Sci.*, **2008**, *99*, 81-86.
67. Negri-Cesi, P.; Motta, M.; Mornati, O. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, **1994**, *51*, 89-96.
68. Smith, C.M.; Ballard, S.A.; Wyllie, M.G.; Masters, J.W.R. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, **1994**, *50*, 151-159.
69. Stewart, A.B.; Lwaleed, B.A.; Douglas, D.A.; Birch, B.R. *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*, **2005**, *5*, 603-612.
70. Programa de actualización continua para urología-Hiperplasia Prostática Obstructiva, página web consultada el día 5 de agosto de 2014 en: <http://www.drscope.com/pac/urologia/index.htm>
71. *Spartan 08, Wavefunction Inc.* <http://www.wavefun.com/>, consultada en abril de 2014.
72. Gaussian 09, Revision **D.01**, Frisch, M. J. Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, M. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
73. *Marvin 6.3.0, 2014, ChemAxon* (<http://www.chemaxon.com>), consultada en junio de 2014
74. Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, (**1976**), *72*, 248-254.
75. Sinnokrot, O.M., Sherill, D., *J. Am. Chem. Soc.*, (**2004**), *126*, 7690-7697.

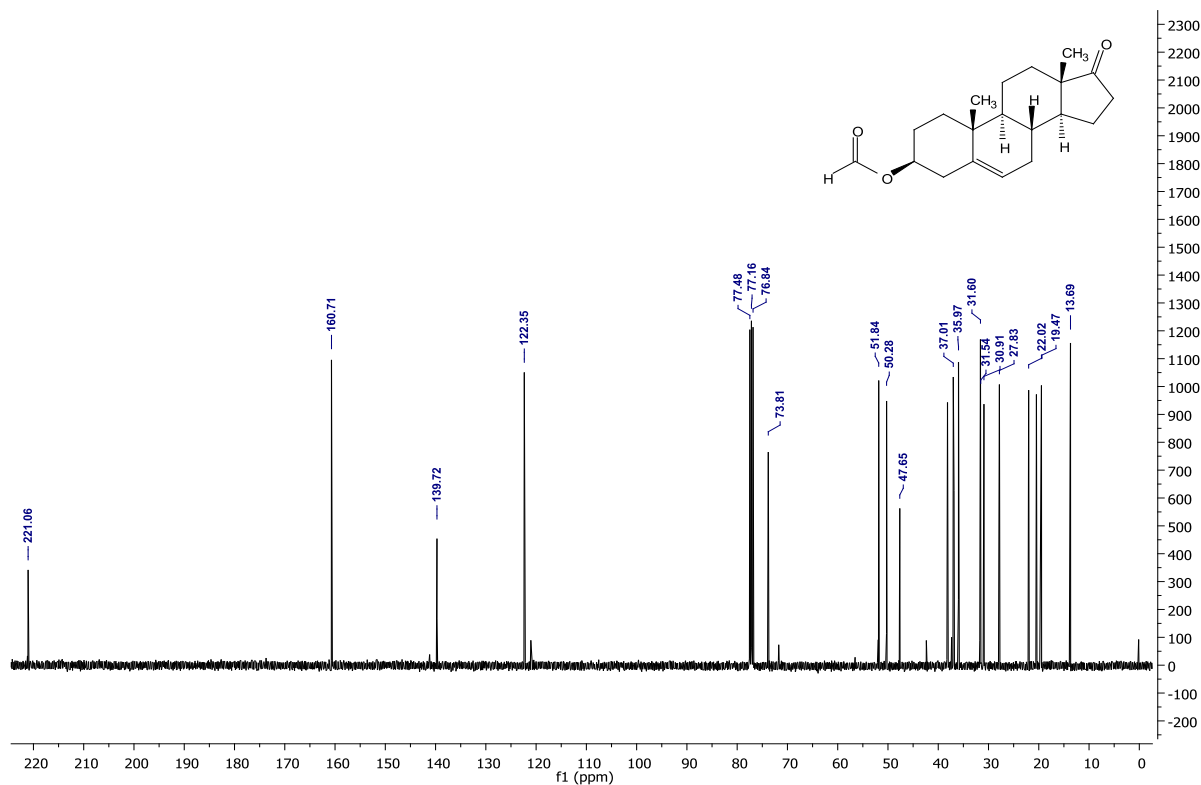
ANEXO: Espectros



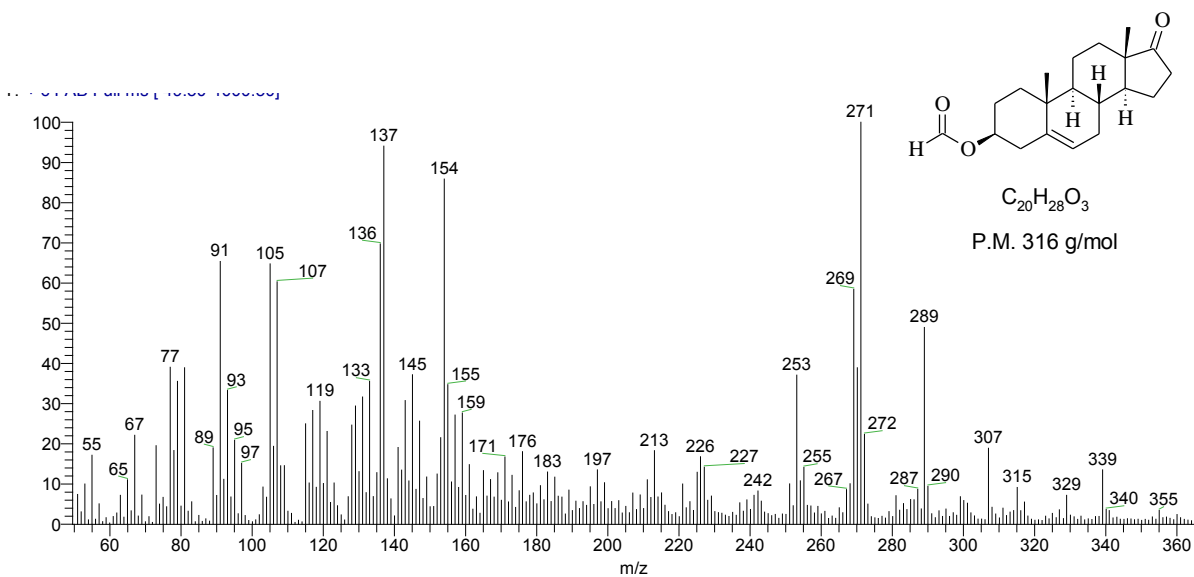
Espectro 1. IR (FTIR-ATR) del compuesto 2.



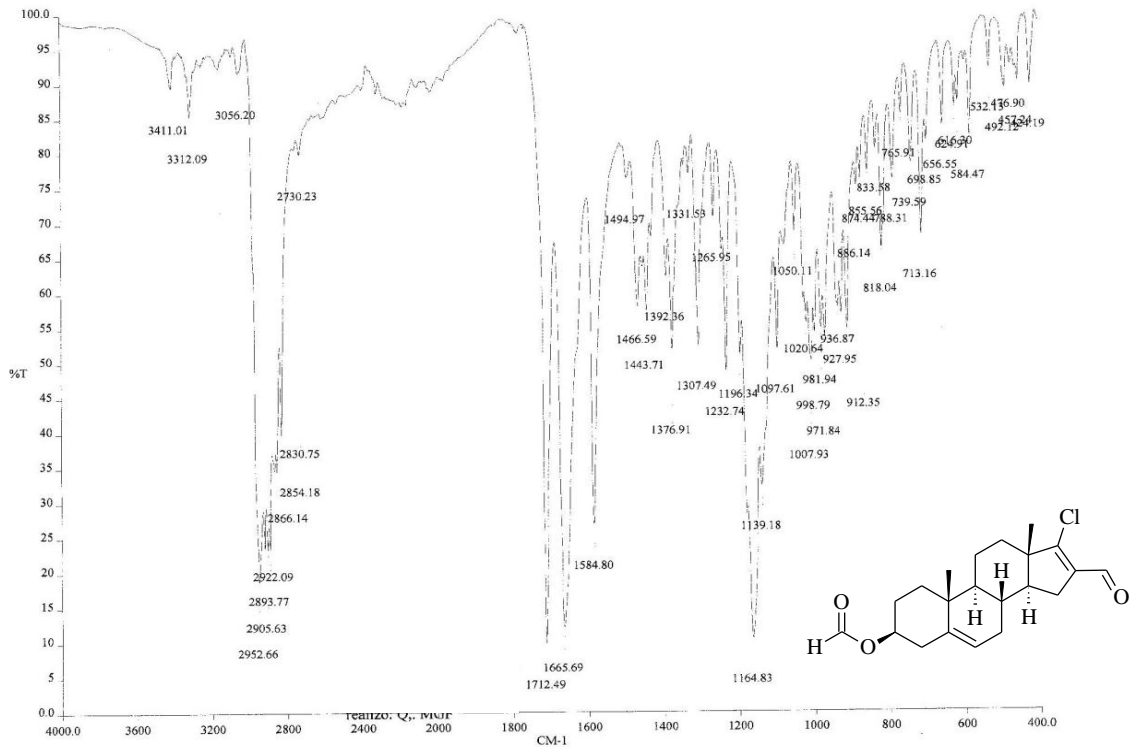
Espectro 2. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 2.



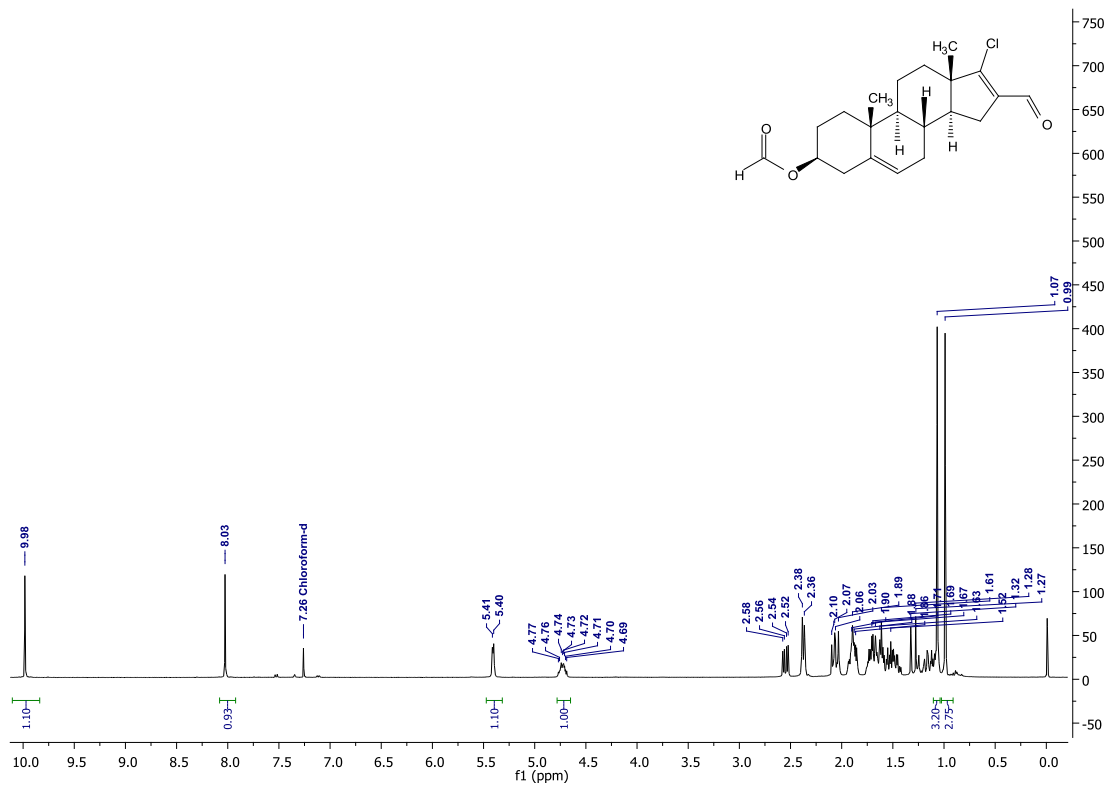
Espectro 3. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 2.



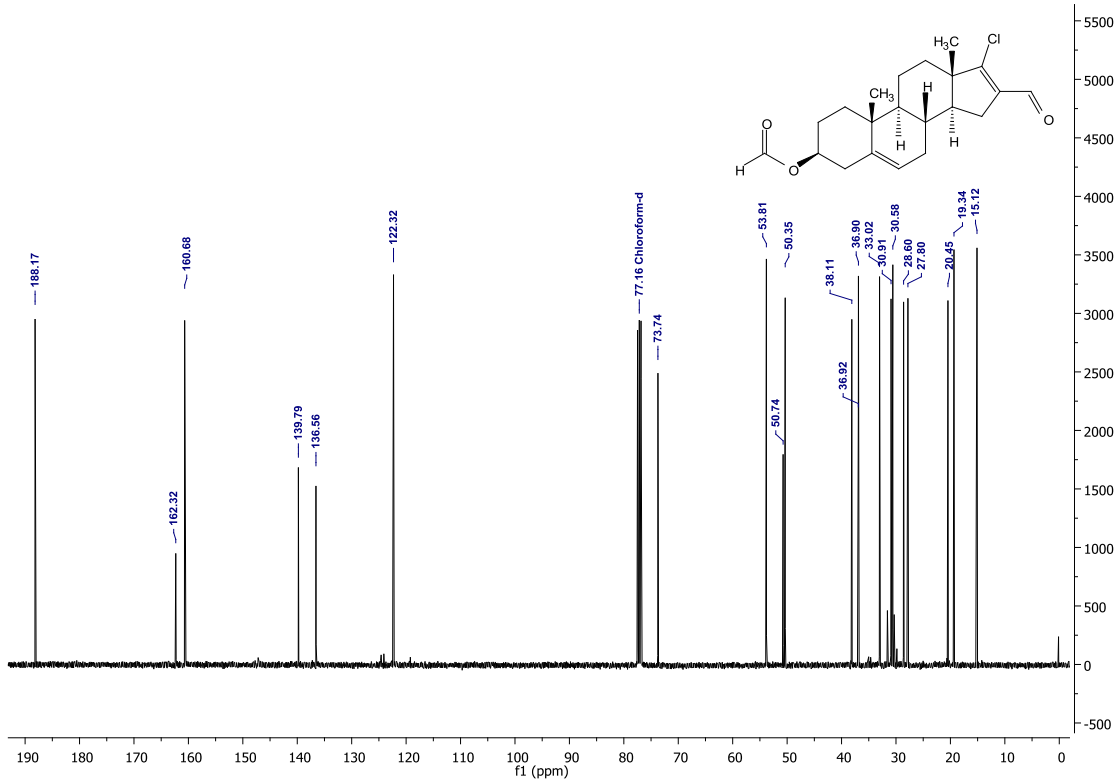
Espectro 4. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 2.



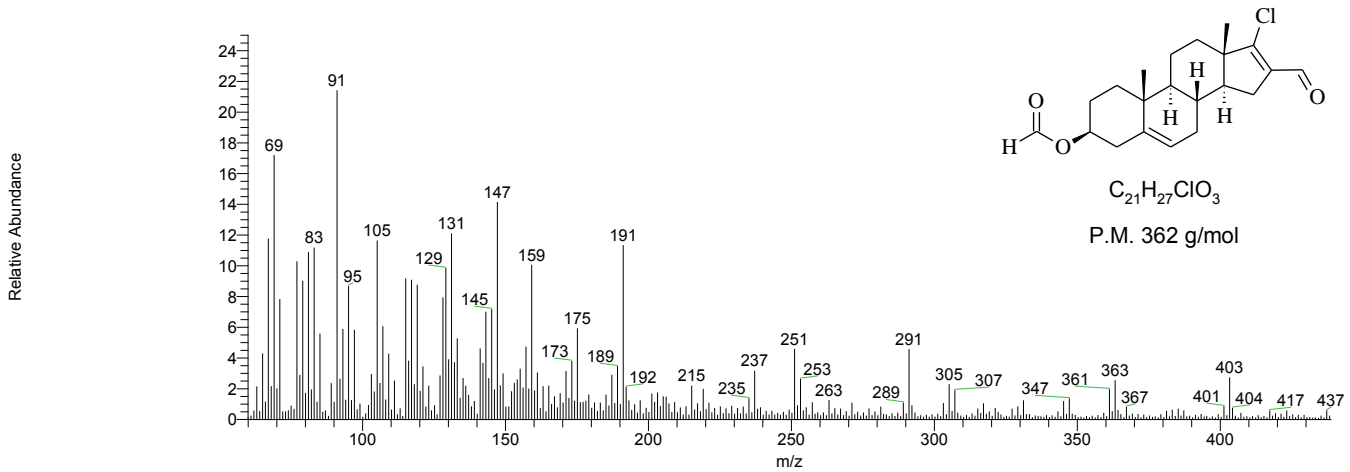
Espectro 5. IR (FTIR-ATR) del compuesto 3.



Espectro 6. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 3.



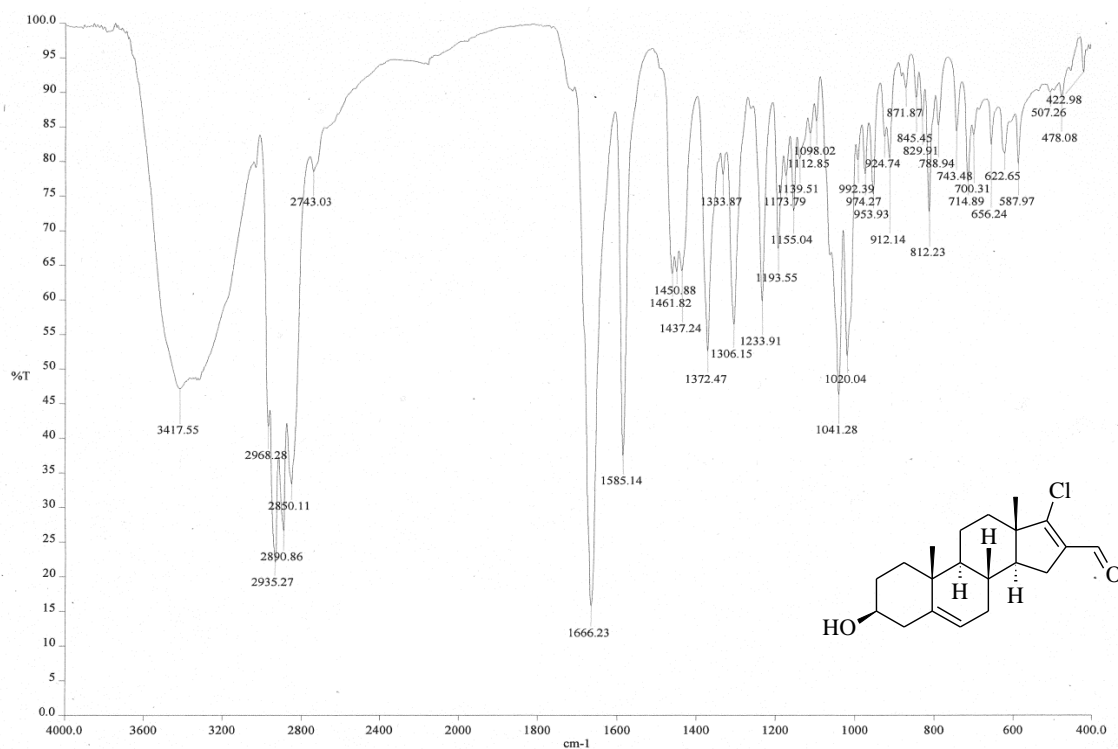
Espectro 7. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 3.



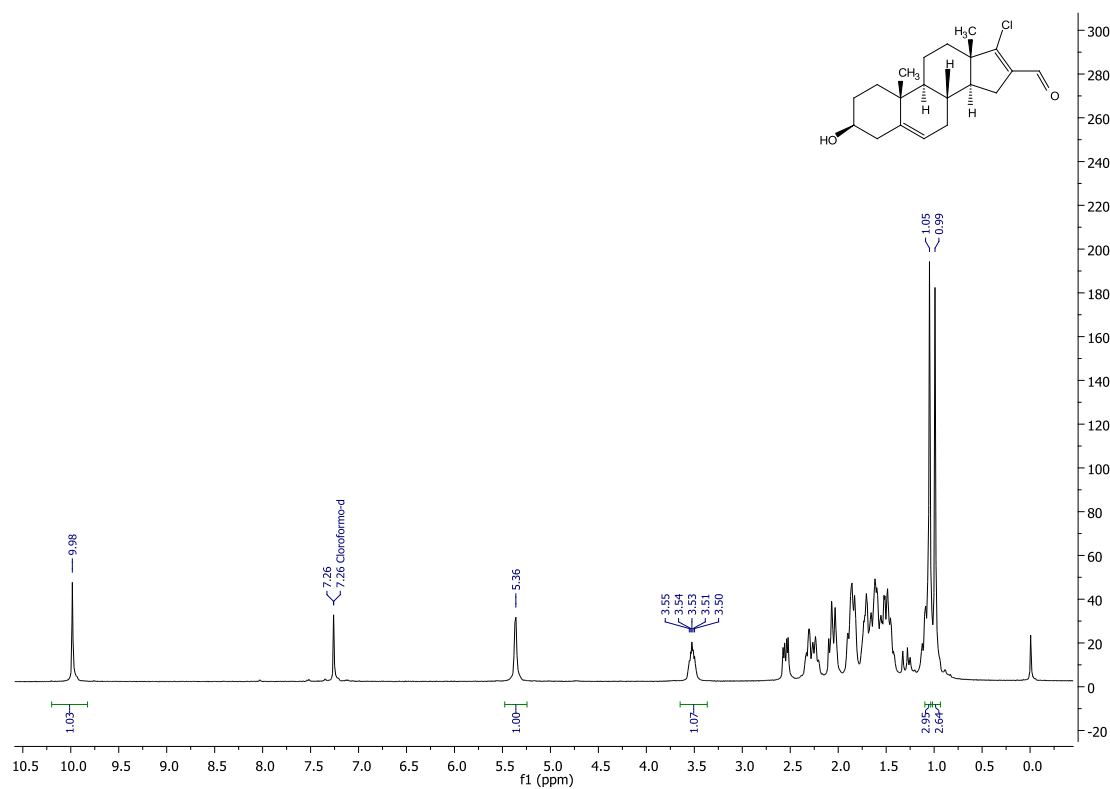
OT8244_1#1-4 RT: 0.00-0.62 AV: 4 NL: 2.89E7

Tiempo de vuelo: 140.50, 200.50

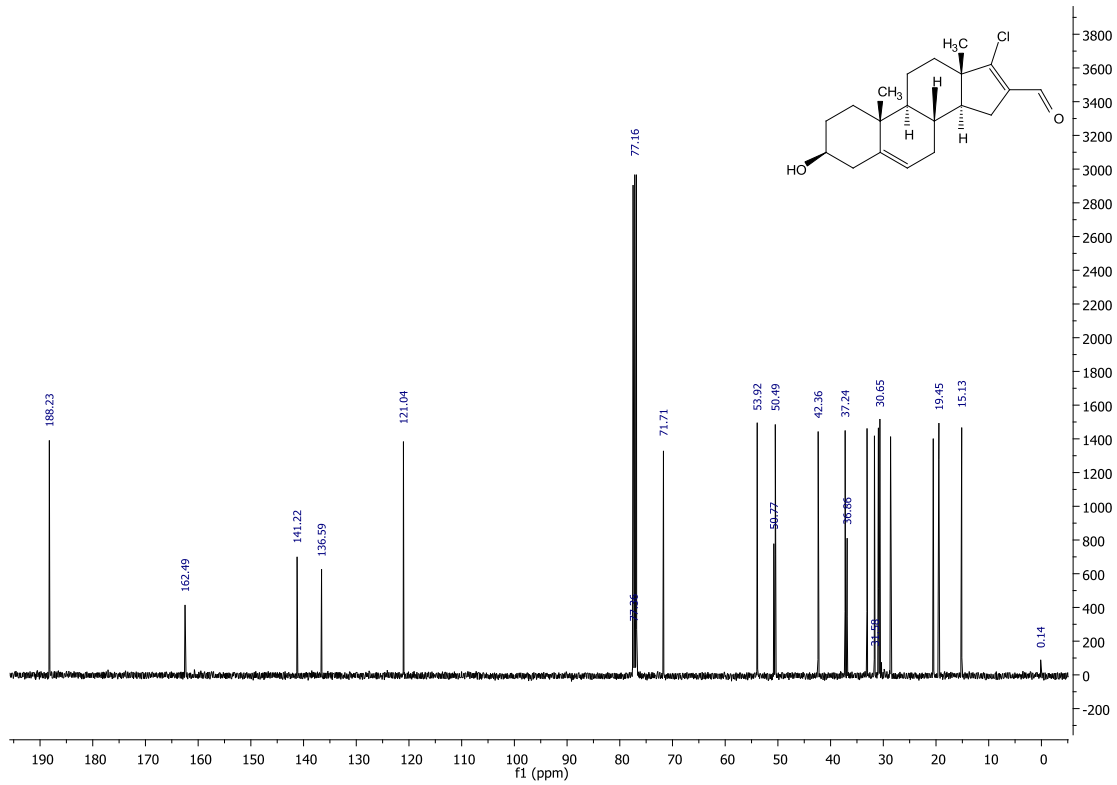
Espectro 8. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 3.



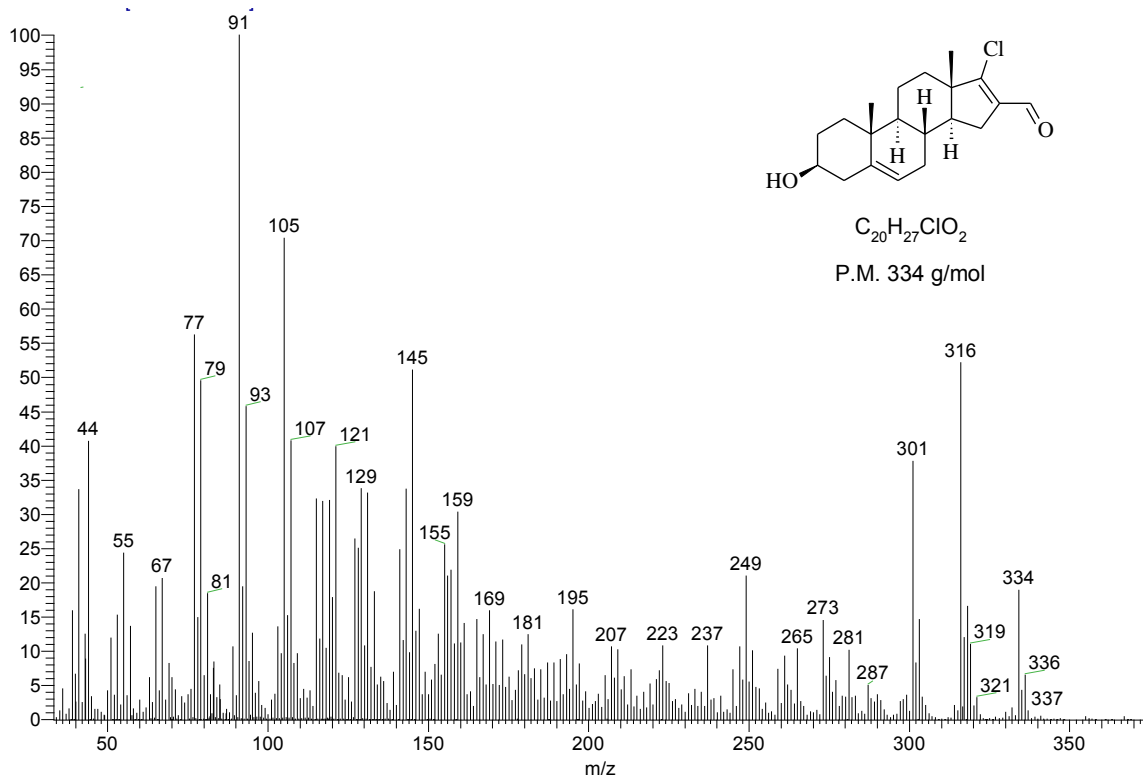
Espectro 9. IR (FTIR-ATR) del compuesto 4.



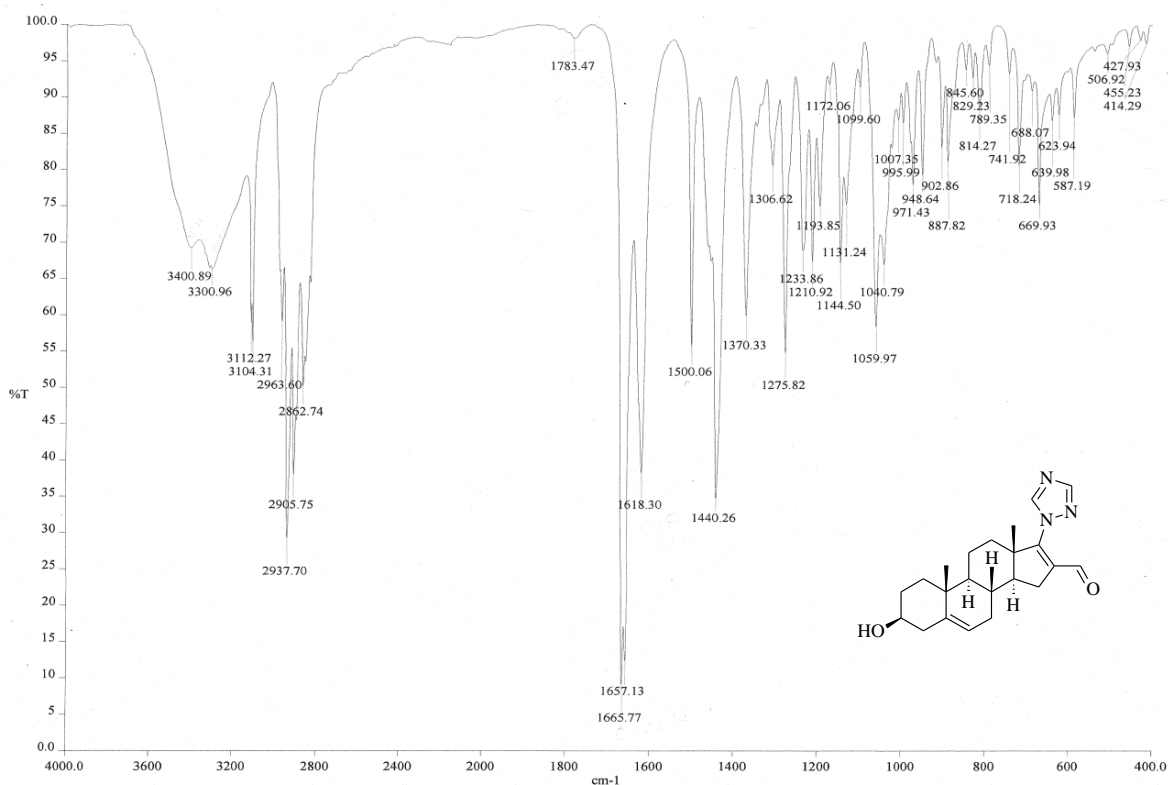
Espectro 10. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 4.



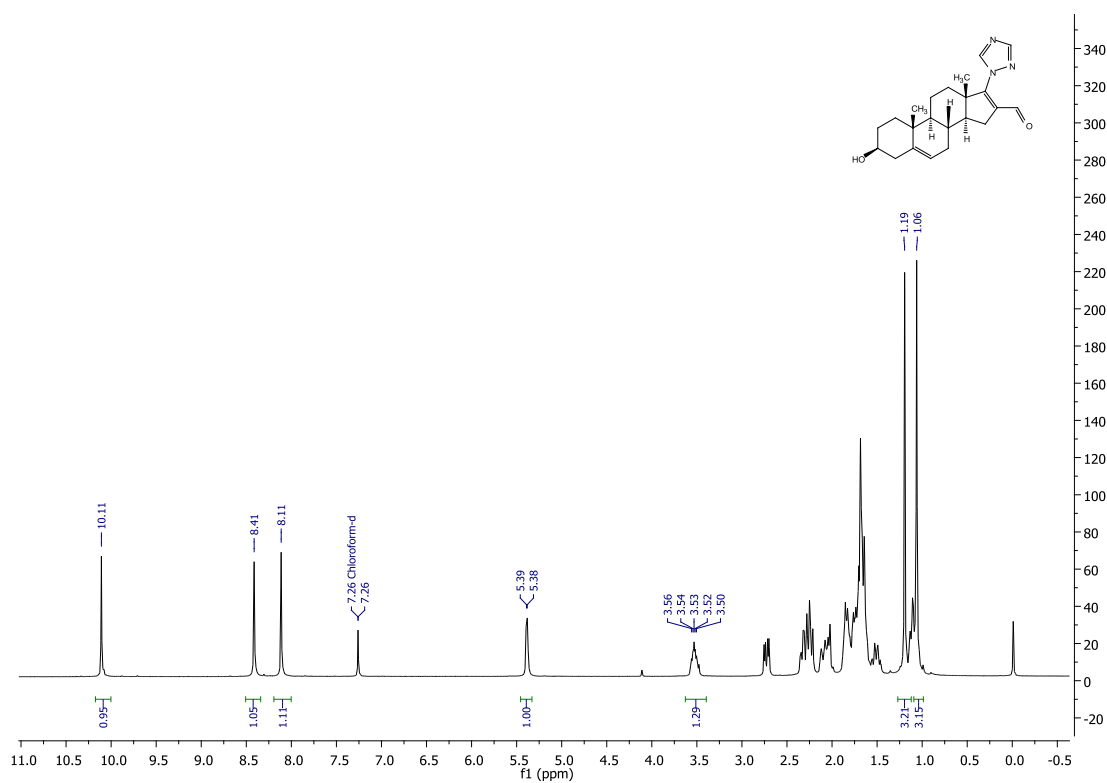
Espectro 11. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 4.



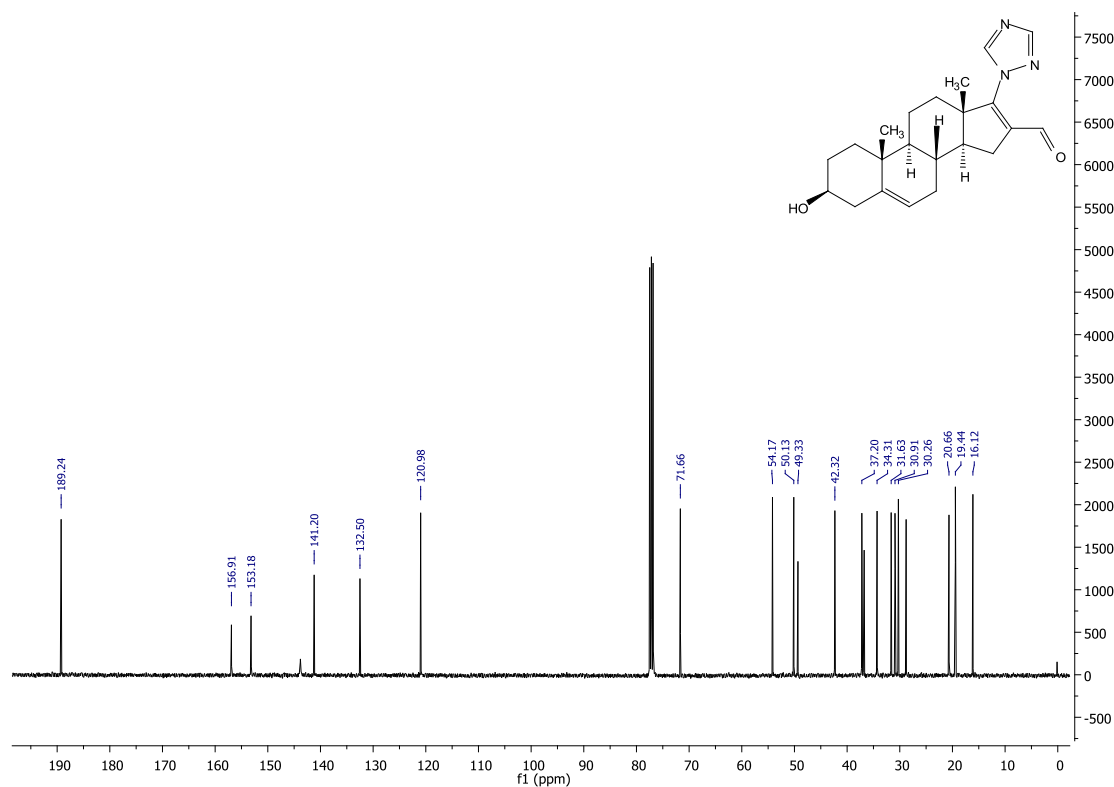
Espectro 12. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 4.



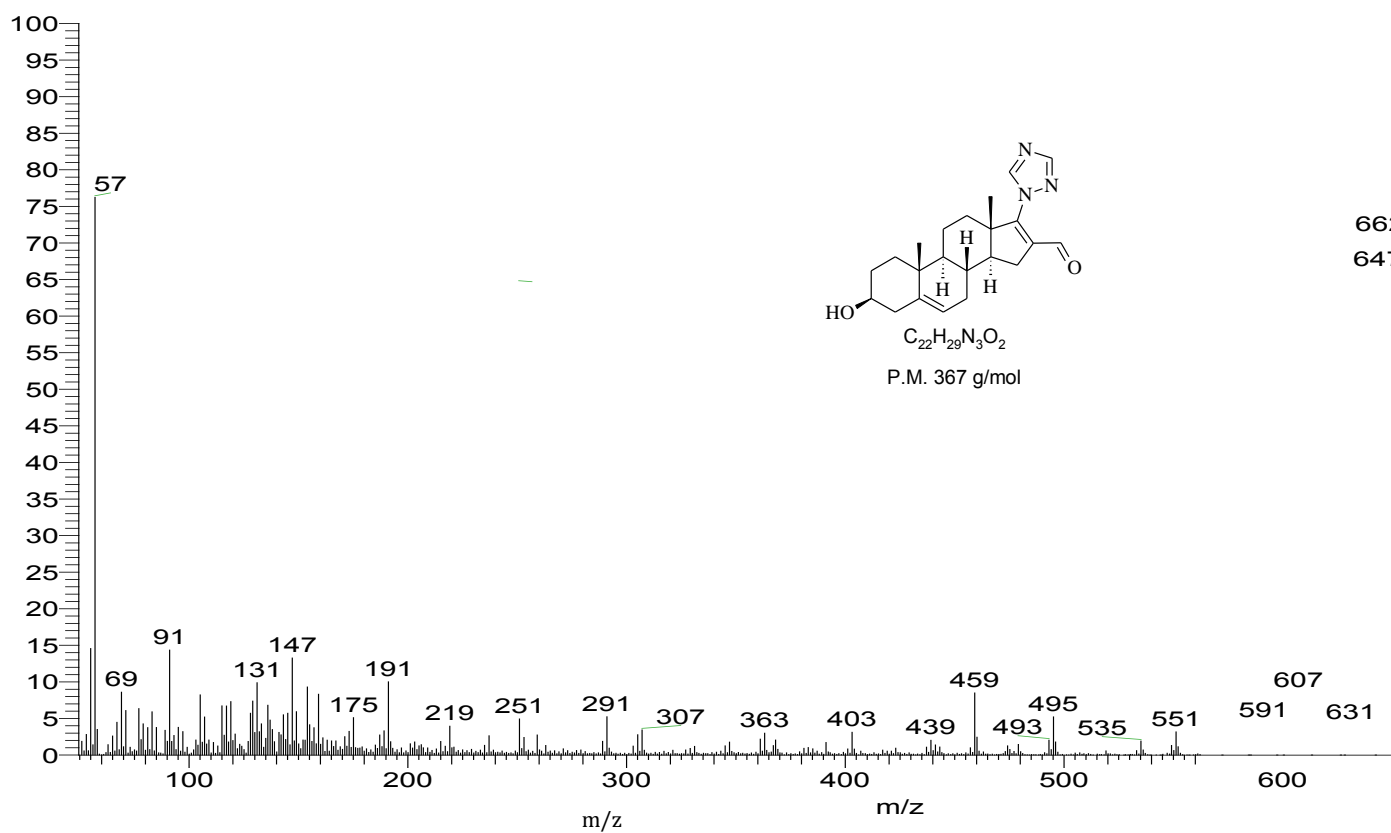
Espectro 13. IR (FTIR-ATR) del compuesto 5.



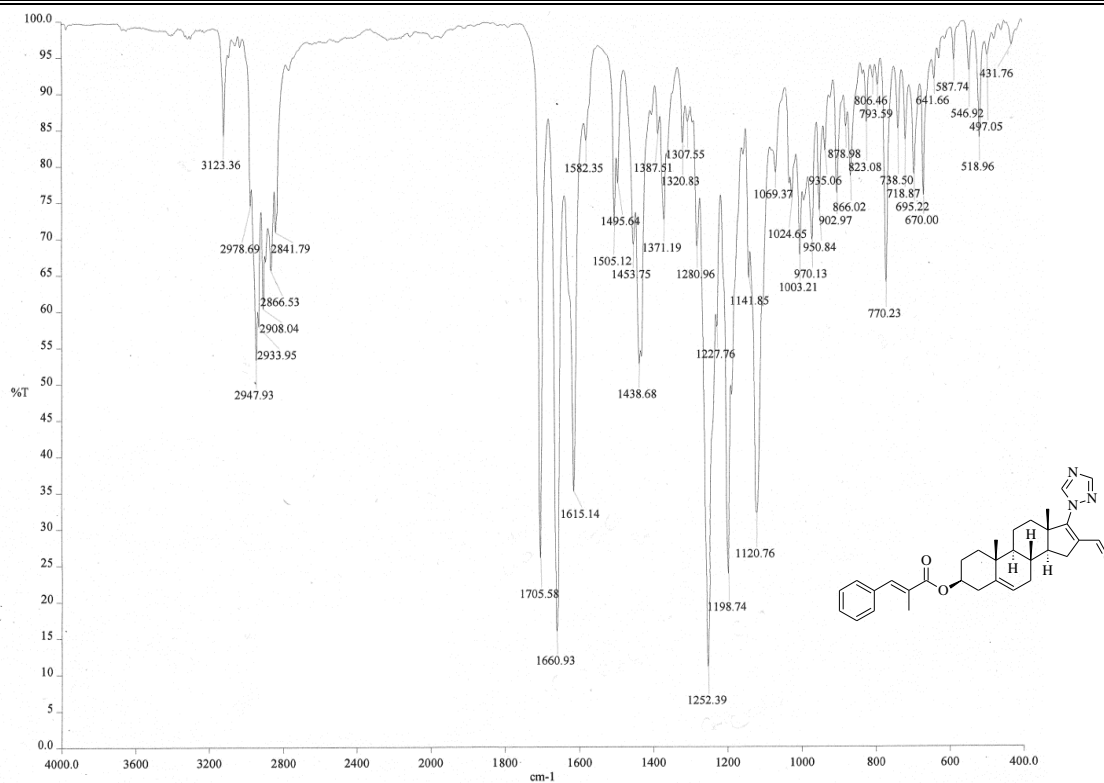
Espectro 14. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 5.



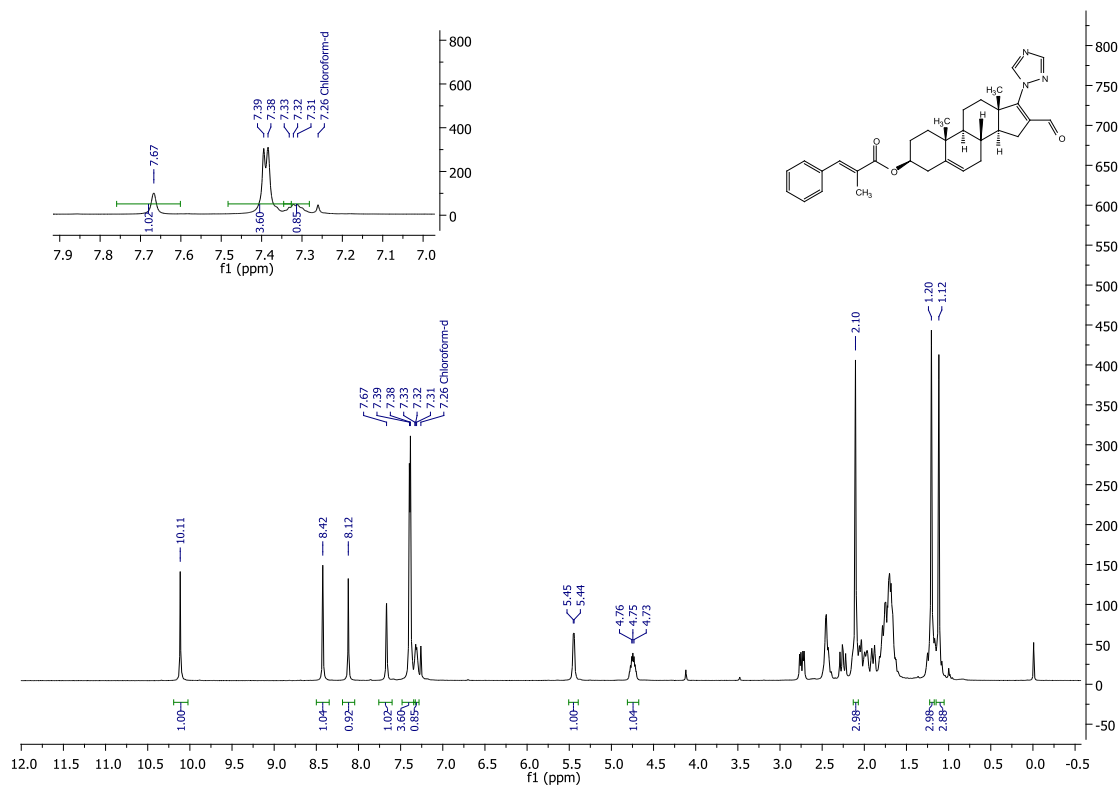
Spectro 15. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 5.



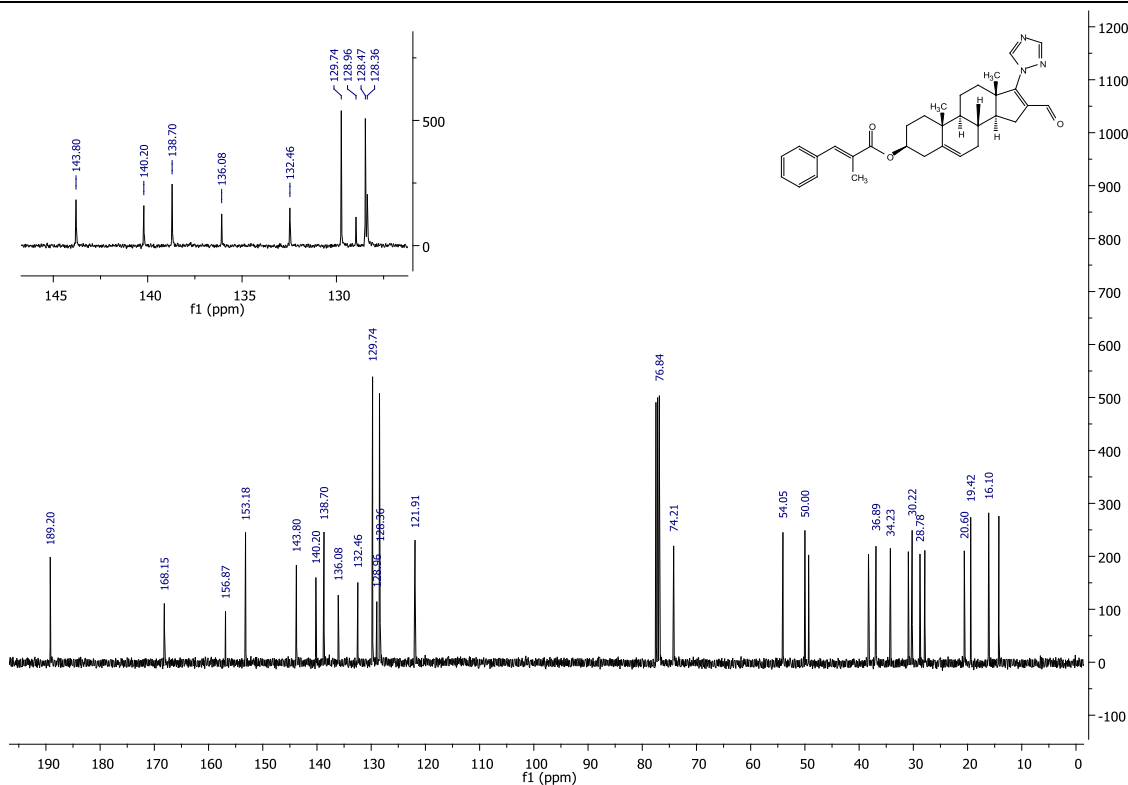
Spectro 16. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 5.



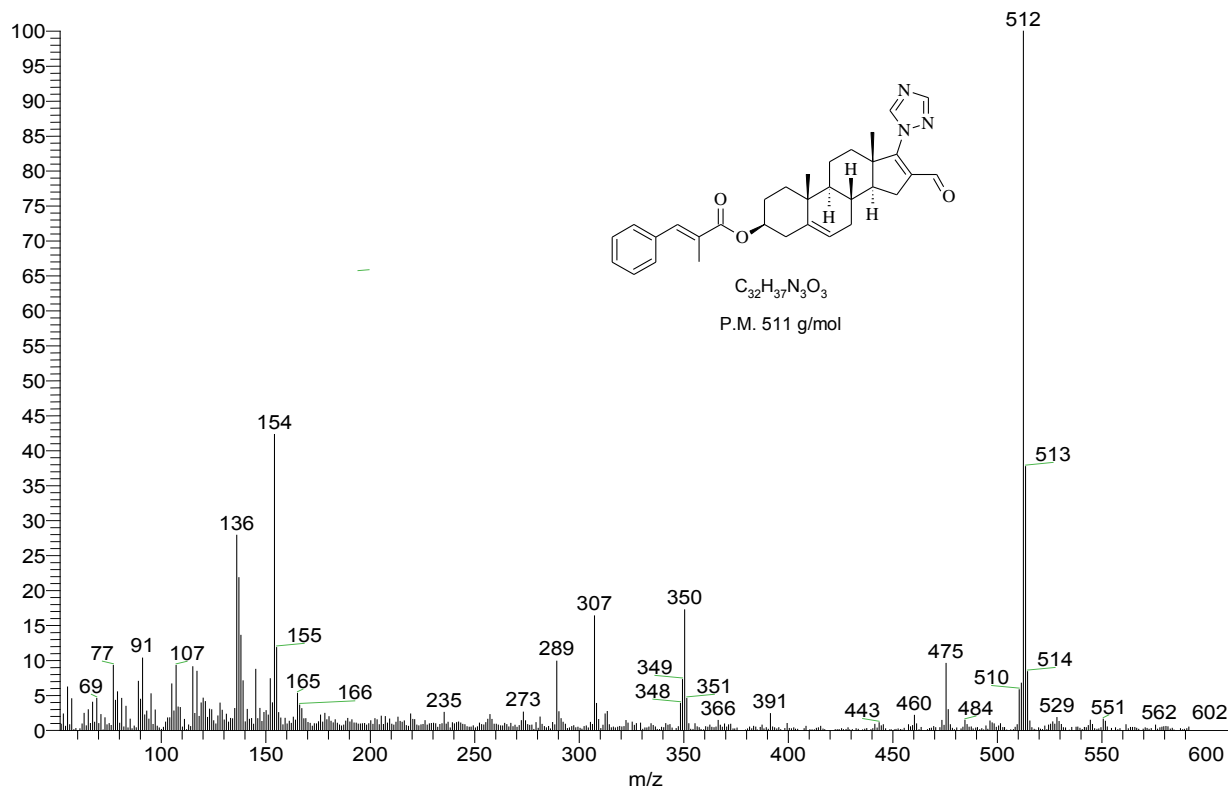
Espectro 17. IR (FTIR-ATR) del compuesto 6a.



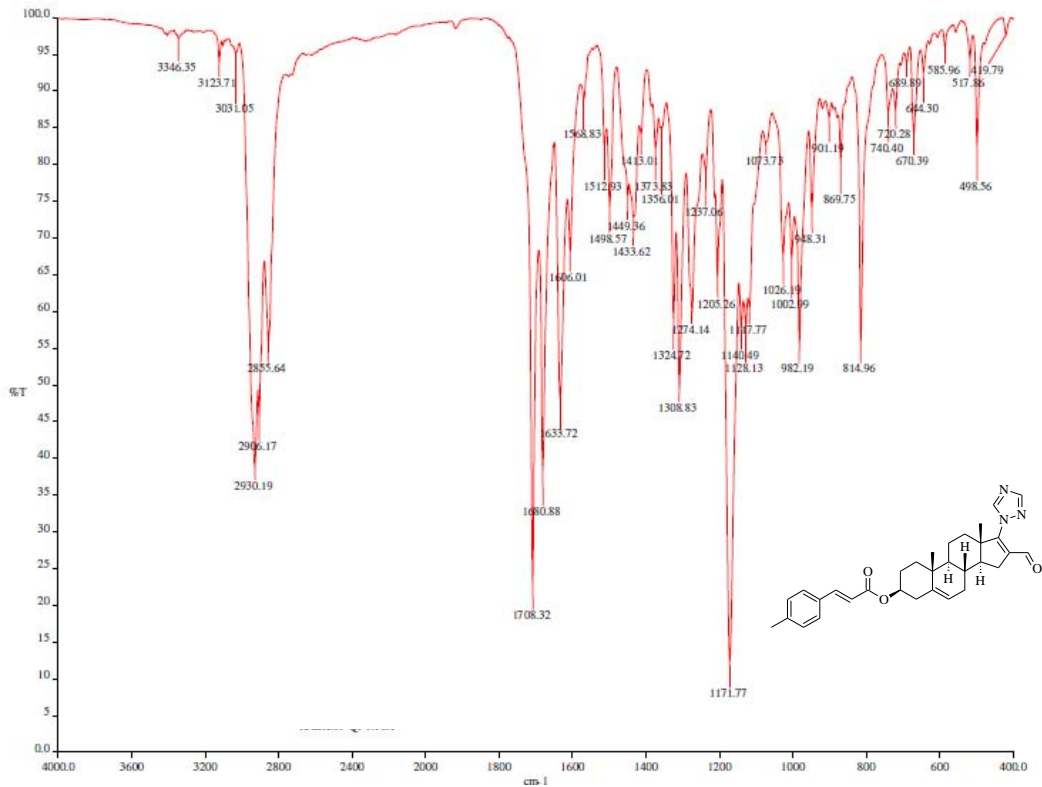
Espectro 18. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 6a.



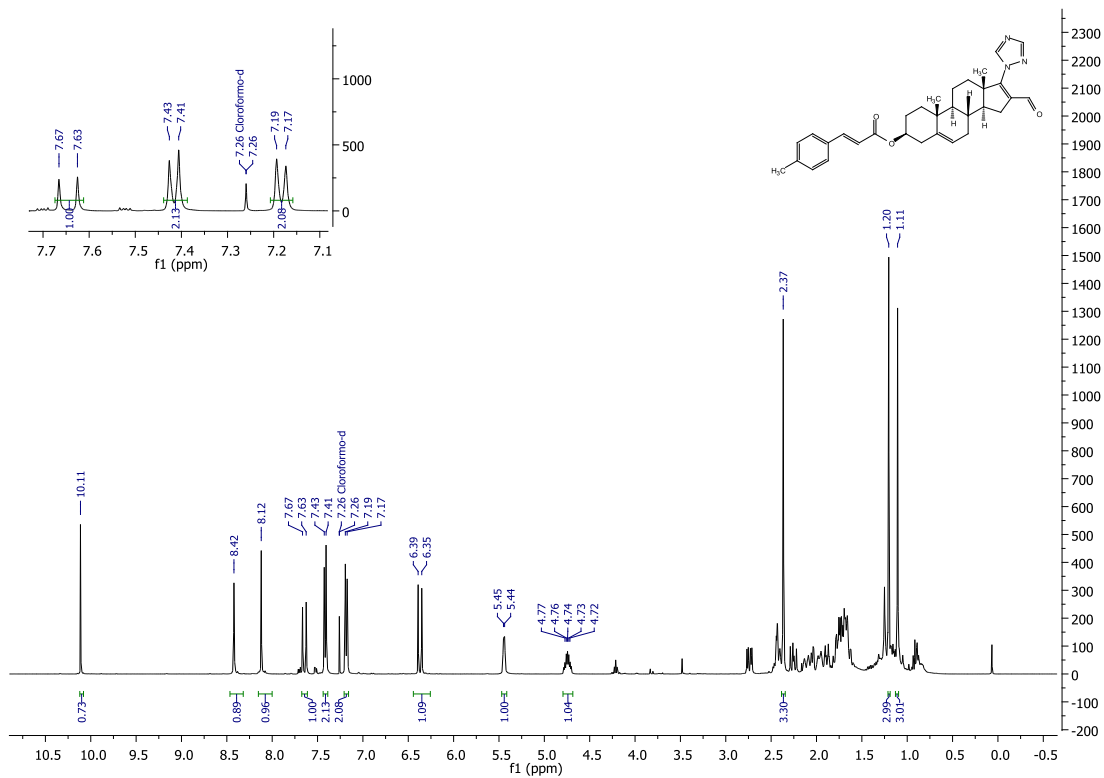
Espectro 19. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 6a.



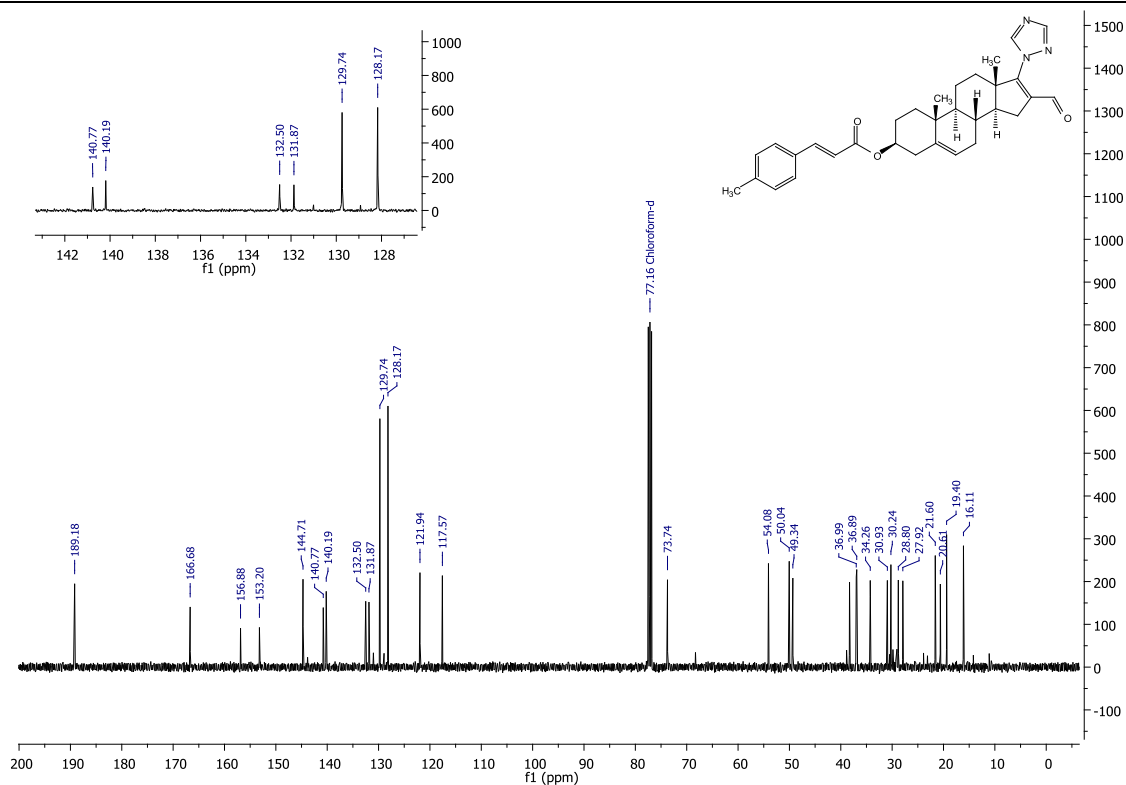
Espectro 20. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 6a.



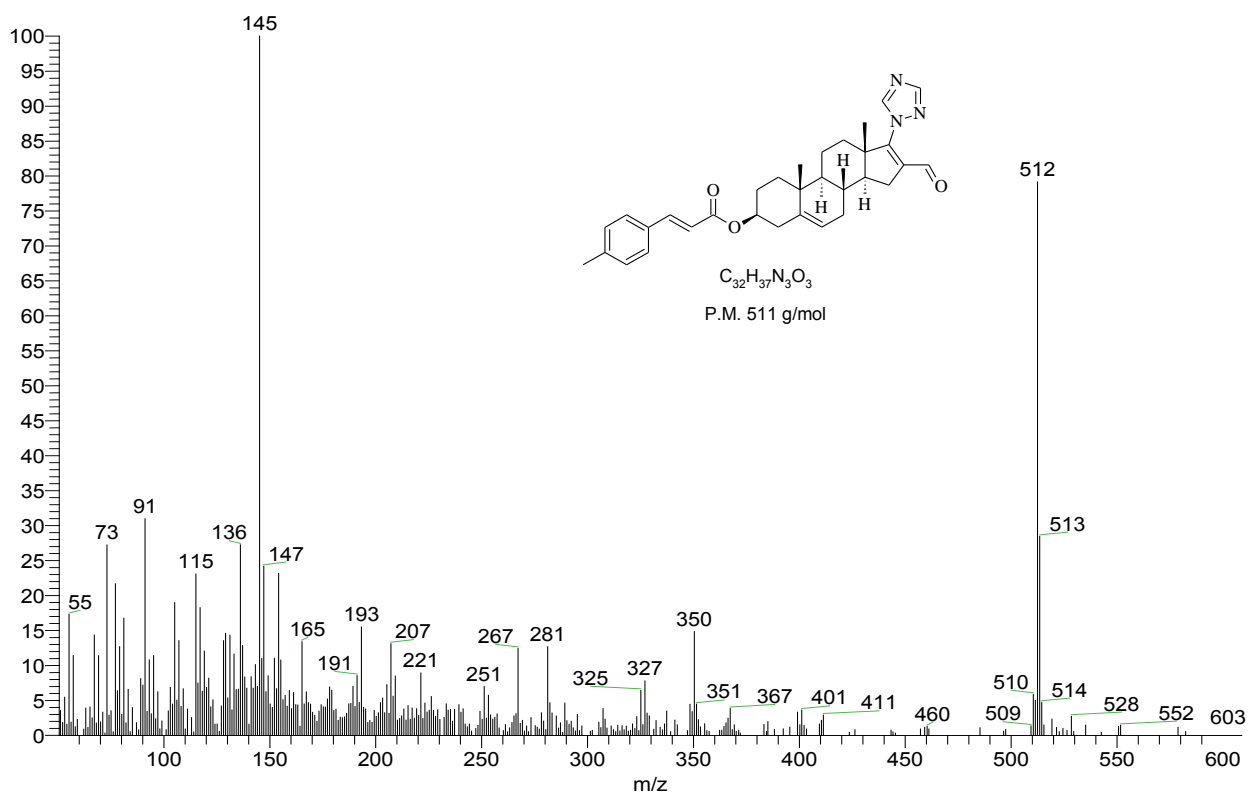
Espectro 21. IR (FTIR-ATR) del compuesto 6b.



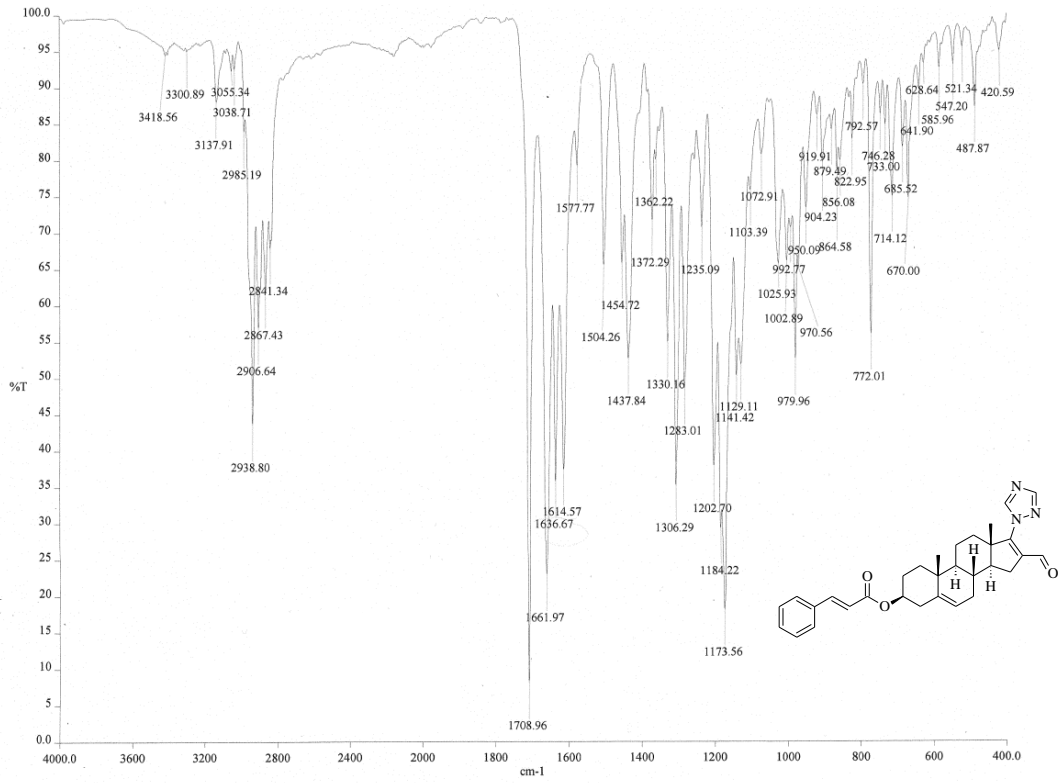
Espectro 22. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 6b.



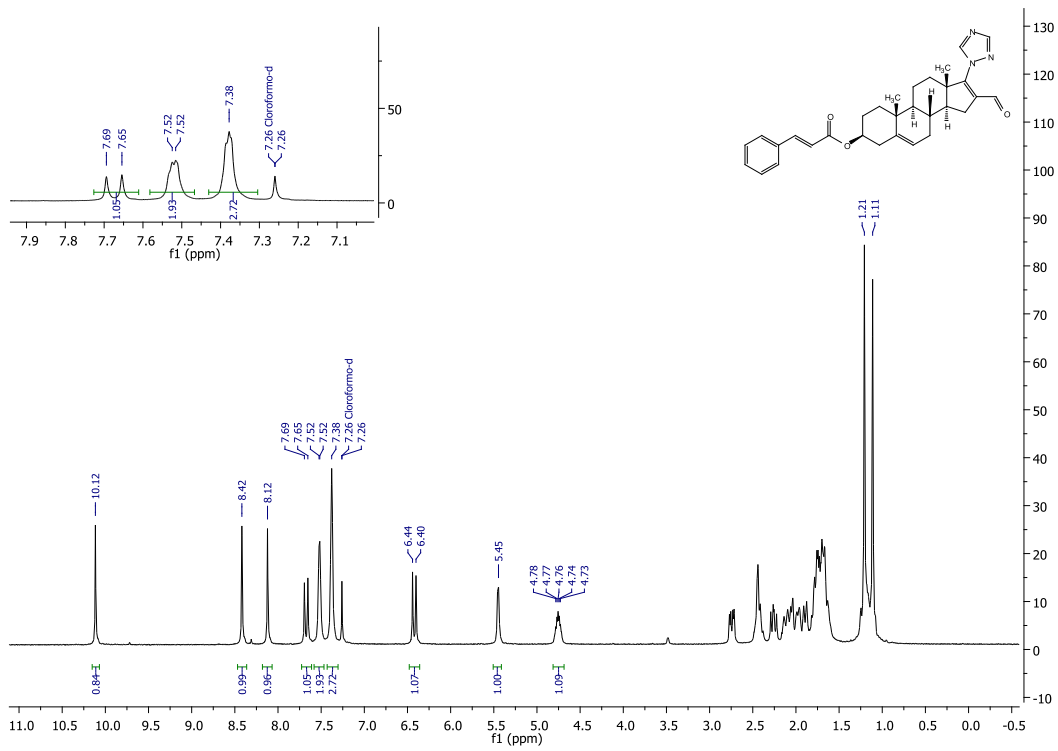
Espectro 23. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 6b.



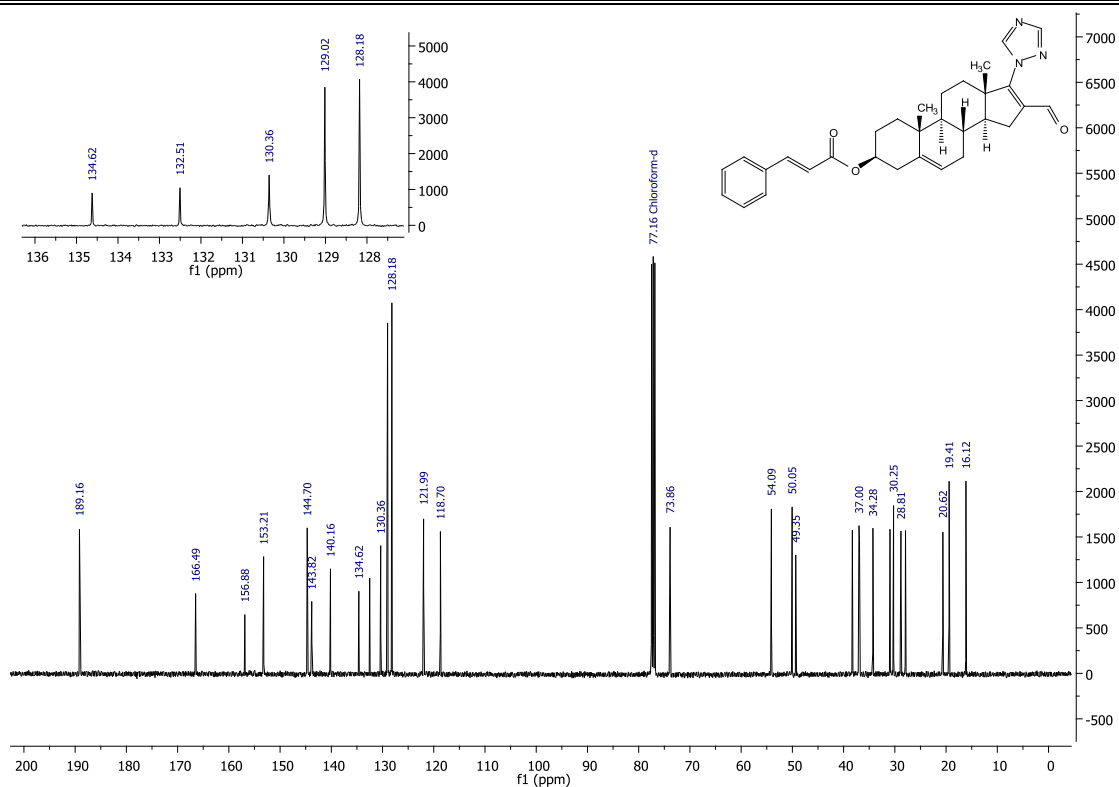
Espectro 24. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 6b.



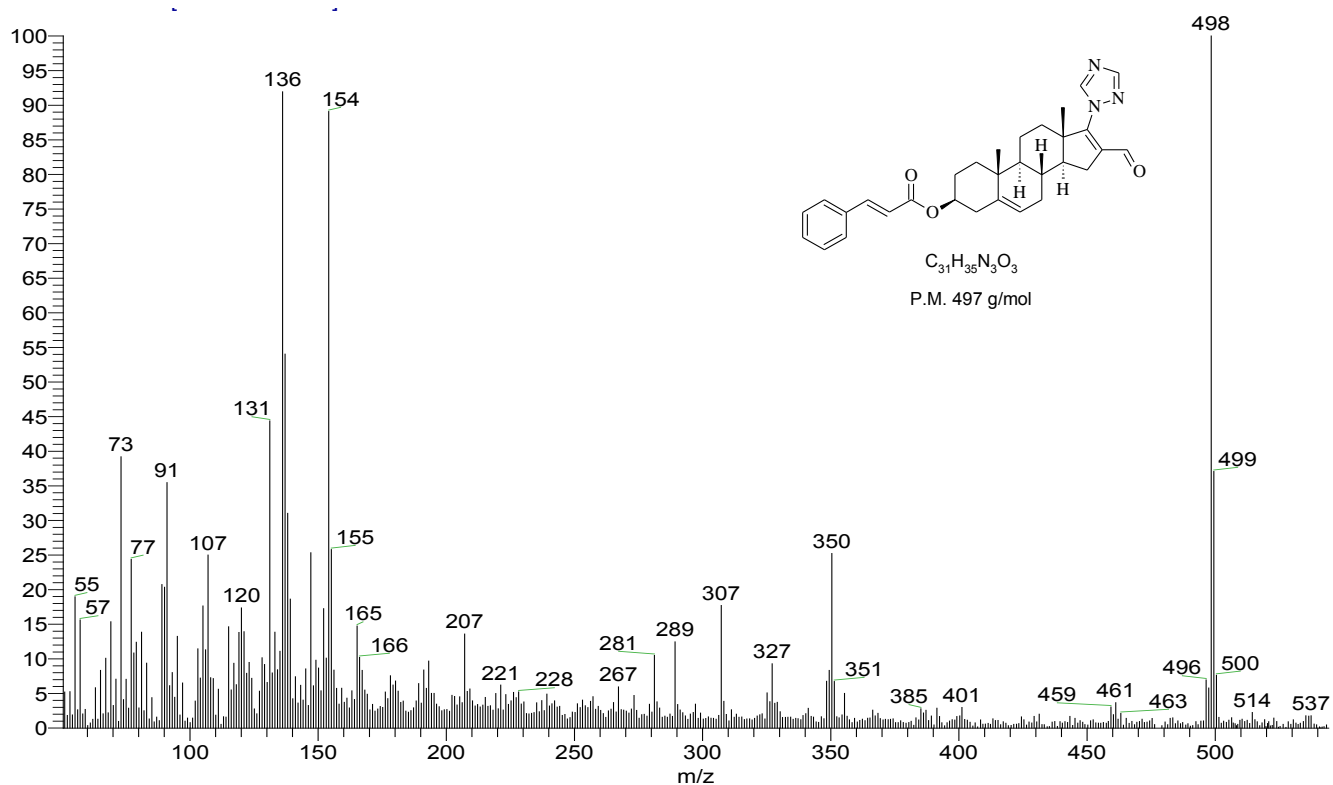
Espectro 25. IR (FTIR-ATR) del compuesto 6c.



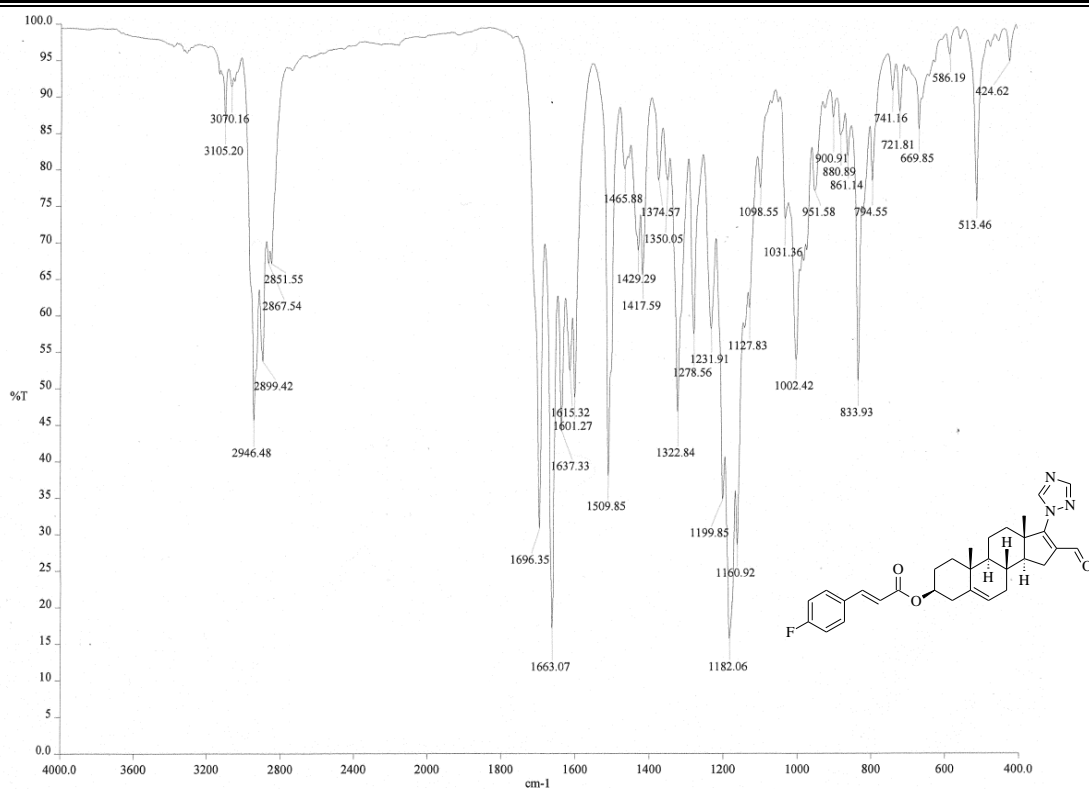
Espectro 26. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 6c.



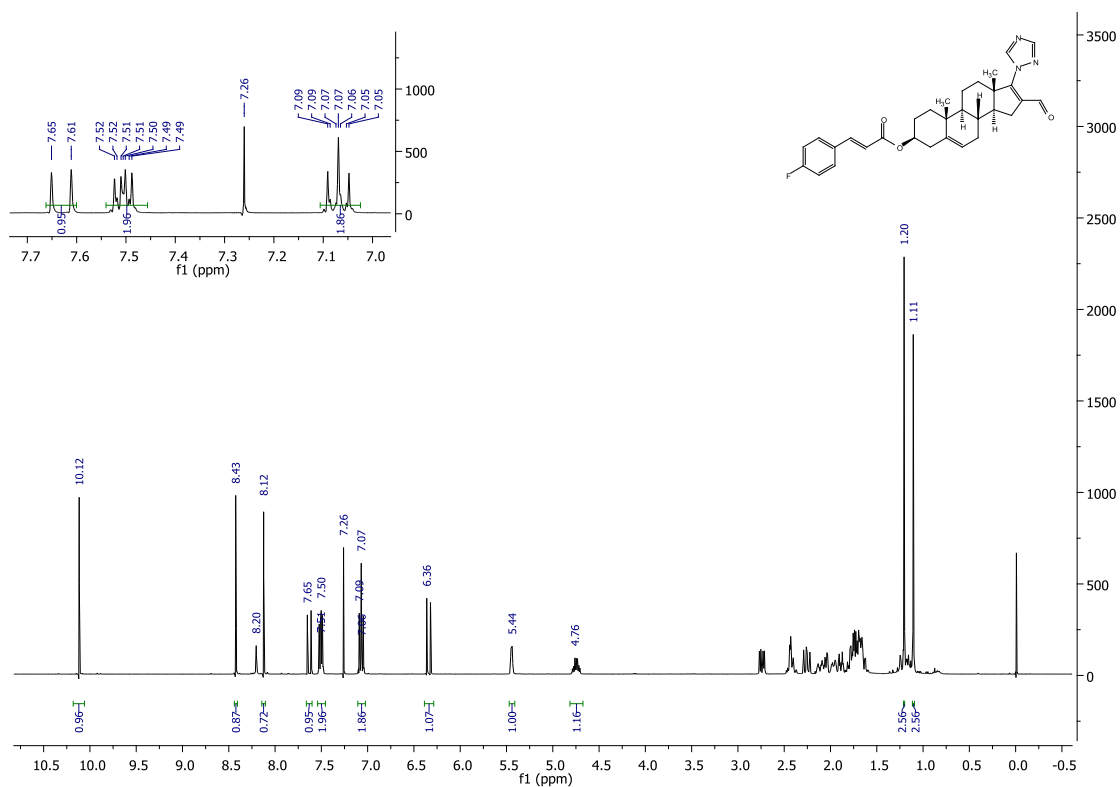
Espectro 27. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 6c.



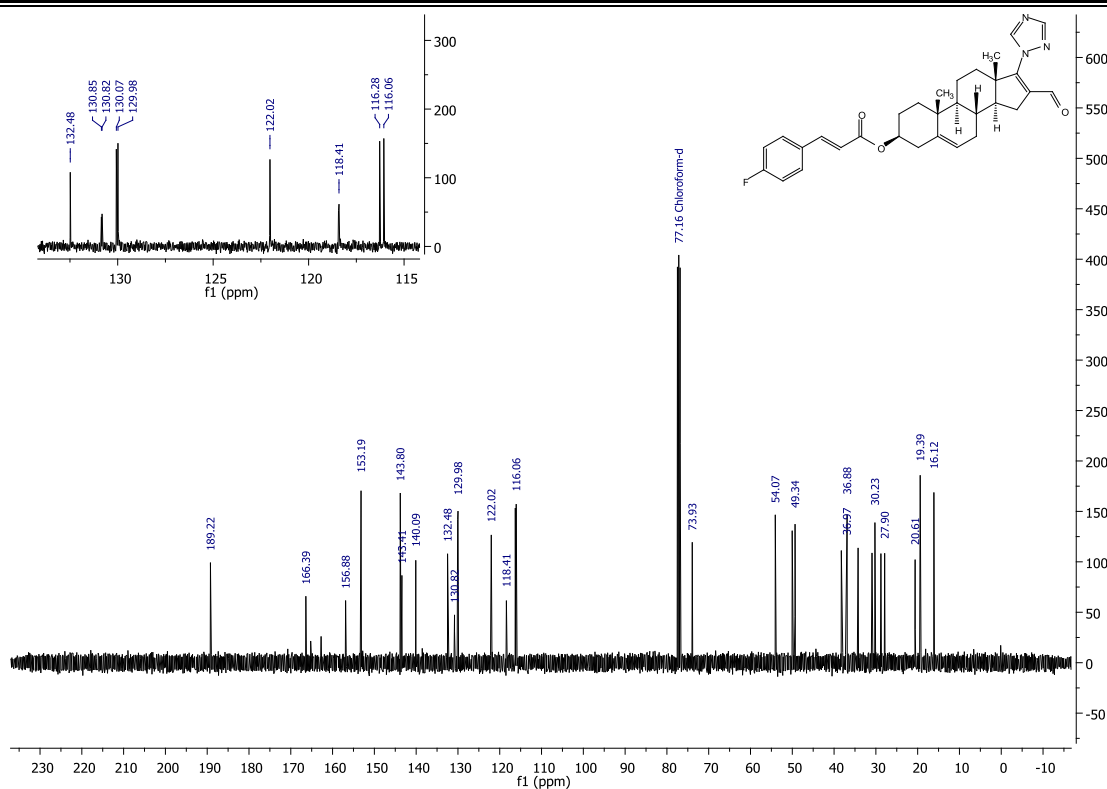
Espectro 28. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 6c.



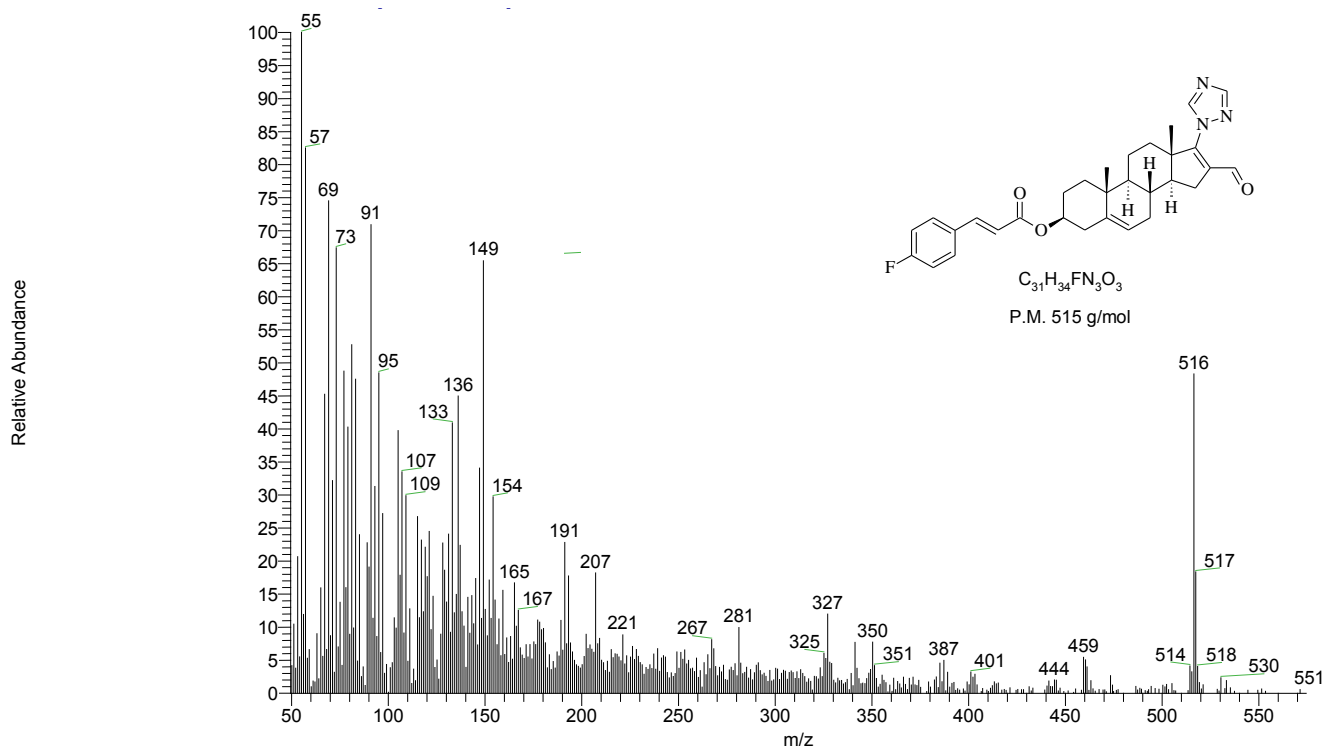
Espectro 29. IR (FTIR-ATR) del compuesto 6d.



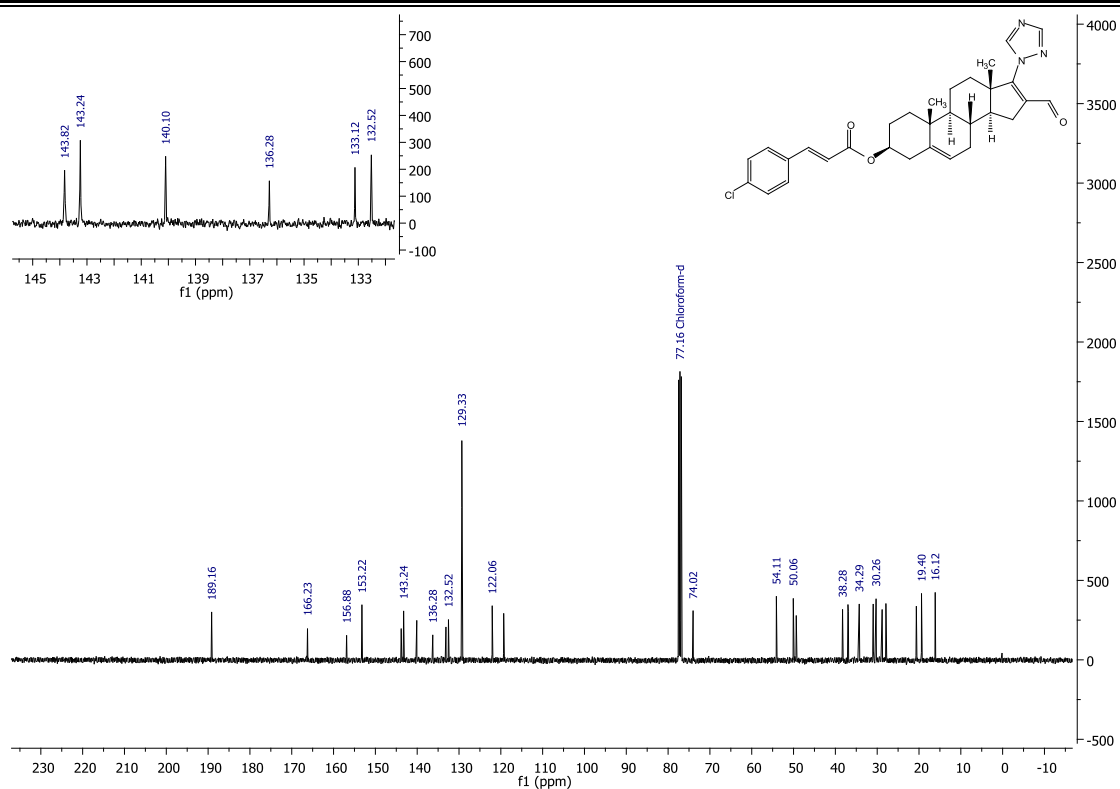
Espectro 30. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 6d.



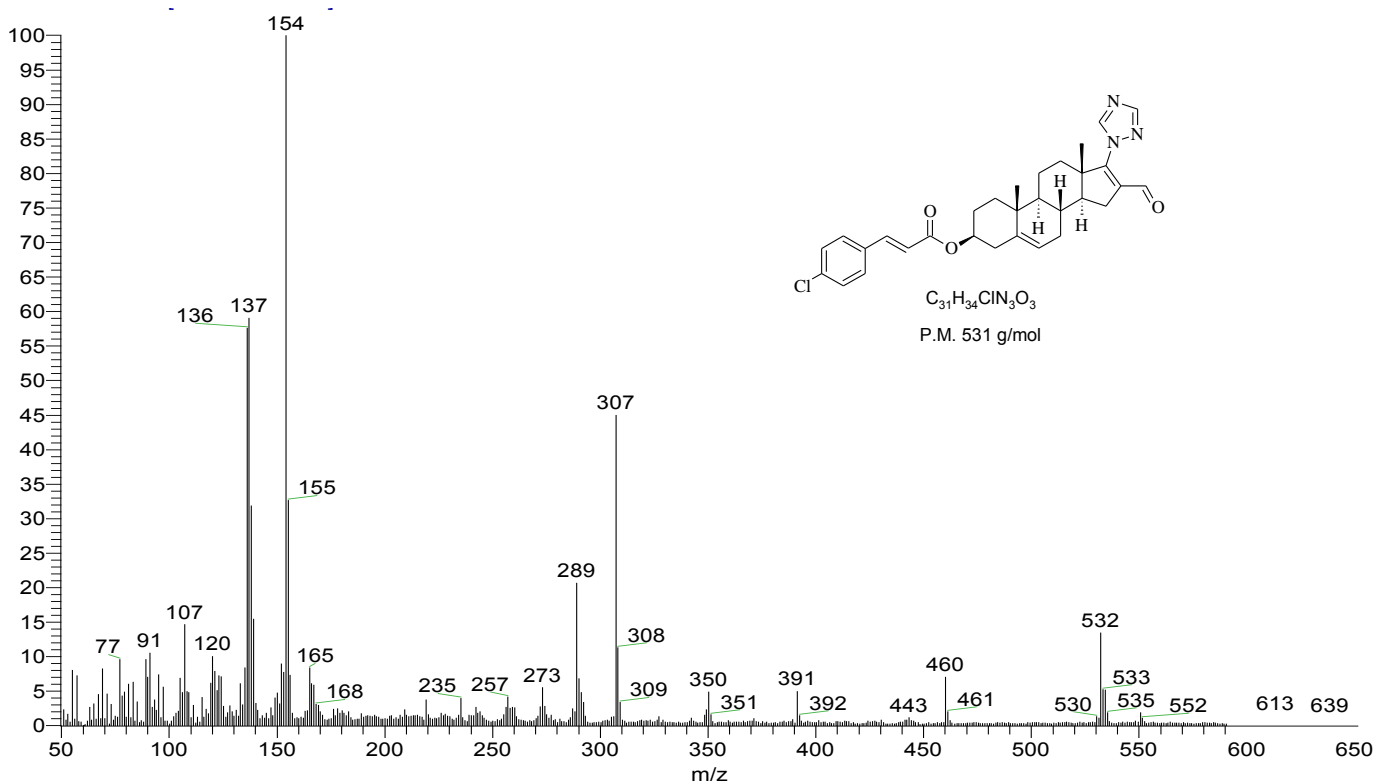
Espectro 31. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 6d.



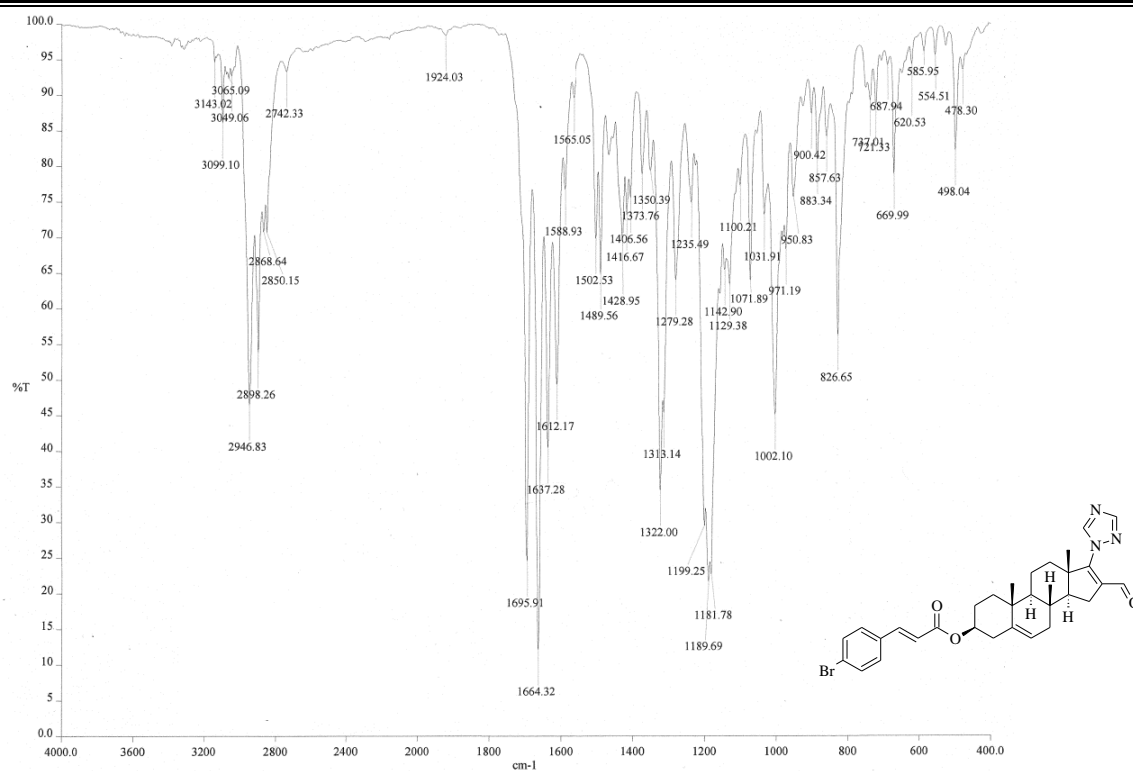
Espectro 32. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 6d.



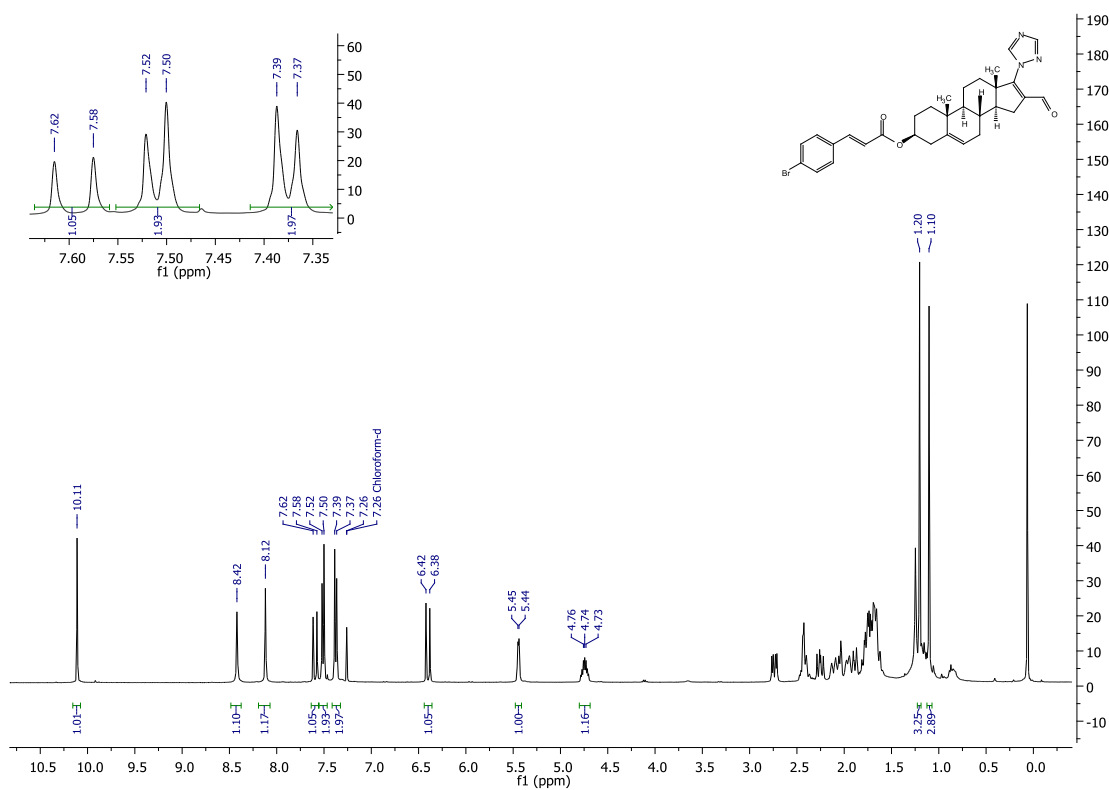
Espectro 35. RMN- ^{13}C (CDCl_3) del compuesto 6e.



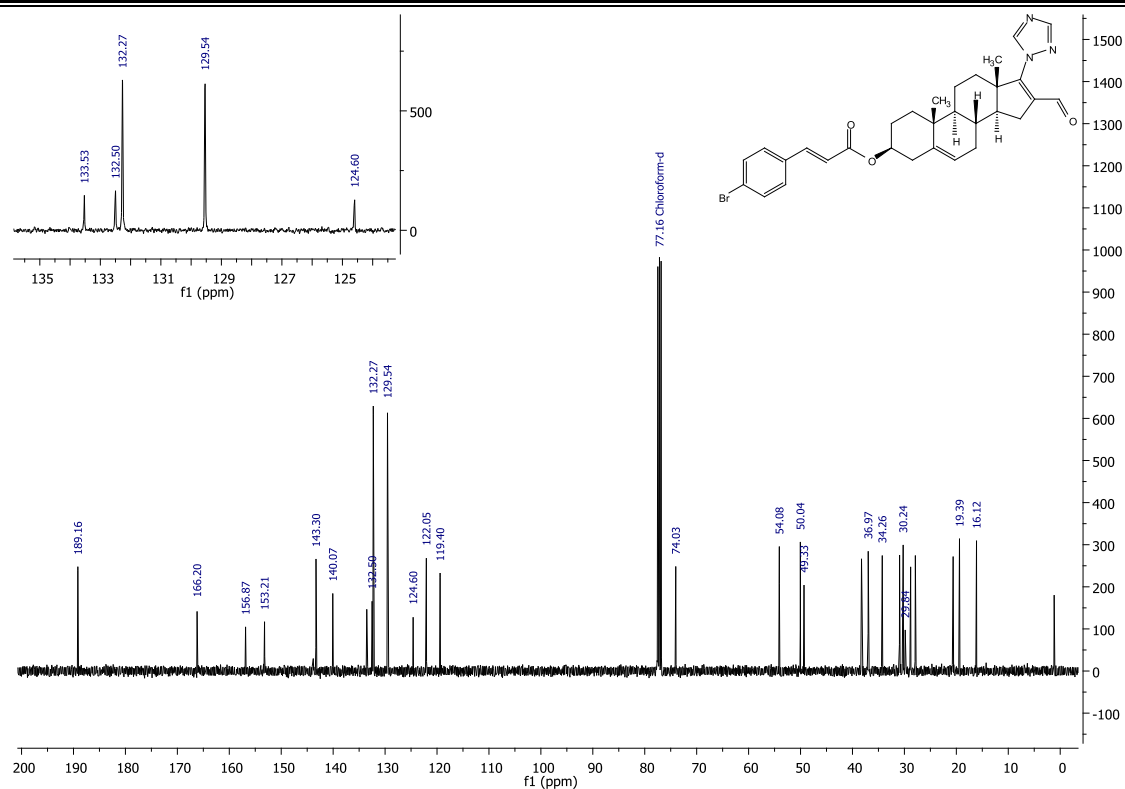
Espectro 36. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 6e.



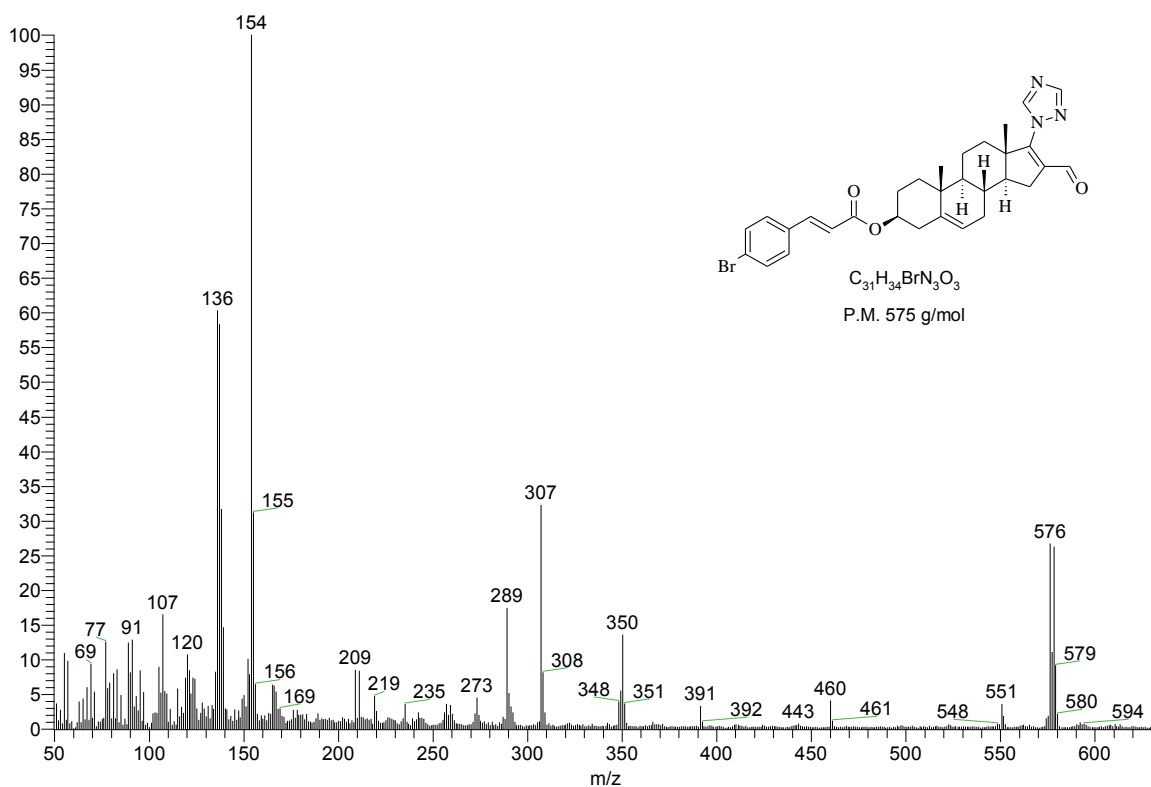
Espectro 37. IR (FTIR-ATR) del compuesto 6f.



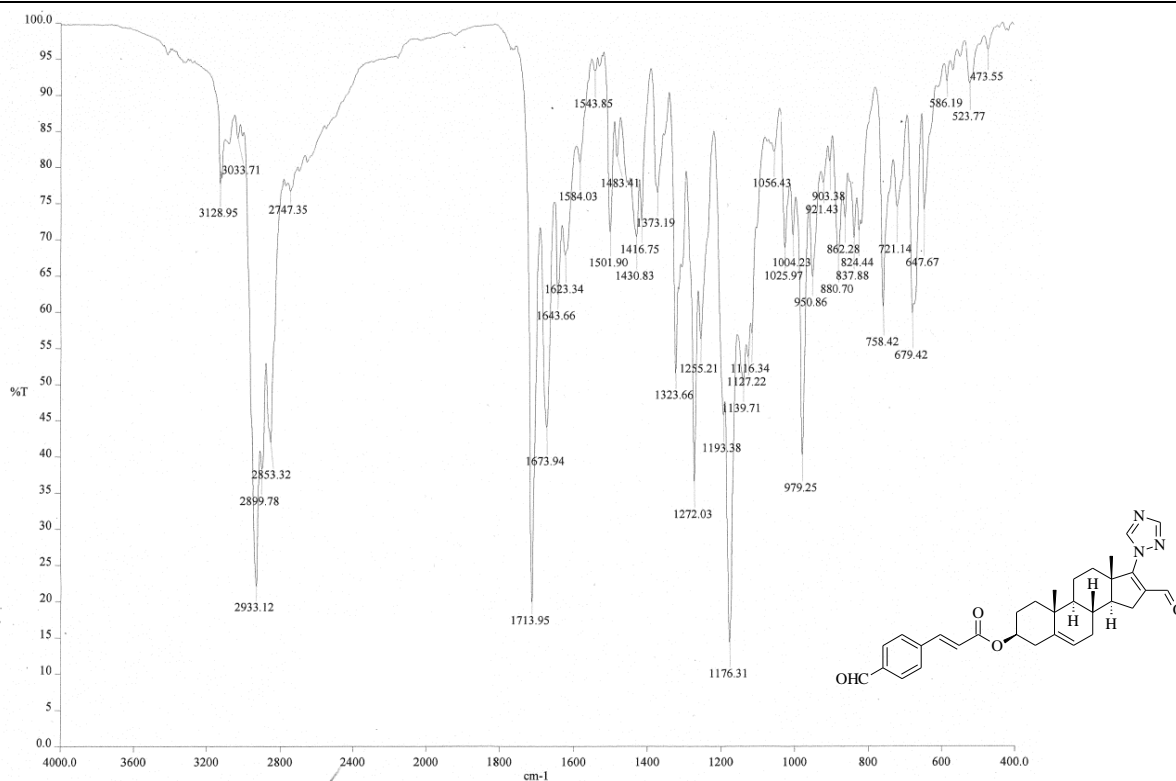
Espectro 38. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 6f.



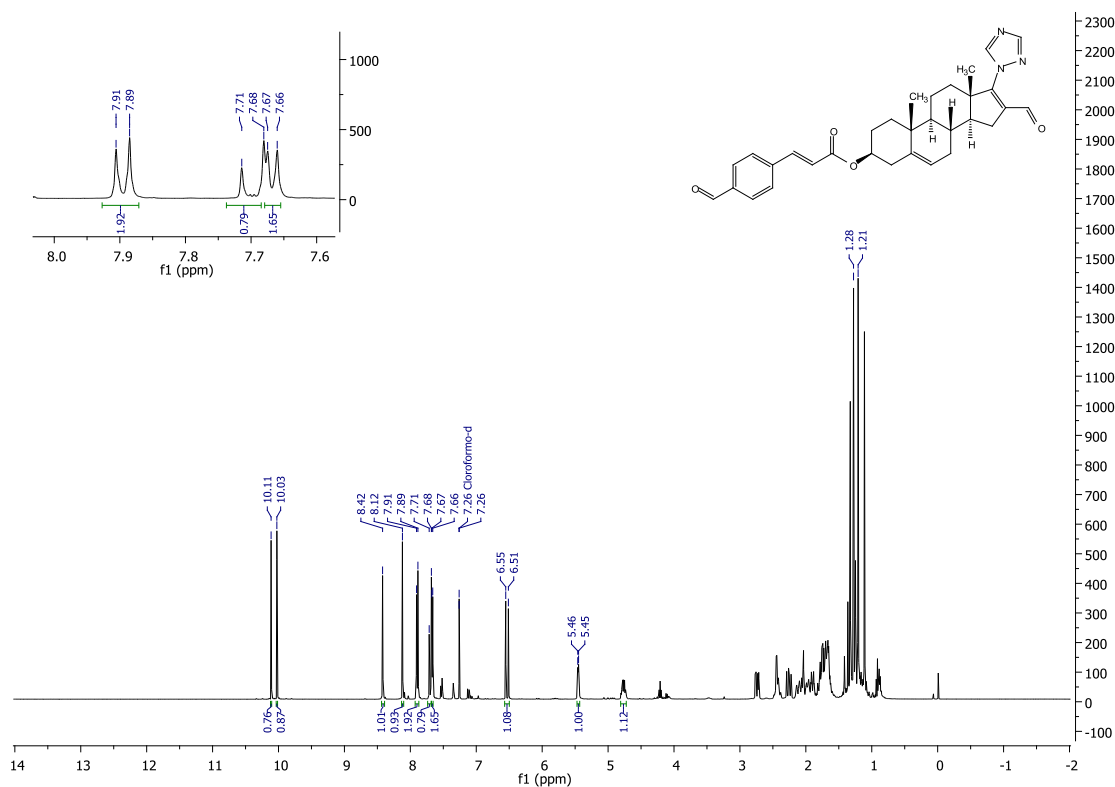
Espectro 39. RMN- ^{13}C (CDCl_3) del compuesto 6f.



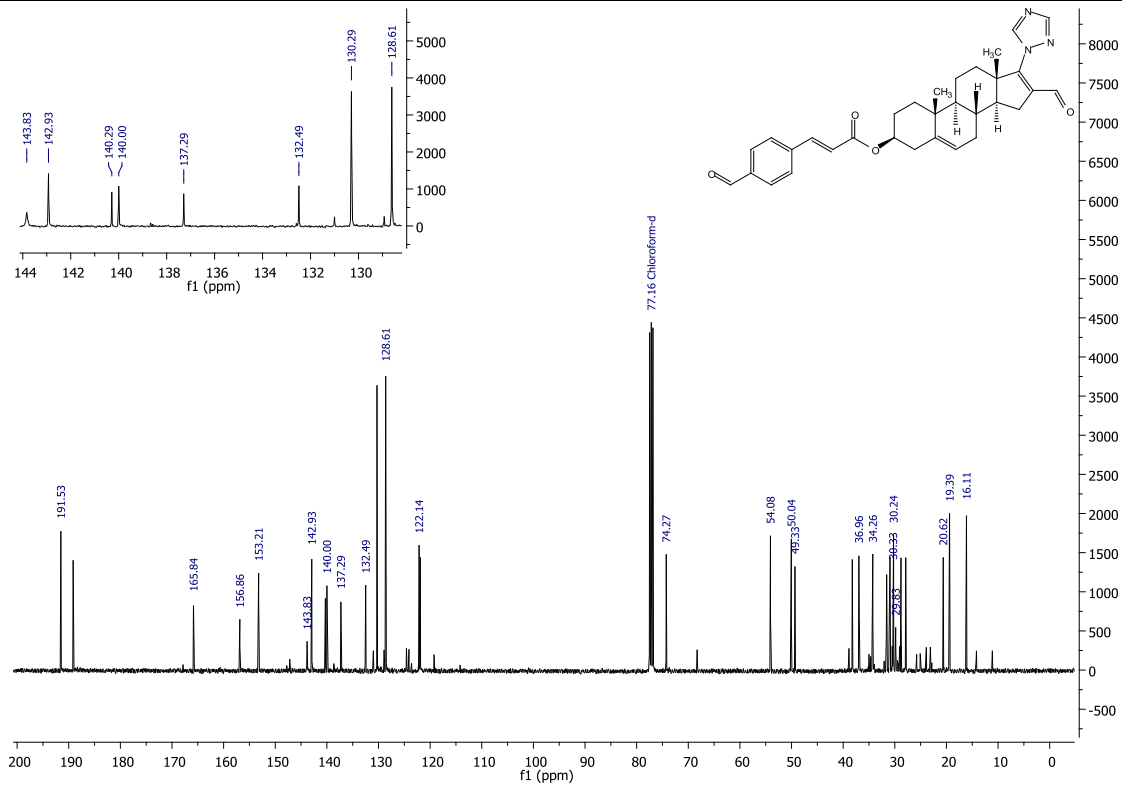
Espectro 40. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 6f.



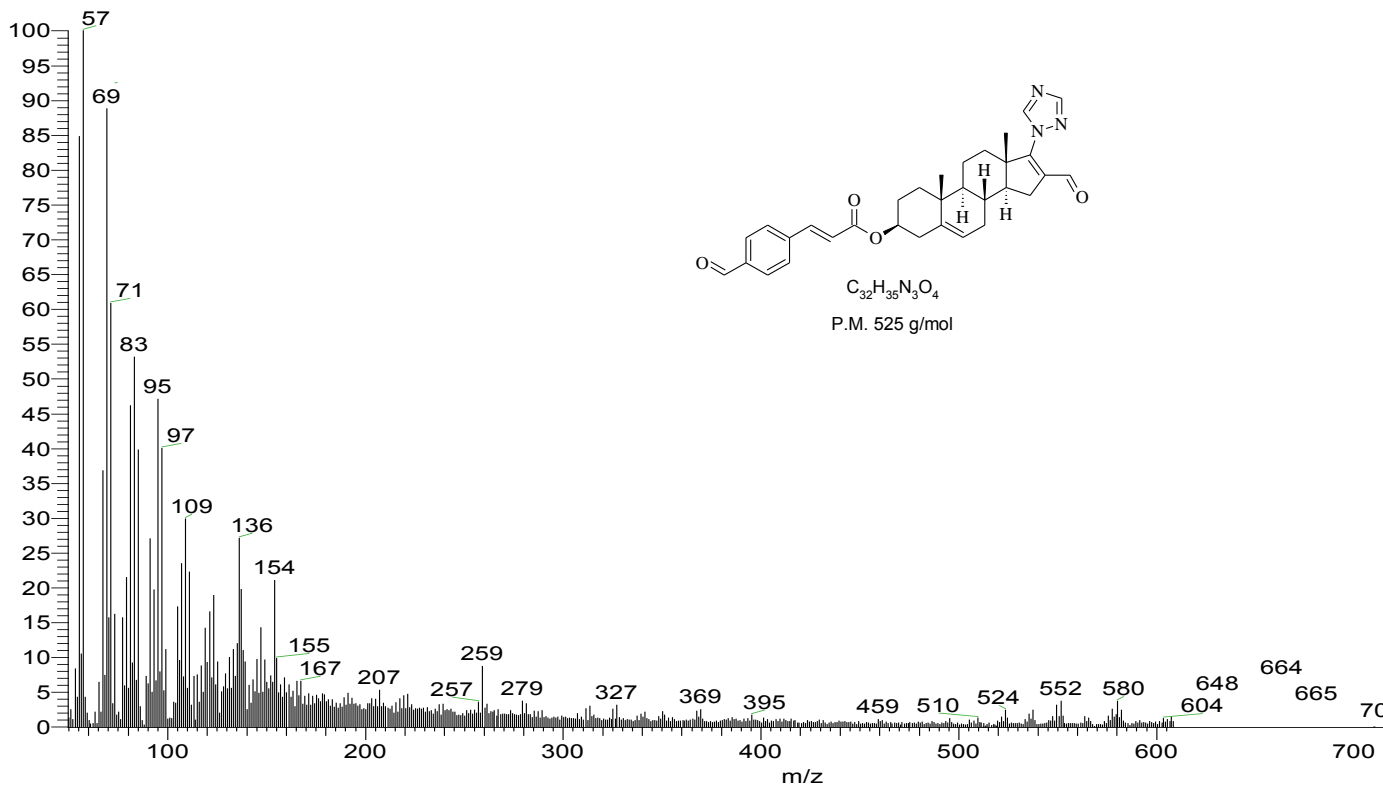
Espectro 41. IR (FTIR-ATR) del compuesto 6g.



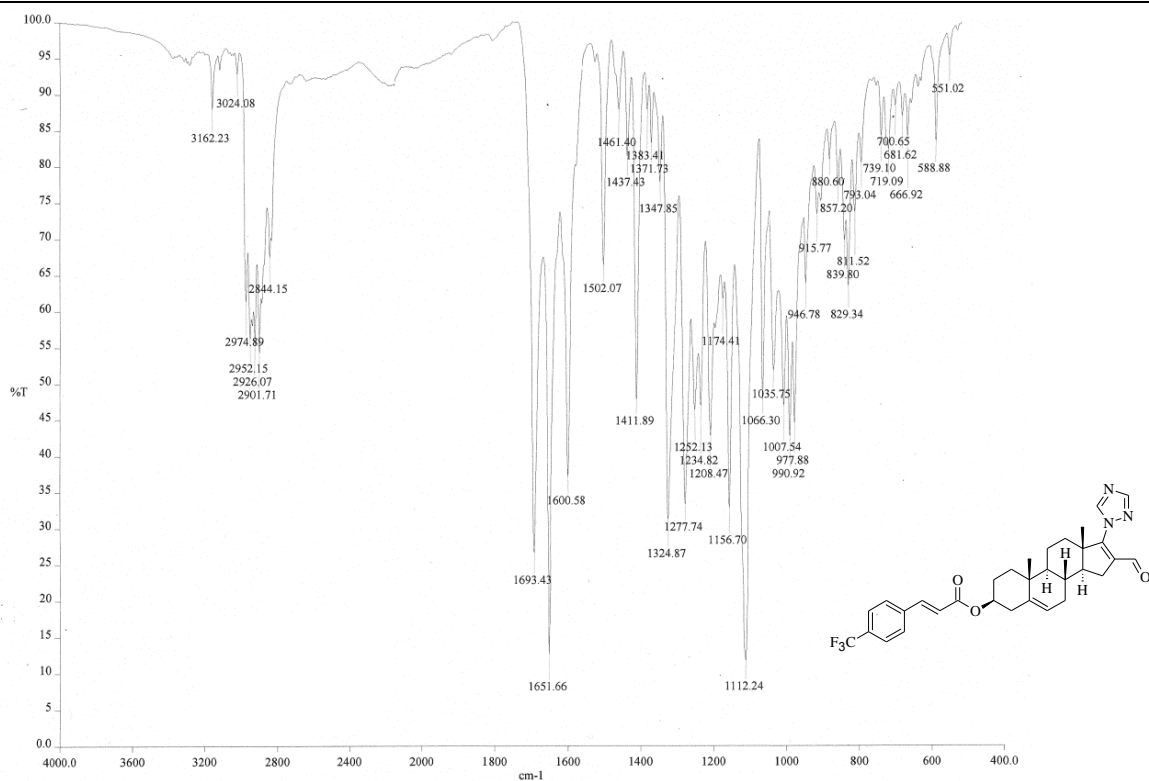
Espectro 42. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 6g.



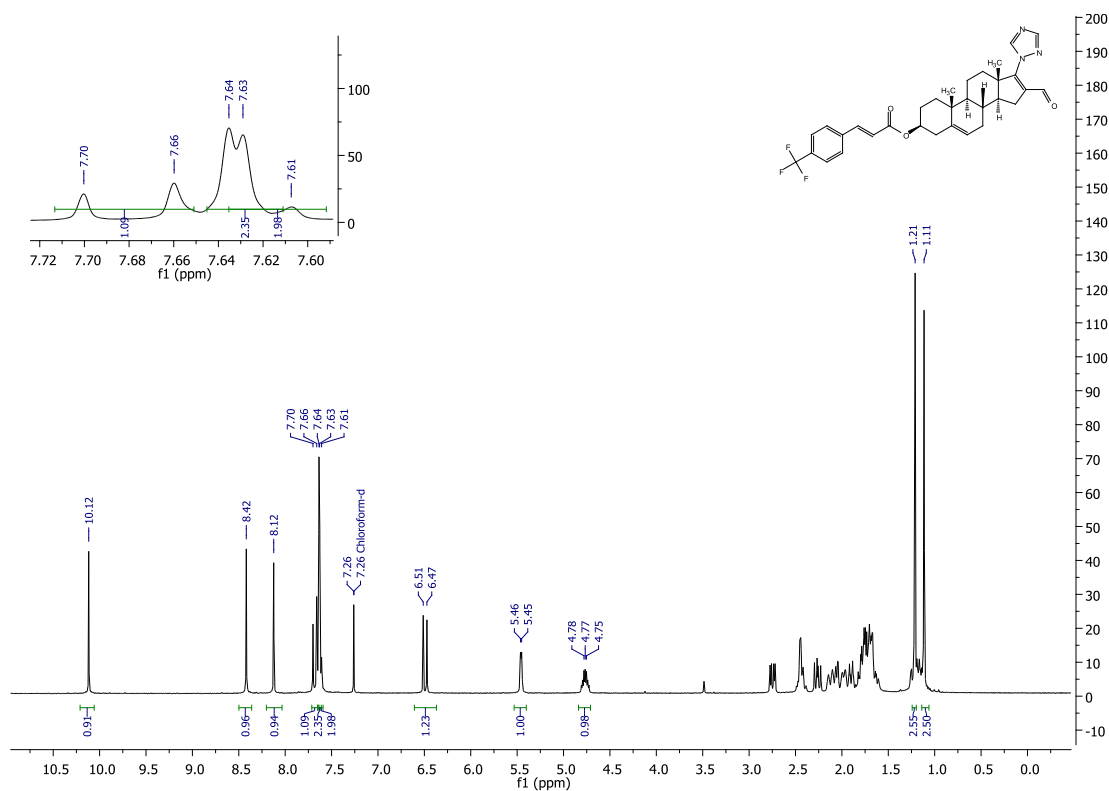
Espectro 43. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 6g.



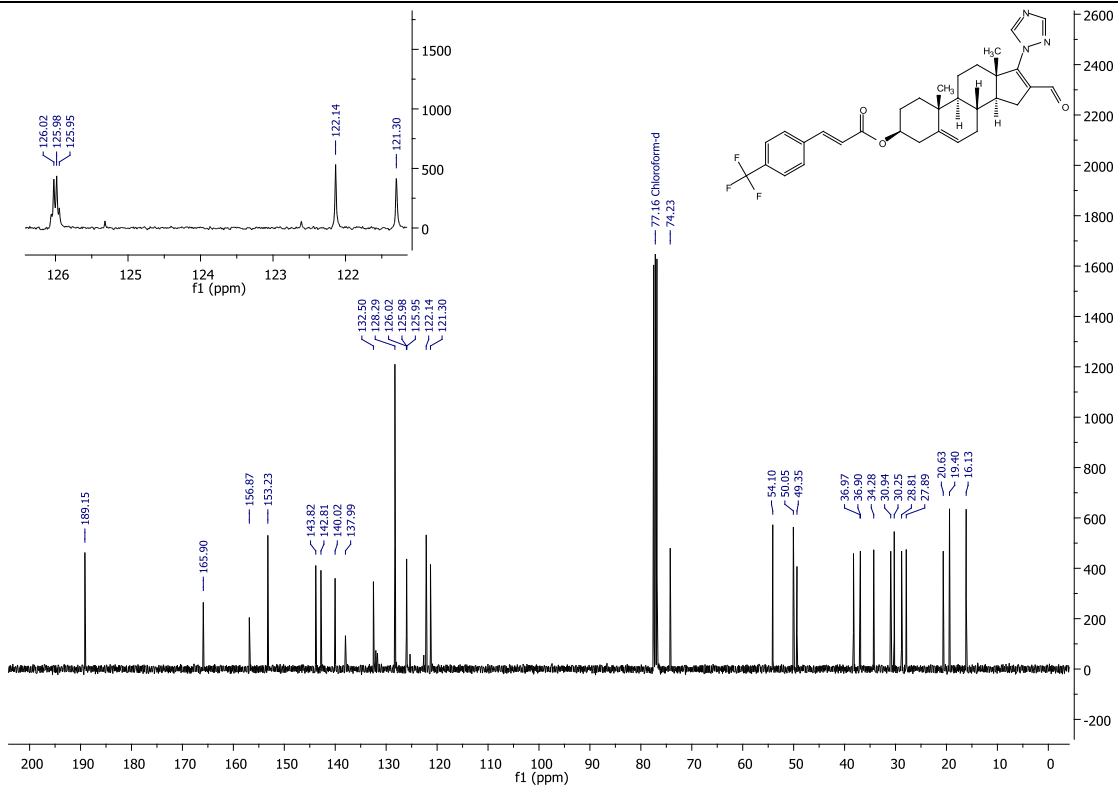
Espectro 44. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 6g.



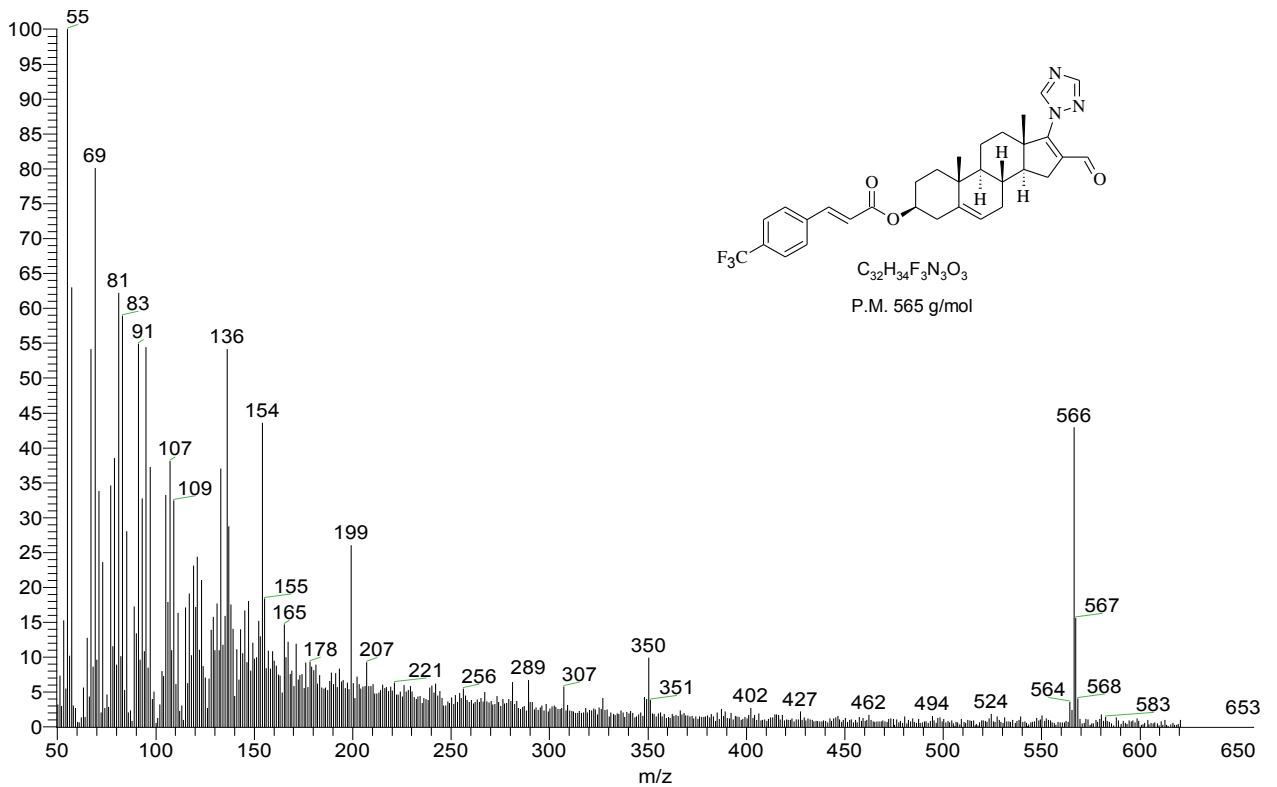
Espectro 45. IR (FTIR-ATR) del compuesto 6h.



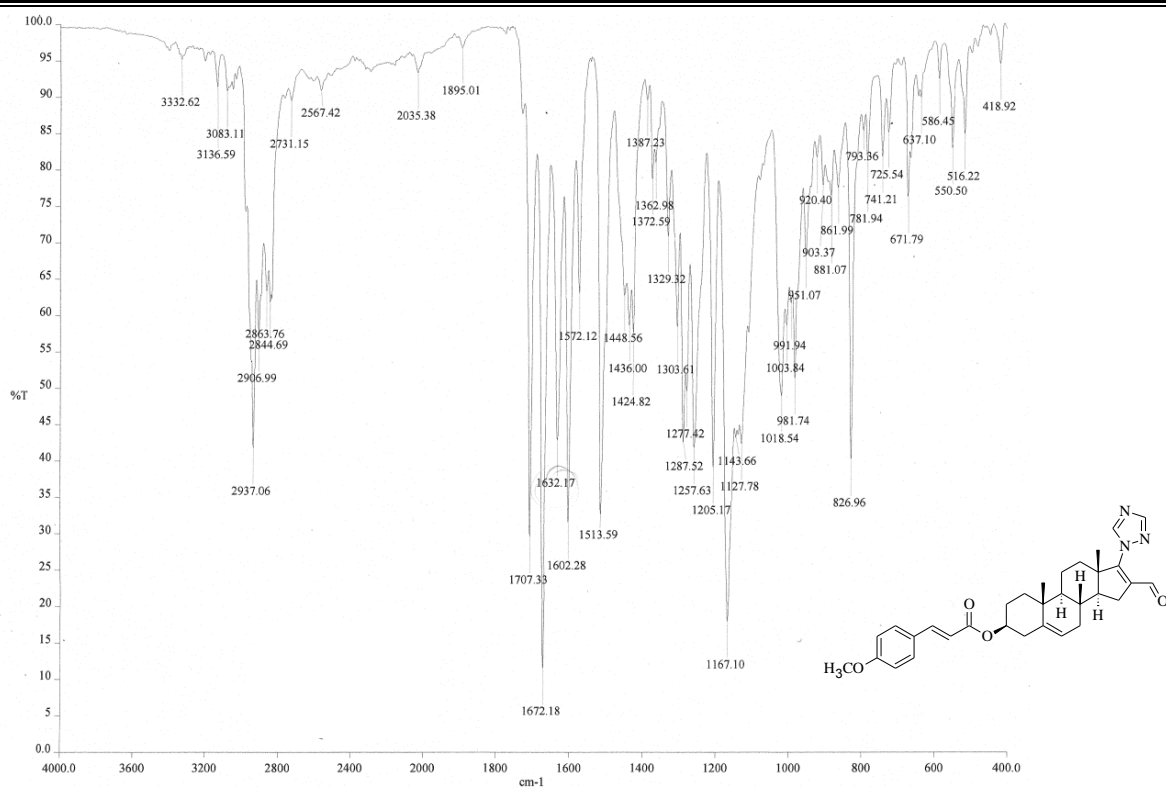
Espectro 46. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 6h.



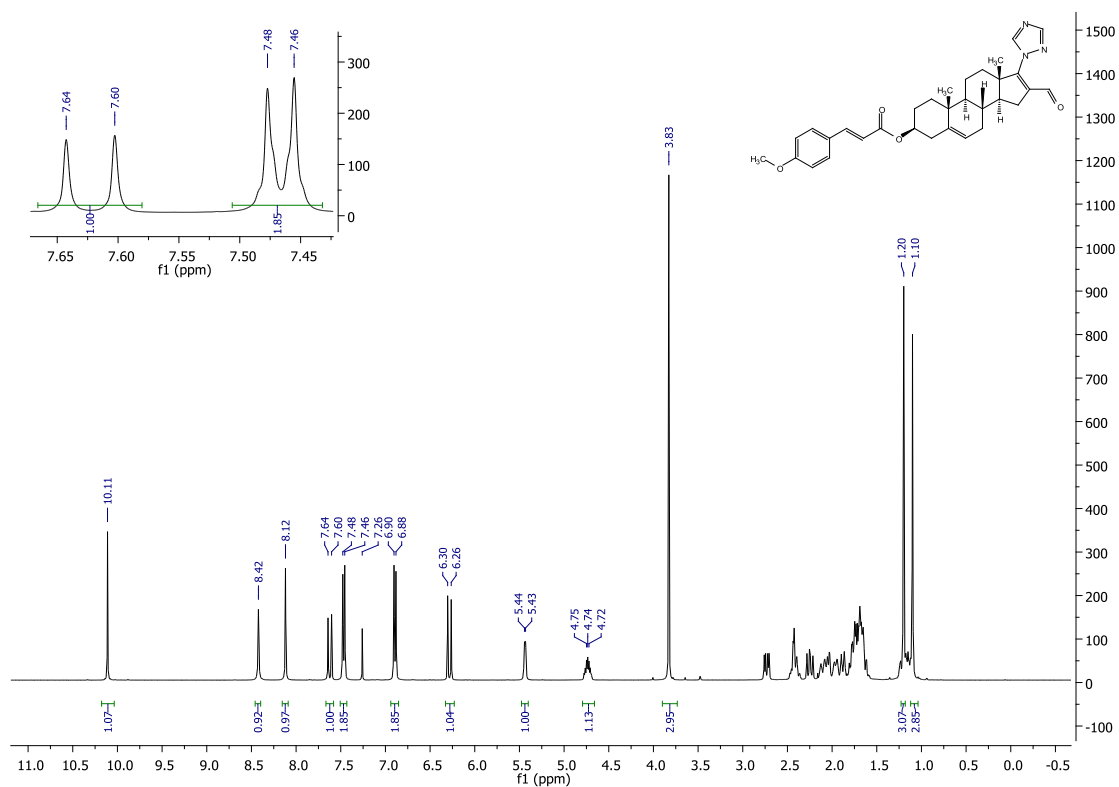
Espectro 47. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 6h.



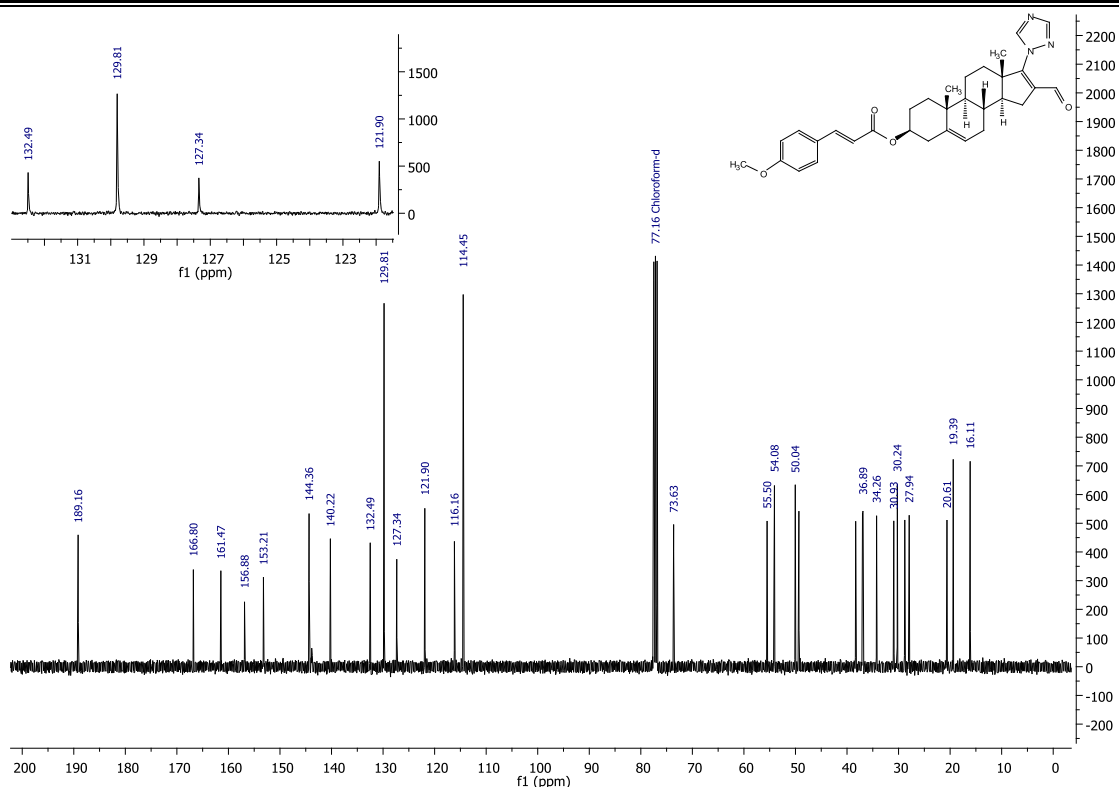
Espectro 48. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 6h.



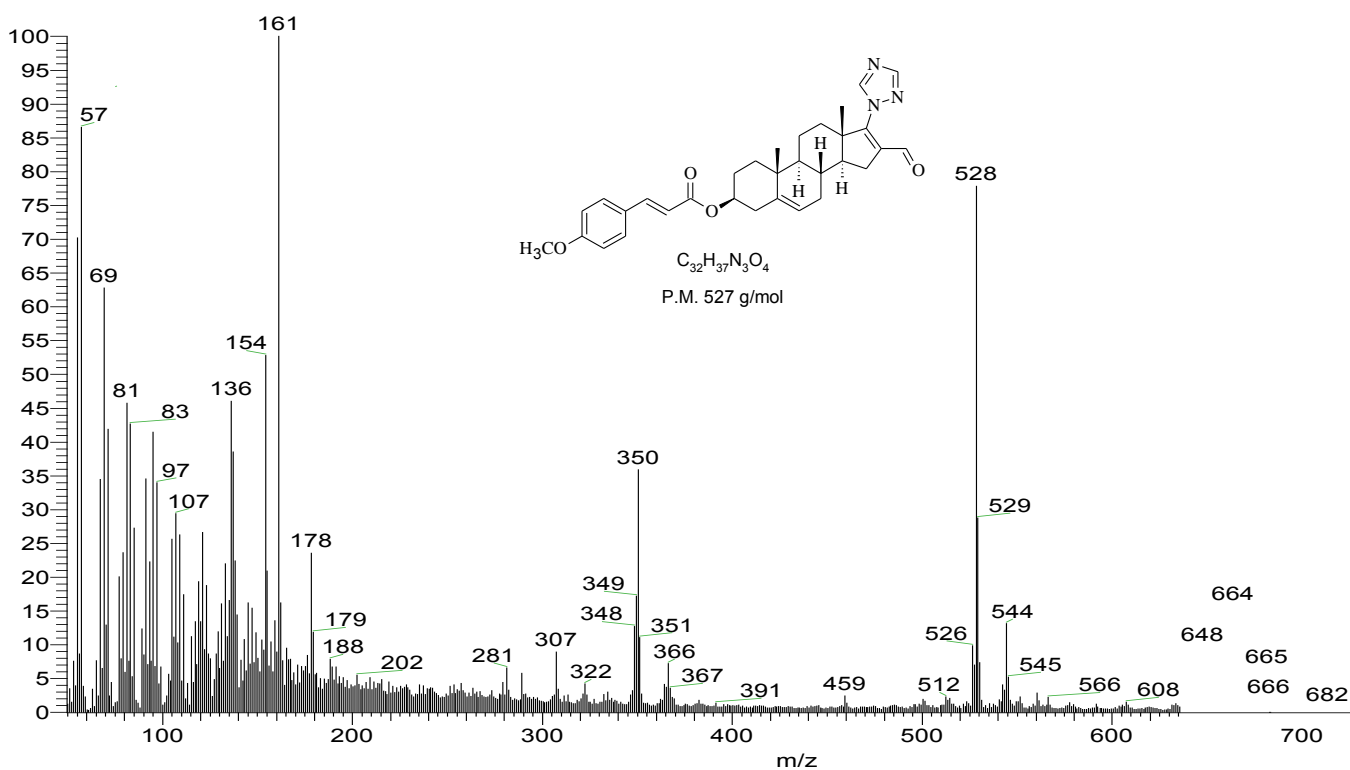
Espectro 49. IR (FTIR-ATR) del compuesto 6i.



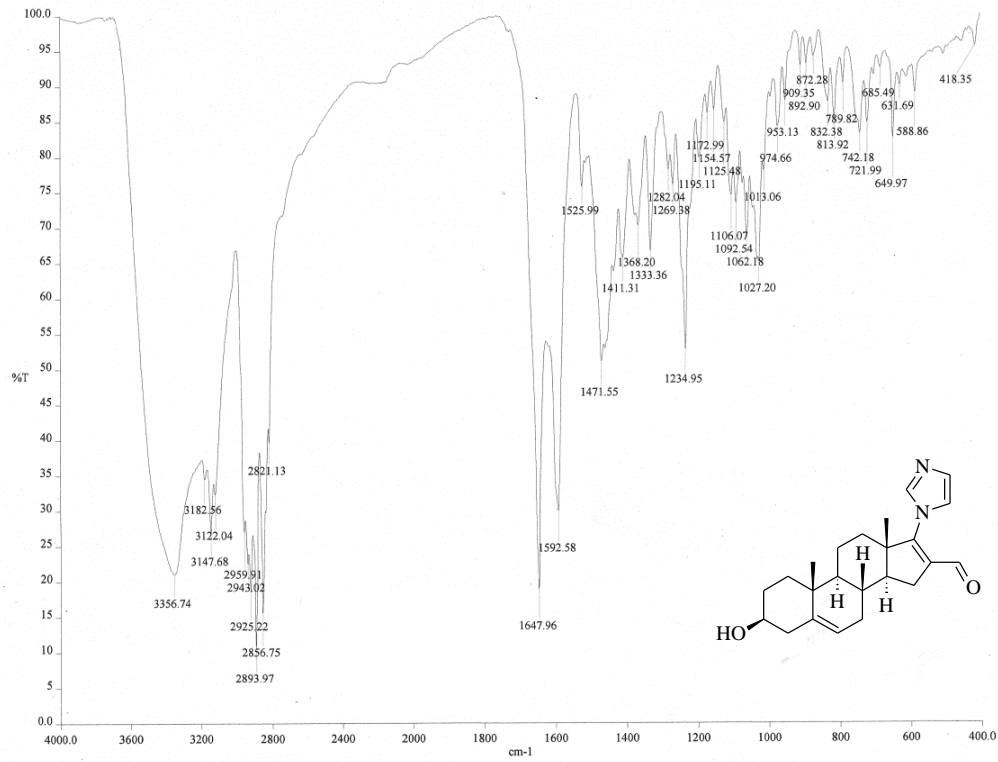
Espectro 50. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 6i.



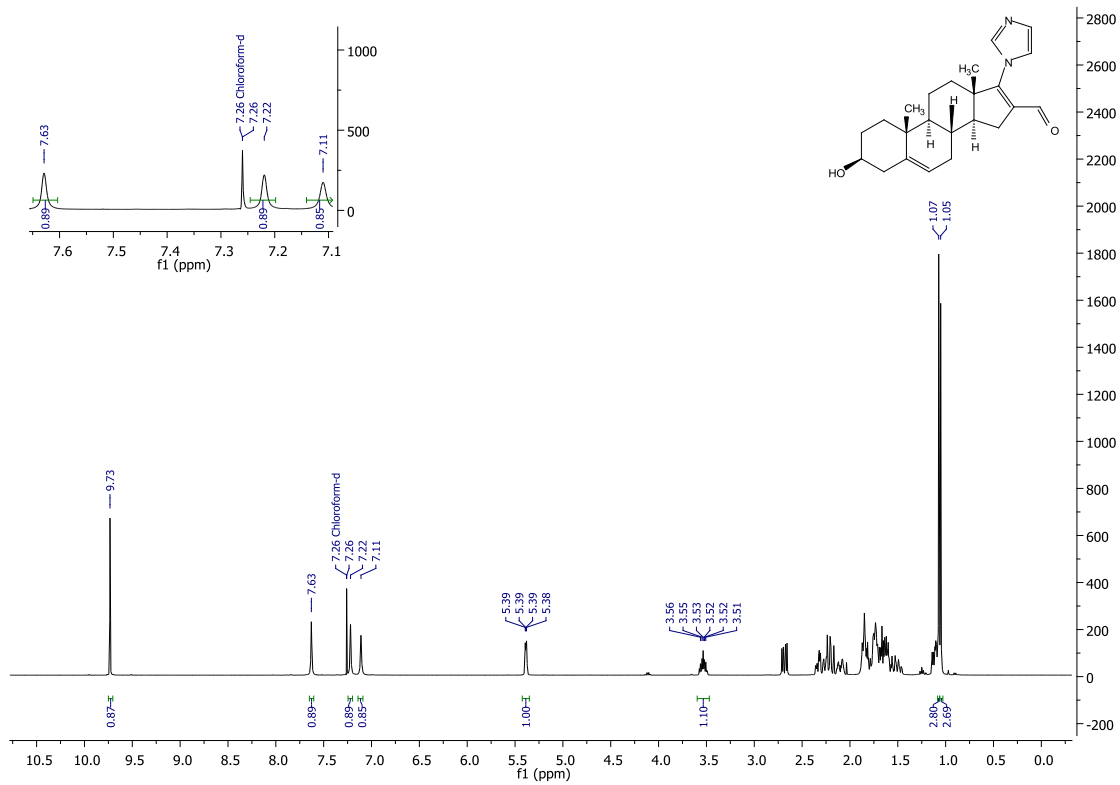
Espectro 51. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 6i.



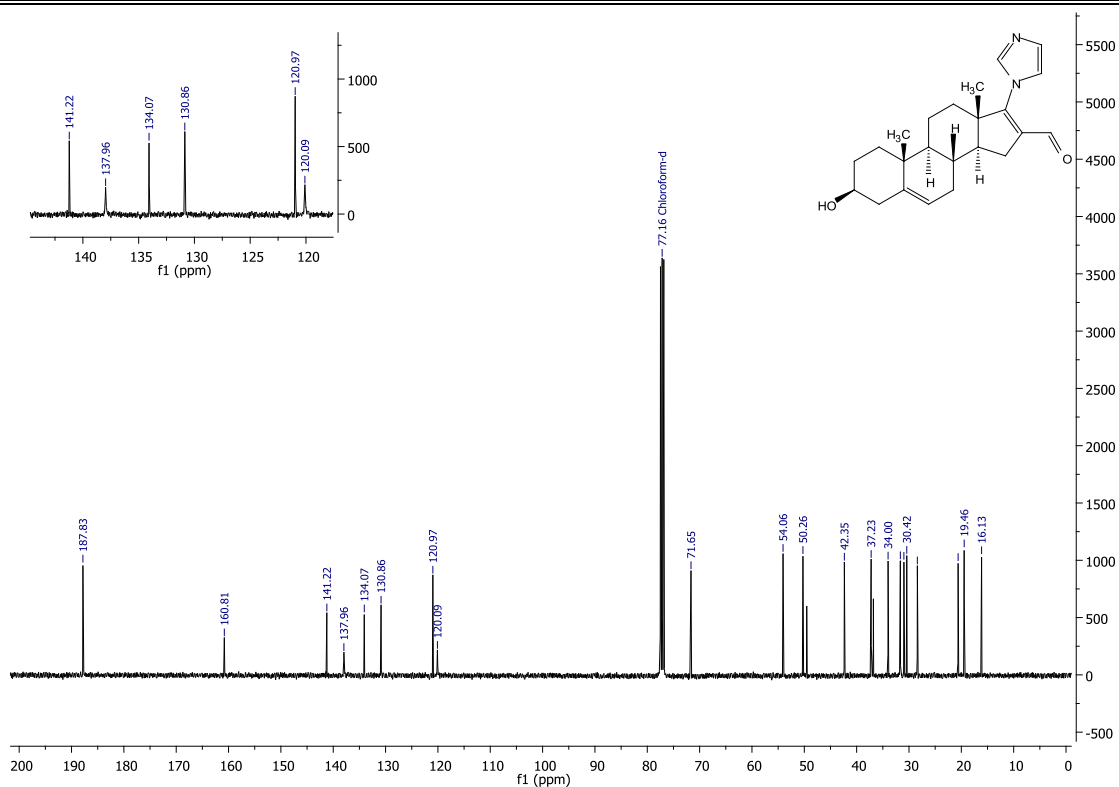
Espectro 52. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 6i.



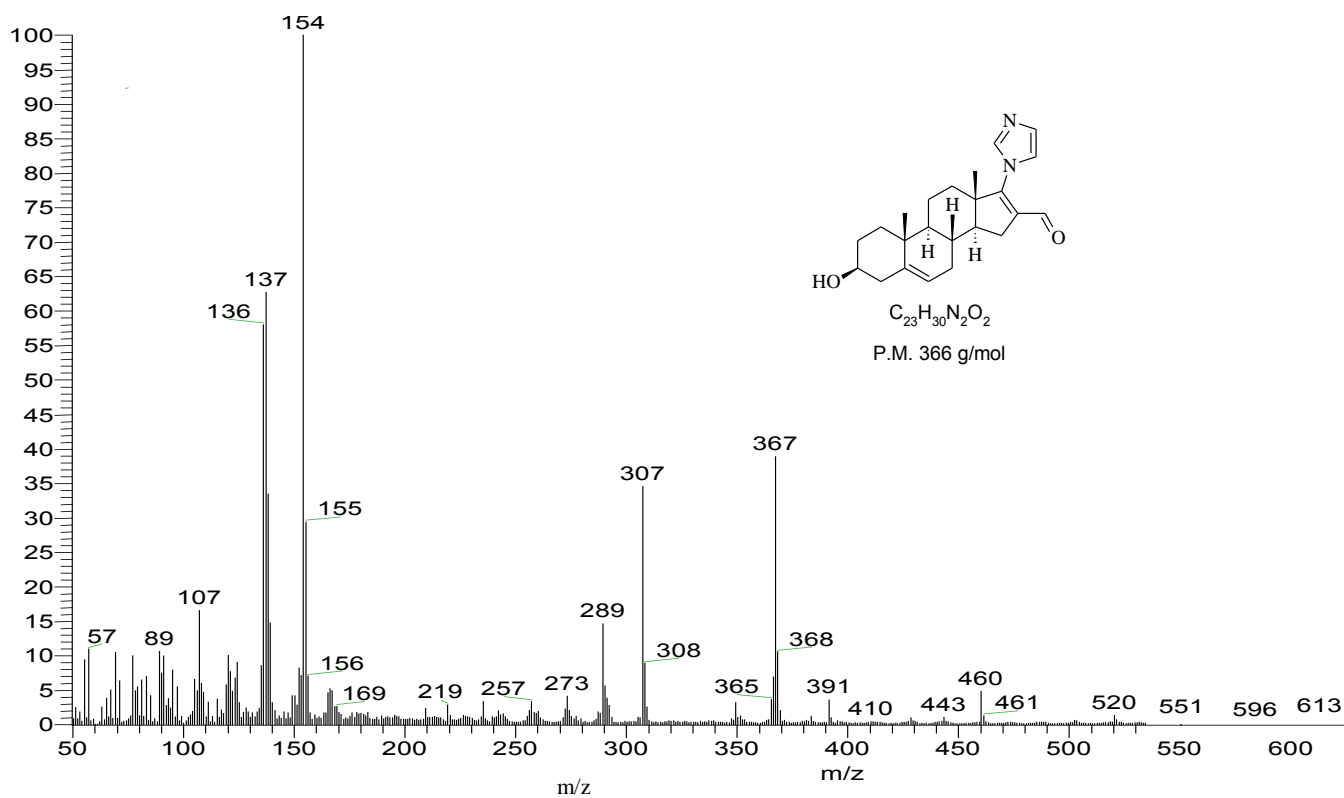
Espectro 53. IR (FTIR-ATR) del compuesto 7.



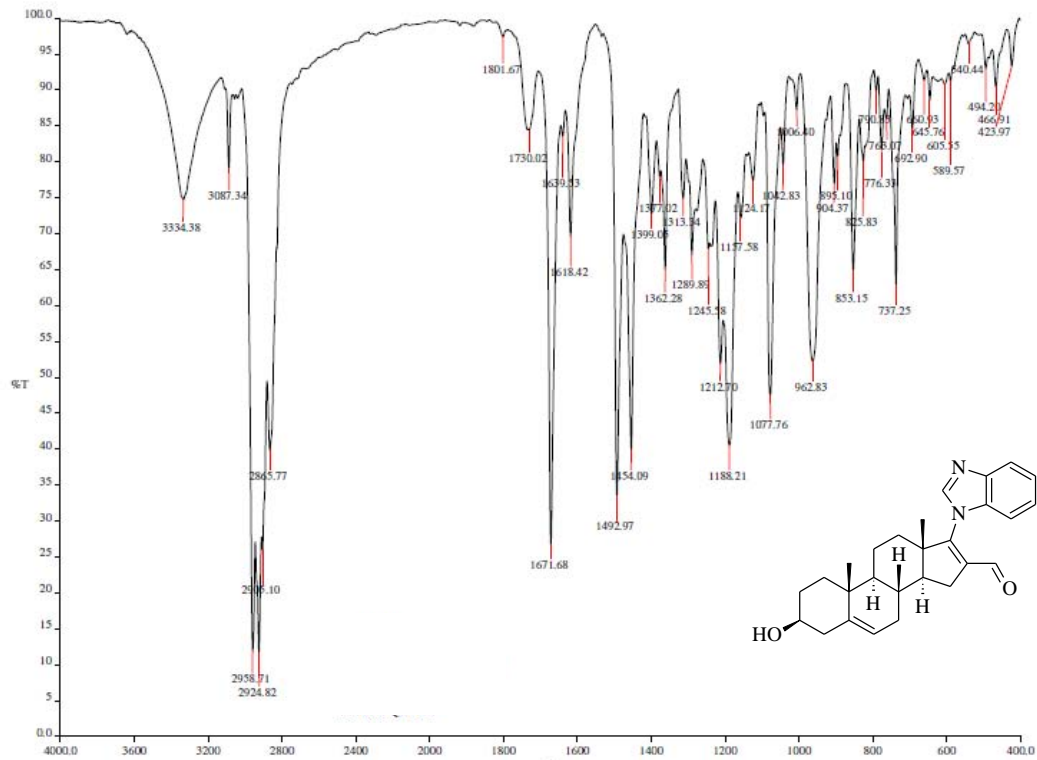
Espectro 54. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 7.



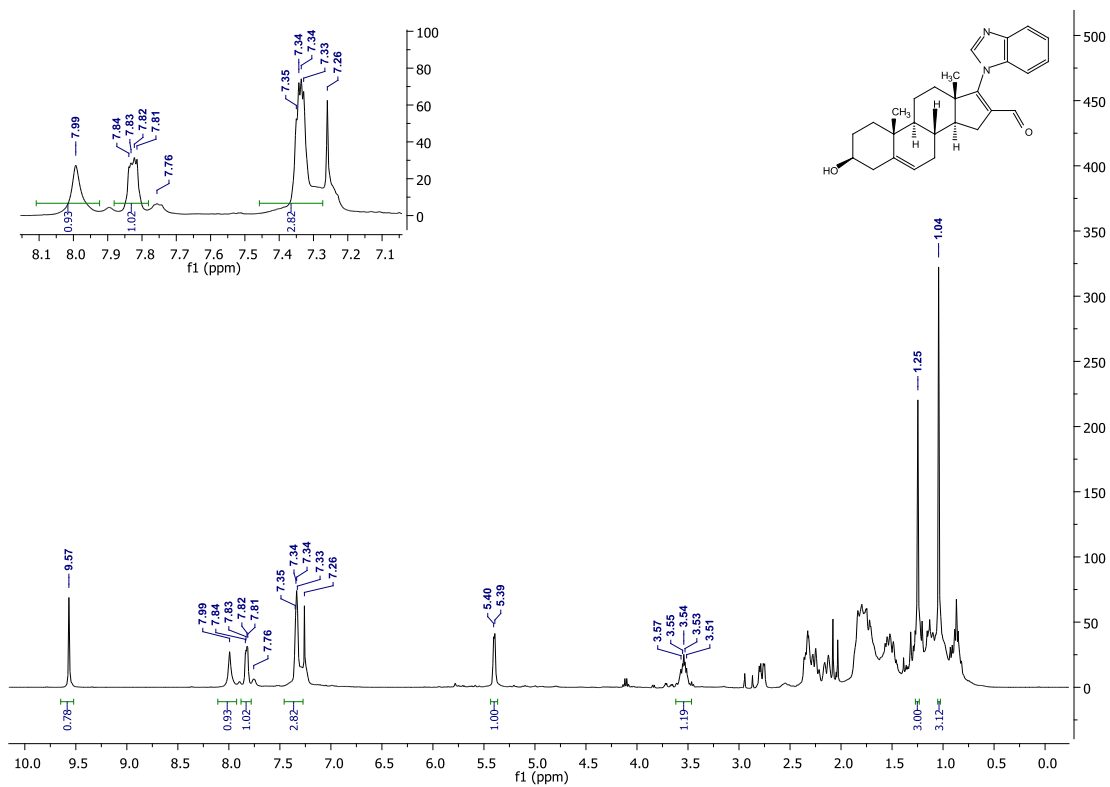
Espectro 55. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 7.



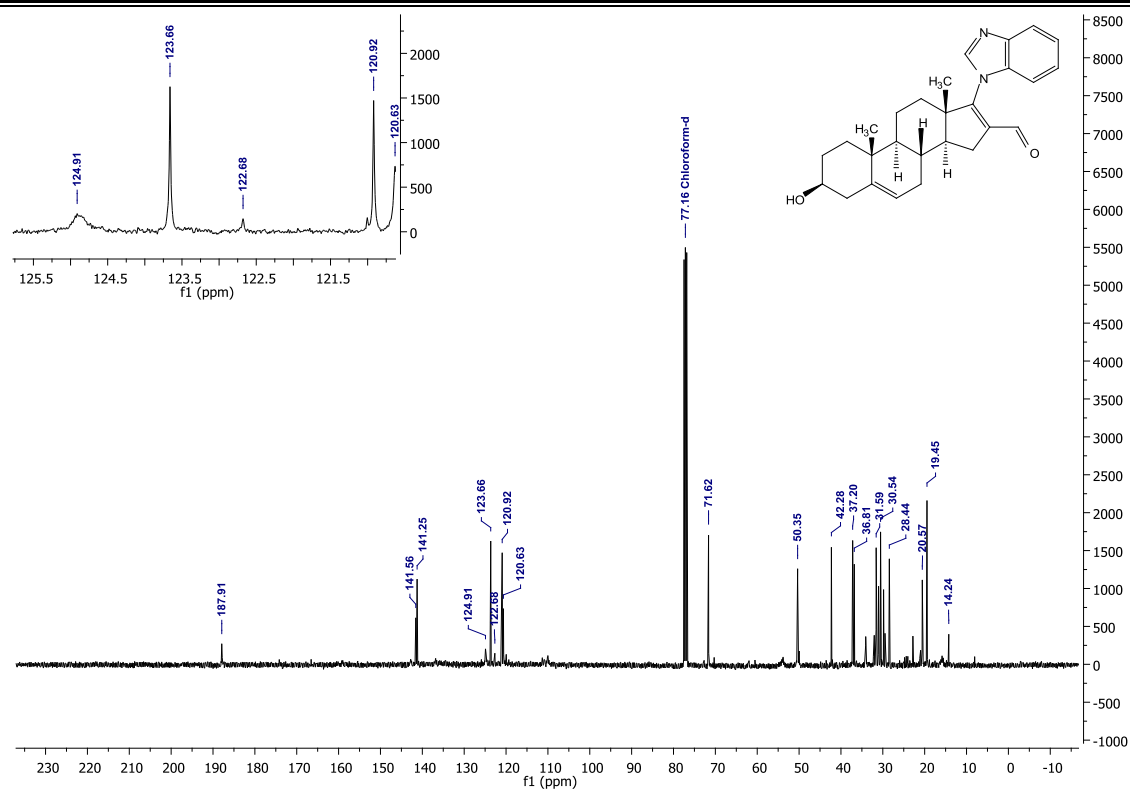
Espectro 56. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 7.



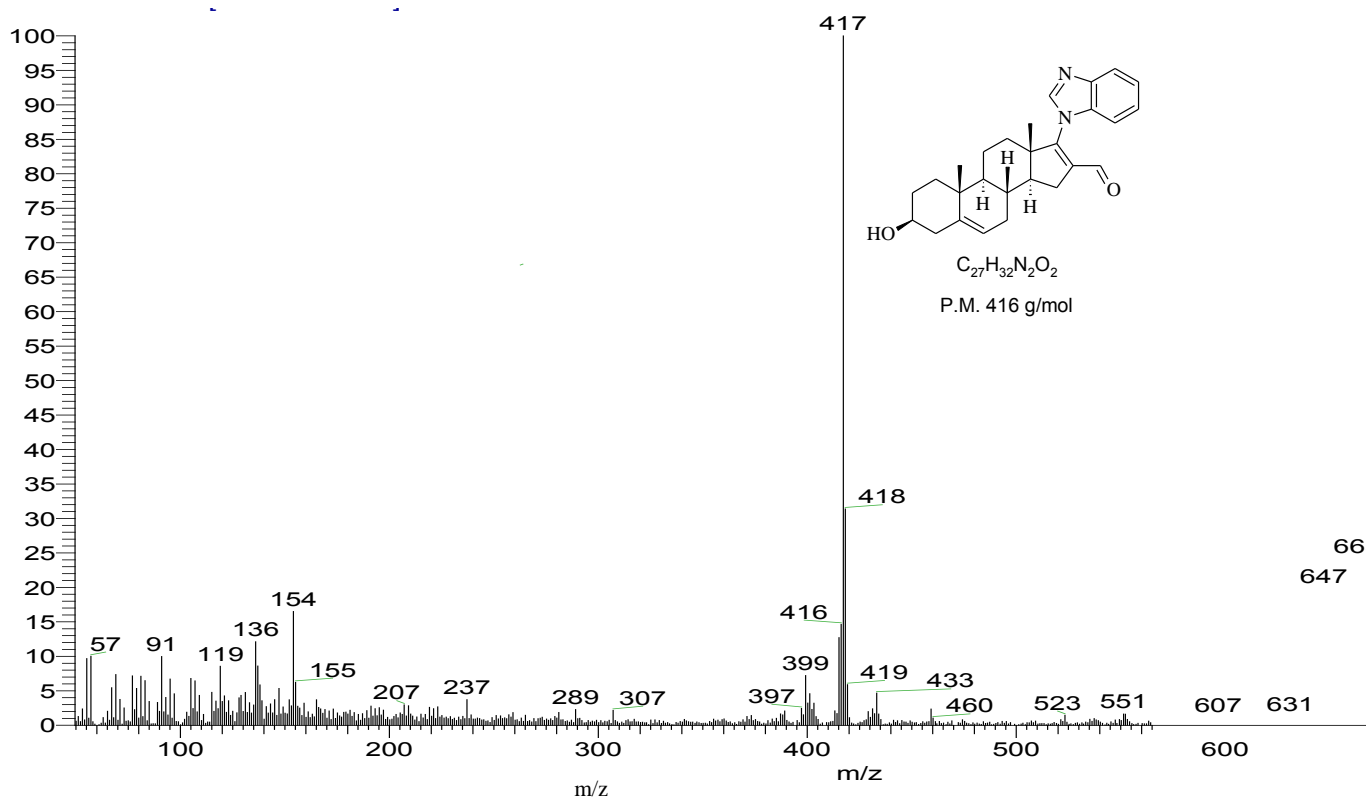
Espectro 57. IR (FTIR-ATR) del compuesto 8.



Espectro 58. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 8.



Espectro 59. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 8.



Espectro 60. Espectrometría de masas (FAB, ID) del compuesto 8