



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“SÍNTESIS, PROPIEDADES CITOTÓXICAS Y ACTIVIDAD
FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS ESTEROIDALES EN
DESÓRDENES HORMONALES”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. ALEJANDRA CHÁVEZ RIVEROS

TUTOR PRINCIPAL:

DR. EUGENE BRATOEFF, FACULTAD DE QUÍMICA UNAM †

COMITÉ TUTOR:

Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA, FACULTAD DE QUÍMICA UNAM
Dra. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS, FACULTAD DE QUÍMICA UNAM
Dr. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS, INSTITUTO DE QUÍMICA UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“SÍNTESIS, PROPIEDADES CITOTÓXICAS Y ACTIVIDAD
FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS ESTEROIDALES EN
DESÓRDENES HORMONALES”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A
M. en C. ALEJANDRA CHÁVEZ RIVEROS

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. EUGENE BRATOEFF, FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

COMITÉ TUTOR:
Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA, FACULTAD DE QUÍMICA-UNAM
Dra. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS, FACULTAD DE QUÍMICA-UNAM
Dr. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS, INSTITUTO DE QUÍMICA-UNAM



México, D.F. febrero 2016

Este trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio 125 del Departamento de Farmacia, en el conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría del Dr. Eugene Bratoeff con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, con número de proyecto 165049 y número de becario 240059).

Parte de este trabajo se presentó en:

- XLVIII Congreso nacional y VI Congreso internacional de ciencias farmacéuticas de la Asociación Farmacéutica Mexicana. “Síntesis de derivados esteroidales como inhibidores de la enzima 5-alfa reductasa”, Cancún, México **2015**.
Con la presentación de este trabajo se obtuvo el **Premio Nacional “Santiago Maza 2015”** otorgado por la Asociación Farmacéutica Mexicana a los mejores trabajos libres.
- Cuarto congreso de Alumnos de Posgrado. “Síntesis y efecto citotóxico en líneas celulares cancerosas y macrófagos de nuevos derivados de la progesterona con funciones éster y carbamato en C-3 y C-17”, UNAM, México **2014**.
- VII Congreso de Red latinoamericana de Ciencias Ambientales. “Síntesis de nuevos inhibidores de la enzima 5alfa-reductasa basados en el esqueleto del pregnano con un grupo éster en C-21 aplicando química verde”, San Carlos, Costa Rica **2013**.
- 2° Simposium Iberoamericano de Farmacia Social con el Escenario: Ecofarmacovigilancia (Farmacia Ambiental). “Síntesis y evaluación biológica de nuevos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa basados en el esqueleto del pregnano”, UAM Xochimilco, México **2013**.
- Tercer Congreso de alumnos de posgrado. “Síntesis de nuevos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa basados en el esqueleto del pregnano con un grupo éster en C-3”, UNAM, México, **2013**.

Como resultado del trabajo se publicaron los siguientes artículos:

1. **Chávez-Riveros A**, Bratoeff E, Heuze Y, Soriano J, Moreno I, Sánchez-Márquez A, Cabeza M. Synthesis and identification of pregnenolone derivatives as inhibitors of isozymes of 5 α -reductase. *Arch Pharm*, 348, **2015**, p. 1-9.
2. Calderon D, Bratoeff E, **Chávez Riveros A**, Osnaya N, Barragan G, Hernandez G, Juarez H, Garcia E. Effect of two antiandrogens as protectors of prostate and brain in Huntington's animal model, *Anticancer Agents Med Chem*, 14(9), **2014**, p. 1293-1301.
3. **Chávez-Riveros A**, Cabeza M, Bratoeff E, Soriano-García M. Crystal Structure and Synthesis of 3 β -(*p*-Iodobenzoyloxy)-16 α ,17 α -epoxypregn-4-en-6,20-dione. *Cryst Struct Theory Appl*, 3, **2014**, p. 39-47.
4. **Chávez-Riveros A**, Garrido M, Ramirez Apán MT, Zambrano A, Díaz Mario, Bratoeff E. Synthesis and cytotoxic effect on cancer cell lines and macrophages of novel progesterone derivatives having an ester or a carbamate function at C-3 and C-17. *Eur J Med Chem*, 82, **2014**, p. 498-505.

Para mi amado esposo Ulises

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de alcanzar mis sueños profesionales, por mi raza hablará el espíritu.

Al Programa de Maestría y Doctorado de Ciencias Químicas de la UNAM, en especial a la Mtra. Josefina Tenopala por su apoyo brindado durante mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero proporcionado para mis estudios de doctorado y la beca mixta para mi estancia de investigación (No. de becario 240059).

A la memoria de mi tutor principal, el Dr. Eugene Bratoeff, que fue un hombre admirable, que no dudó ni un momento en brindarme su apoyo y enseñanzas, lo cual resultó en el fortalecimiento de mi carácter.

Al Dr. Rafael Castillo, que en nombre de la amistad que tuvo con el Dr. Eugene Bratoeff, nos ofreció su apoyo desinteresado para concluir nuestros proyectos. Mil gracias.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Isabel Aguilar, el Dr. Guillermo Delgado y el Dr. Rafael Castillo por sus orientaciones y sugerencias enriquecedoras.

A la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI), por el soporte técnico ofrecido para la obtención de la espectroscopía y espectrometría reportada en este trabajo.

A la Dra. Marisa Cabeza y a su grupo de investigación, por su apoyo en la realización de las pruebas biológicas sobre la enzima 5 α -reductasa.

A la M. en C. Teresa Ramírez Apán, por su apoyo en la realización las pruebas de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas.

A cada uno de los miembros del jurado asignado por sus valiosas sugerencias.

A mi esposo Ulises por creer en mí y demostrarme su amor incondicional, por apoyarme en mis proyectos profesionales. Por compartir los momentos más emocionantes y los más tristes, ayudarme, aconsejarme y ver siempre el lado bueno de la vida. Esta tesis te la dedico a ti, porque viviste cada uno de sus momentos, como también el esfuerzo que dediqué para desarrollar este proyecto, además de que estoy orgullosa de tener a un hombre como tú a mi lado, te amo inmensamente.

A mis padres y mis hermanos por todo su apoyo y amor. En especial a mi mamá y mi hermana por sus consejos y por sentirse orgullosas de mí como yo lo estoy de ellas.

Un agradecimiento especial a mis amigos Yaz Arellano e Ivanhoe Jiménez por su amistad incondicional, sus útiles consejos académicos y de vida durante estos seis años.

A mi alumna Aby, por su amistad, apoyo, tenacidad y perseverancia en el desarrollo de nuestros trabajos en conjunto.

Al Dr. Mario Figueroa por su amistad, consejos y por las correcciones realizadas al principal artículo publicado de este trabajo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 125, a Tania Hernández, a la Dra. Elenita. A los Doctores Klaus y Ze'ev, mis amigos del laboratorio químico de Evestra Inc., en especial a Carlyne, Bindu y Hareesh por recibirme con tanta calidez y enseñarme muchas cosas nuevas e interesantes.

ÍNDICE

	ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	<i>vii</i>
	ÍNDICE DE FIGURAS	<i>x</i>
	ÍNDICE DE TABLAS	<i>xi</i>
	ÍNDICE DE ESQUEMAS	<i>xii</i>
	ABSTRACT	1
	RESUMEN	3
1	INTRODUCCIÓN	5
2	ANTECEDENTES	7
2.1	Hormonas	7
2.1.1	Hormonas esteroidales	8
2.1.2	Andrógenos	11
2.2	Padecimientos andrógeno-dependientes	12
2.2.1	Aspectos generales de la próstata	12
2.2.2	Cáncer de próstata	14
2.2.2.1	Pruebas para la detección del cáncer de próstata	15
2.2.2.2	Aspectos generales de las opciones de tratamiento contra cáncer de próstata	15
2.2.3	Hiperplasia prostática benigna	19
2.2.3.1	Aspectos generales de las opciones de tratamiento contra la HPB	20
2.2.4	Enzima 5 α -reductasa	22
2.2.5	Antiandrógenos esteroidales	24
3	HIPÓTESIS	27
4	OBJETIVOS	28
5	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
5.1	Discusión de resultados parte química	29
5.1.1	Síntesis de ésteres y carbamatos en C-3	29
5.1.1.1	Síntesis de la 3 β -acetoxi-5,6 α -epoxi-5 α -pregn-16-en-20-ona (2)	30
5.1.1.2	Síntesis de la 3 β -acetoxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-6,20-diona (3)	31

5.1.1.3	Síntesis de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4 y 6a)	32
5.1.1.4	Síntesis de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)	33
5.1.1.5	Síntesis de los derivados esterificados (6b-e y 7a-e)	34
5.1.1.6	Síntesis de los derivados carbamatos (8a-e)	37
5.1.2	Síntesis de ésteres en C-21	39
5.1.2.1	Síntesis de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (9)	41
5.1.2.2	Síntesis de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-en-20-ona (10)	42
5.1.2.3	Síntesis de la 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20-dimetoxi-3 β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-eno (11)	43
5.1.2.4	Esterificación en el alcohol de C-21 (13a-g)	44
5.1.2.3	Síntesis de los derivados 4,16-diénicos (14a-g)	45
5.1.2.5	Síntesis de los epóxidos 15a-d	46
5.1.2.6	Síntesis de los derivados 5 α -hidroxi-3,6-dicetónicos 16a-d	47
5.1.2.7	Síntesis de las dicetonas conjugadas 17a-d	47
5.1.2.8	Síntesis de las cetonas conjugadas 18c-g	48
5.2	Discusión de resultados parte biológica	52
6	DESARROLLO EXPERIMENTAL	61
6.1	Parte química	61
6.1.1	Condiciones generales	61
6.1.2	Síntesis de ésteres y carbamatos en C-3	62
6.1.2.1	Purificación de la 3 β -acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1)	62
6.1.2.2	Síntesis de la 3 β -acetoxi-5,6 α -epoxi-5 α -pregn-16-en-20-ona (2)	62
6.1.2.3	Síntesis de la 3 β -acetoxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-6,20-diona (3)	63
6.1.2.4	Síntesis de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4 y 6a)	64
6.1.2.5	Síntesis de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)	64
6.1.2.6	Metodología general para la síntesis de compuestos esteroidales con una función éster en C-3 (6b-e y 7a-e)	65
6.1.2.6.1	Caracterización de la 3 β -propioniloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6b)	66
6.1.2.6.2	Caracterización de la 3 β -butiriloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6c)	66
6.1.2.6.3	Caracterización de la 3 β -pentanoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6d)	66

6.1.2.6.4	Caracterización de la 3β -hexanoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6e)	67
6.1.2.6.5	Caracterización de la 3β -ciclopropilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7a)	67
6.1.2.6.6	Caracterización de la 3β -ciclobutilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7b)	67
6.1.2.6.7	Caracterización de la 3β -ciclopentilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7c)	68
6.1.2.6.8	Caracterización de la 3β -ciclohexilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7d)	68
6.1.2.6.9	Caracterización de la 3β -cicloheptilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7e)	68
6.1.2.7	Metodología general para la síntesis de compuestos esteroidales con una función carbamato en C-3 (8a-e)	69
6.1.2.7.1	Caracterización de la 3β -fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8a)	69
6.1.2.7.2	Caracterización de la 3β -(<i>p</i> -fluoro)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8b)	70
6.1.2.7.3	Caracterización de la 3β -(<i>p</i> -cloro)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8c)	70
6.1.2.7.4	Caracterización de la 3β -(<i>p</i> -bromo)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8d)	71
6.1.2.7.5	Caracterización de la 3β -(<i>p</i> -Iodo)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8e)	71
6.1.2.8	Síntesis de la $16\alpha,17\alpha$ -epoxi- 3β -hidroxipregn-5-en-20-ona (9)	72
6.1.2.9	Síntesis de la $16\alpha,17\alpha$ -epoxi- 3β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-en-20-ona (10)	72
6.1.2.10	Síntesis de la $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-21-hidroxi-20-dimetoxi- 3β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-eno (11)	73
6.1.2.10	Síntesis de la 21-acetoxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-20-dimetoxi- 3β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-eno (12a)	74
6.1.2.12	Metodología general para la síntesis de compuestos esteroidales con una función éster en C-21	75
6.1.2.12.1	Síntesis de la 21-acetoxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi- 3β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13a)	75

6.1.2.12.2	Caracterización de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-propionoxipregn-5-en-20-ona (13b)	76
6.1.2.12.3	Caracterización de la 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13c)	76
6.1.2.12.4	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -fluoro)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13d)	77
6.1.2.12.5	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -cloro)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13e)	77
6.1.2.12.6	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -bromo)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13f)	78
6.1.2.12.7	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -yodo)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13g)	78
6.1.2.13	Metodología general para sintetizar los derivados 4,16-diénicos 14a-g	79
6.1.2.13.1	Caracterización de la 21-acetoxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (14a)	79
6.1.2.13.2	Caracterización de la 3 β -hidroxi-21-propionoxipregna-5,16-dien-20-ona (14b)	80
6.1.2.13.3	Caracterización de la 21-benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (14c)	80
6.1.2.13.4	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -fluoro)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (14d)	81
6.1.2.13.5	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -cloro)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (14e)	81
6.1.2.13.6	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -bromo)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (14f)	82
6.1.2.13.7	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -yodo)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (14g)	82
6.1.2.14	Metodología general para la síntesis de epóxidos 15a-d	83
6.1.2.14.1	Caracterización de la 21-acetoxi-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-16-en-20-ona (15a)	83
6.1.2.14.2	Caracterización de la 5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-propionoxipregn-16-en-	84

	20-ona (15b)	
6.1.2.14.3	Caracterización de la 21-benzoiloxi-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-16-en-20-ona (15c)	84
6.1.2.14.4	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -fluoro)benzoiloxi-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-16-en-20-ona (15d)	85
6.1.2.15	Metodología general para la síntesis de derivados 5 α -hidroxi-3,6-dicetónicos 16a-d	85
6.1.2.15.1	Caracterización de la 21-acetoxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16a)	86
6.1.2.15.2	Caracterización de la 5-hidroxi-21-propionoxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16b)	86
6.1.2.15.3	Caracterización de la 21-benzoiloxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16c)	87
6.1.2.15.4	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -fluoro)benzoiloxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16d)	87
6.1.2.16	Metodología general para la síntesis de las dicetonas conjugadas 17a-d	88
6.1.2.16.1	Caracterización de la 21-acetoxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (17a)	88
6.1.2.16.2	Caracterización de la 21-propionoxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (17b)	89
6.1.2.16.3	Caracterización de la 21-benzoiloxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (17c)	89
6.1.2.16.4	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -fluoro)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (17d)	90
6.1.2.17	Metodología general para la síntesis de las cetonas conjugadas 18c-g	90
6.1.2.17.1	Caracterización de la 21-benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (18c)	91
6.1.2.17.2	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -fluoro)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (18d)	91
6.1.2.17.3	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -cloro)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (18e)	92
6.1.2.17.4	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -bromo)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (18f)	92
6.1.2.17.5	Caracterización de la 21-(<i>p</i> -yodo)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (18g)	93

6.2	Parte biológica	93
6.2.1	Ensayo <i>in vitro</i> , citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas	93
6.2.2	Pruebas de inhibición de la enzima 5 α -reductasa	94
6.2.2.1	Material biológico	94
6.2.2.1.1	Enzima 5 α -reductasa tipo 2	95
6.2.2.1.2	Enzima 5 α -reductasa tipo 1	95
6.2.2.1.3	Hámsters machos gonadectomizados	96
6.2.2.2	Sustancias y equipos	96
6.2.2.3	Determinación de la concentración inhibitoria 50% (CI ₅₀) de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 y 2 en glándulas prostáticas humanas	96
6.2.2.4	Ensayo <i>in vivo</i>	97
7	CONCLUSIONES	99
8	BIBLIOGRAFÍA	100
9	ANEXOS	107
	ARTÍCULOS PUBLICADOS	154

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Al(<i>i</i>-Pro)₃	Isopropóxido de aluminio
AMP	Adenosina monofosfato
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
CCF	Cromatografía en capa fina
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
CYP17	Cytochrome P450 17A1
d	Señal doble
DCC	<i>N,N</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DHT	Dihidrotestosterona
DIB	Diacetoxiyodobenceno
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRE	Tacto rectal
E₂	Reacción de eliminación nucleofílica bimolecular
Enz⁺	Sitio electrofílico de la enzima
EM-FAB	Espectrometría de masas en modalidad positiva
F	Finasterida
FAB	Bombardeo con átomos rápidos
HPB	Hiperplasia prostática benigna
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento

<i>K_i</i>	Constante de inhibición enzimática
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis
<i>m</i>	Señal múltiple
[M+H]⁺	Quasi ión molecular
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
m-CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzoico
<i>m/z</i>	Relación masa carga
NA	No activo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCI	National Cancer Institute
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PC-3	Línea celular de cáncer de próstata
P.F.	Punto de fusión
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
PSA	Antígeno prostático específico
Py	Piridina
%R	Porcentaje de rendimiento
r.f.	Relación de frentes o factor de retención
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
s	Señal simple
SKLU-1	Línea celular de cáncer de pulmón
SNC	Sistema nervioso central
T	Testosterona
t	Señal triple
TBDMS	Cloruro de <i>tert</i> -butildimetilsililo
T[³H]	Testosterona tritiada
TMS	Tetrametilsilano

UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1	Porcentaje de morbilidad hospitalaria de los principales tumores malignos en la población de 20 años y más según sexo 2012	6
Figura 2.1	Modelo de acción de las hormonas esteroidales	8
Figura 2.2	Biosíntesis de hormonas esteroidales	9
Figura 2.3	Esquema del sistema reproductor masculino	13
Figura 2.4	Abiraterona	17
Figura 2.5	Representación de la HPB	19
Figura 2.6	Estructura de los bloqueadores $\alpha 1$	21
Figura 2.7	Transformación de la testosterona en DHT por acción de la enzima 5α -reductasa	22
Figura 2.8	Mecanismo de reducción de la testosterona a 5α -dihidrotestosterona por acción de la enzima 5α -reductasa	23
Figura 2.9	Esqueleto derivado de la 16-deshidropregnenolona con un carbonilo α,β -insaturado en C-6	25
Figura 2.10	Compuesto pregna-4,6-dien-4,6,20-triona	25
Figura 5.1	Representación de las interacciones electrostáticas del flúor en un potente inhibidor de la trombina, determinadas por análisis de rayos X	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Estructura y función de las hormonas esteroidales	10
Tabla 2.2	Ejemplos de antiandrógenos comerciales	18
Tabla 2.3	Comparación de las isoformas 1 y 2 de la enzima 5 α -reductasa	23
Tabla 2.4	CI ₅₀ de pruebas de inhibición de la enzima 5 α -reductasa del compuesto pregna-4,6-dien-4,6,20-triona	26
Tabla 2.5	Pruebas <i>in vivo</i> del compuesto pregna-4,6-dien-4,6,20-triona	26
Tabla 5.1	Punto de fusión, rendimiento global, bandas en los espectros de UV e IR y valor de [M+H] ⁺ de los compuestos 6a-e	35
Tabla 5.2	Desplazamientos químicos en el espectro de RMN de carbono y de protón para los compuestos 6a-e	36
Tabla 5.3	Punto de fusión, rendimiento global, bandas en los espectros de UV e IR y valor de [M+H] ⁺ de los compuestos 7a-e	36
Tabla 5.4	Desplazamientos químicos en el espectro de RMN de carbono y de protón para los compuestos 7a-7e	37
Tabla 5.5	Punto de fusión, rendimiento global, bandas en los espectros de UV e IR y valor de [M+H] ⁺ de los compuestos 8a-e	38
Tabla 5.6	Desplazamientos químicos en el espectro de RMN de carbono y de protón para los compuestos 8a-e	39
Tabla 5.7	Punto de fusión, rendimiento global, bandas en los espectros de UV e IR y valor de [M+H] ⁺ de los compuestos 17a-d	48
Tabla 5.8	Desplazamientos químicos en el espectro de RMN de carbono y de protón para los compuestos 17a-d	48
Tabla 5.9	Punto de fusión, rendimiento global, bandas en los espectros de UV e IR y valor de [M+H] ⁺ de los Compuestos 18c-g	51
Tabla 5.10	Desplazamientos químicos en el espectro de RMN de carbono y de protón para los compuestos 18c-g	51
Tabla 5.11	Valores de Log P de los compuestos finales	52
Tabla 5.12.	Pruebas primarias en líneas celulares de cáncer	54
Tabla 5.13	Concentraciones inhibitorias según la sustitución para Inhibidores de la trombina	56
Tabla 5.14	Pruebas de inhibición de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 y 2	58
Tabla 5.15	Pruebas <i>in vivo</i> de los compuestos 14d, 15d y 17d	60

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 5.1	Procedimiento sintético para la obtención de ésteres en C-3 con carbonilos conjugados en C-6 y C-20	30
Esquema 5.2	Mecanismo de reacción para la formación del epóxido 2	31
Esquema 5.3	Mecanismo de reacción para la formación del cetol 3	32
Esquema 5.4	Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 4	33
Esquema 5.5	Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 5	33
Esquema 5.6	Mecanismo de reacción para la formación de ésteres en C-3	34
Esquema 5.7	Mecanismo de reacción para la formación de carbamatos en C-3	38
Esquema 5.8	Procedimiento sintético para la obtención de ésteres en C-21 con carbonilos conjugados en C-3, C-6 y C-20	40
Esquema 5.9	Mecanismo de reacción para la formación del epóxido 9	42
Esquema 5.10	Mecanismo de reacción para la protección del alcohol de C-3	43
Esquema 5.11	Mecanismo de reacción para la formación del intermediario 11	44
Esquema 5.12	Mecanismo de reacción para la formación de los compuestos 13a-g	45
Esquema 5.13	Mecanismo de reducción de epóxido con Cr (II)	46
Esquema 5.14	Mecanismo de la reacción de Oppenauer	50

ABSTRACT

Prostate cancer and benign prostatic hyperplasia (BPH) are two conditions with an increased incidence affecting the male elderly population (over 60 years). Both conditions are androgen-dependent, the development and pathology are dependent on androgen levels in the body, mainly dihydrotestosterone (DHT), the most potent androgen.

In recent years many treatments have been developed to decrease the elevated androgen concentration in human body. Inhibitors of 5α -reductase enzyme are of particular importance in this aspect since this enzyme is responsible for the reduction of testosterone to dihydrotestosterone. From the pharmacological point of view this approach is attractive not only because it inhibits the androgenic actions caused by DHT, but also it preserves the physiological functions of testosterone thereby reducing side effects.

Previous studies in our group have shown that 5α -reductase enzyme has affinity towards α,β -unsaturated carbonyl group and this functional group was identified as the pharmacophore. The compound *pregna-4,6-diene-4,6,20-trione* had a potency 10 times greater than the commercial drug finasteride in inhibiting 5α reductase enzyme in *in vitro* studies. However this potency did not equalize in to *in vivo* studies due to poor bioavailability. The compounds synthesized for this thesis were based on the skeleton of this compound and aromatic and aliphatic esters were introduced at C-21 to ensure the bioavailability of the molecules.

On the other hand, it has been reported that esters at C-3 position of the steroidal skeleton showed cytotoxic properties in different cancer cell lines, for this the synthesis of compounds having this function at C-3 and C-21 were planned for comparison between them and among those already reported. The esters that were synthesized are derivatives of aliphatic and alicyclic acids as well as aromatic acids. Aromatic carbamates at C-3 were also synthesized to test its cytotoxic activity.

In vitro assays were performed in which the IC₅₀ was determined by measuring the inhibitory concentration of 50% of the activity of the 5 α -reductase enzyme present in extracts of rat liver (isoform type 1) and human cadaver prostate (isoform type 2) using 35 compounds synthesized for this purpose. The most active compounds were chosen for further *in vivo* testing in Syrian Golden hamsters for changes in the diameter of the pigmented spot (pigmented spot is androgen dependent), weight of the prostate and the seminal vesicles were measured. The percent inhibition of **24** final compounds in cancer cell lines of breast (MCF-7), prostate (PC-3) and lung (SKLU-1) was also determined.

RESUMEN

Actualmente el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna son dos padecimientos con una incidencia creciente que afectan a la población masculina de edad avanzada (mayores a 60 años). Ambos padecimientos son andrógeno-dependientes, es decir, que su desarrollo y patología es dependiente de las concentraciones de andrógenos en el organismo, principalmente de la dihidrotestosterona, que es el andrógeno más potente.

Es por ello que se han creado diversos tratamientos para disminuir las concentraciones de esta hormona en el organismo, siendo de vital interés los inhibidores de la enzima 5α -reductasa, debido a que esta enzima es la encargada de la reducción de testosterona a dihidrotestosterona. Desde el punto de vista farmacológico este tratamiento resulta muy atractivo ya que únicamente se detienen las acciones androgénicas causadas por la dihidrotestosterona sin afectar las funciones fisiológicas de la testosterona, en consecuencia los efectos secundarios son menores.

Este proyecto se basó en trabajos realizados anteriormente en nuestro grupo de investigación, en los cuales se ha demostrado que la enzima 5α -reductasa tiene afinidad hacia los carbonilos α,β -insaturados siendo esta función el farmacóforo. Especialmente el compuesto preña-4,6-dien-4,6,20-triona tuvo una potencia 10 veces mayor que la finasterida (fármaco del mercado) en pruebas de inhibición *in vitro* de esta enzima pero en pruebas *in vivo* no mostró buenos resultados. Los compuestos sintetizados para esta tesis se basaron en el esqueleto de este compuesto y se adicionaron ésteres aromáticos y alifáticos en posición C-21 para garantizar la biodisponibilidad de las moléculas.

Por otro lado se ha publicado que los ésteres en posición C-3 del esqueleto esteroidal muestran propiedades citotóxicas en diferentes líneas celulares de cáncer por lo cual se planeó la síntesis de compuestos que tuvieran esta función tanto en posición C-3 como en C-21 para compararlos entre ellos y entre los ya reportados. Los ésteres sintetizados fueron derivados de ácidos alifáticos y alicíclicos así como aromáticos. También se sintetizaron carbamatos aromáticos en C-3 para estudiar su actividad.

Se realizaron ensayos *in vitro* en los cuales se determinó la CI_{50} midiendo la concentración inhibitoria del 50% de la actividad de la enzima 5α -reductasa presente en extractos de hígado de rata (isoforma tipo 1) y de próstata de cadáver humano (isoforma tipo 2), usando 35 compuestos sintetizados para este fin. De estos derivados se escogieron los mejores tres compuestos para realizar pruebas *in vivo* en hámster de la sepa Sirian Golden en los cuales se midió el diámetro de la mancha pigmentada la cual es dependiente de andrógenos, el peso de la próstata y de las vesículas seminales. Se determinó también el porcentaje de inhibición de **24** compuestos finales en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), próstata (PC-3) y pulmón (SKLU-1).

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que ha acompañado al hombre desde épocas remotas, debido a que se trata de una alteración celular que provoca un aumento descontrolado de células anormales; su crecimiento invasivo y propagación a través de los tejidos perturba el funcionamiento normal del organismo. Este padecimiento puede afectar tanto a niños como a adultos y no hace distinción de razas, nivel socioeconómico o sexo. Debido a su alta incidencia y a que sus consecuencias impactan no solo al paciente sino también a la familia y la comunidad, que demandan atención especializada, desde 1990 se considera un problema de salud pública en nuestro país.¹⁻²

Conforme la población envejece, la incidencia del cáncer aumenta, debido al efecto acumulado de la exposición a factores de riesgo y estilos de vida poco saludables, además de que los mecanismos de reparación celular pierden eficacia con la edad (OMS, 2014), lo que predispone el desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Cuando las células no se pueden reparar eficazmente, entran en un estado conocido como senescencia, envejecimiento natural o bien presentan apoptosis o muerte celular; una alteración en estos procesos puede generar una carcinogénesis, que es un fallo que provoca que una célula que sufre mutaciones inicie la generación de más células anormales que tienen la característica de ser invasivas.²

Según datos del INEGI (febrero 2011) los tumores malignos son los causantes de aproximadamente 13% de las defunciones mundiales, 7.9 millones de muertes por año, de las cuales más del 72% se registran en países de ingresos bajos y medios. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasará de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones.²

En 2012, las principales neoplasias entre la población mexicana masculina de 20 años y más, se ubican en órganos digestivos (25.4%), en órganos genitales (11.5%) y en

órganos hematopoyéticos (9.9%); mientras que en las mujeres de este mismo grupo de edad, en mama (30.8%); órganos genitales (16.5%) y órganos digestivos (13.8 por ciento).²

La principal causa de morbilidad hospitalaria por cáncer entre la población masculina de 20 a 39 años, se ubica en el de órganos hematopoyéticos, 22.6 de cada 100 hombres de 20 a 29 años y 17.1 de cada 100 de 30 a 39 años egresaron por esa causa; en los varones de 40 a 49 años son los tumores en el tejido linfático y afines (16.1%); en los de 50 a 59 años es el cáncer en los órganos digestivos (23.3 de cada 100); mientras que en la población de 60 años y más son neoplasias en órganos genitales masculinos, 13 de cada 100 hombres de 60 a 64 años, 34, de 65 a 74 años; 15.5%, de 75 a 79 años y 17.5 de cada 100 varones de 80 años y más lo padecen.²

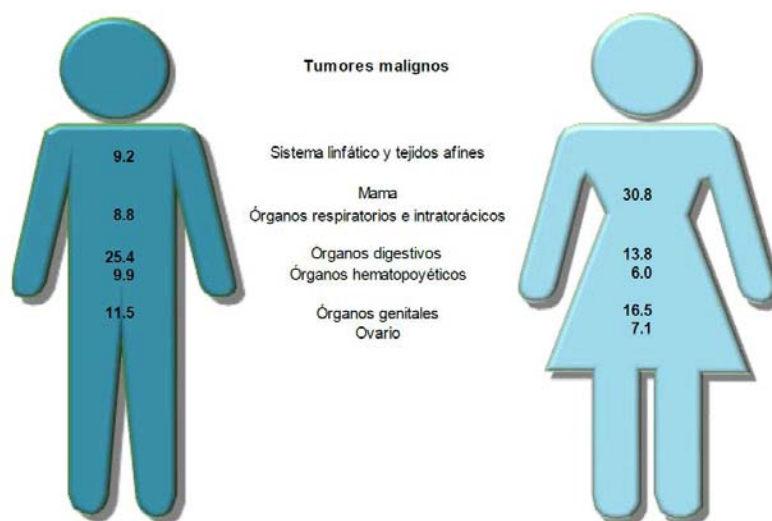


Figura I.1 Porcentaje de morbilidad hospitalaria de los principales tumores malignos en la población de 20 años y más según su sexo 2012²

Por esta razón, numerosos grupos de investigación han dedicado sus esfuerzos para atacar este mal. En nuestro grupo de trabajo nos hemos enfocado en sintetizar compuestos antiandrogénicos para contrarrestar el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna, que como se mencionó, son algunos de los principales padecimientos en la población masculina en el mundo. Así también todos los compuestos sintetizados son analizados en pruebas primarias de citotoxicidad en líneas celulares de cancer de mama (MCF-7), próstata (PC-3) y pulmón (SKLU-1) que son las afecciones de mayor incidencia entre la población.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hormonas

Las hormonas son sustancias producidas por las glándulas en los organismos multicelulares y son transportadas por el sistema circulatorio a los órganos diana distantes para regular su fisiología y comportamiento. Las hormonas tienen diferentes estructuras químicas incluyendo eicosanoides, esteroides, derivados de aminoácidos, péptidos y proteínas. Las glándulas que secretan las hormonas comprenden el sistema de señalización endocrino. El término hormona es algunas veces extendido para incluir compuestos químicos producidos por las células que afectan a la misma célula (señalización autocrina) o células vecinas (señalización paracrina).³⁻⁴

Las hormonas se usan para comunicarse entre órganos y tejidos para regular actividades psicológicas y de comportamiento, como la digestión, el metabolismo, la respiración, funciones de tejidos, percepción sensorial, sueño, excreción, estrés, crecimiento, desarrollo, movimiento, reproducción y estado de ánimo.⁵⁻⁶

Las hormonas tienen la característica de actuar sobre las células, que deben disponer de una serie de receptores específicos. Hay dos tipos de receptores celulares.⁶⁻⁸

Receptores de membrana: los usan las hormonas peptídicas. Las hormonas peptídicas (primer mensajero) se fijan a un receptor proteico que hay en la membrana de la célula, y estimulan la actividad de otra proteína (unidad catalítica), que hace pasar el ATP (intracelular) a AMP (segundo mensajero), que junto con el calcio intracelular, activa la enzima proteína quinasa (responsable de producir la fosforilación de las proteínas de la célula, que produce una acción biológica determinada). Esta es la teoría o hipótesis de segundo mensajero o de Sutherland.

Receptores intracelulares: los usan las hormonas esteroidales. La hormona atraviesa la membrana de la célula diana por difusión. Una vez dentro del citoplasma se asocia con su receptor intracelular, con el cual viaja al núcleo atravesando juntos la membrana nuclear. En el núcleo se fija al ADN y hace que se sintetice ARNm, que induce a la síntesis de nuevas proteínas, que se traducirán en una respuesta fisiológica, o bien, puede ubicarse en

el lugar de la maquinaria biosintética de una determinada proteína para evitar su síntesis (Figura 2.1).

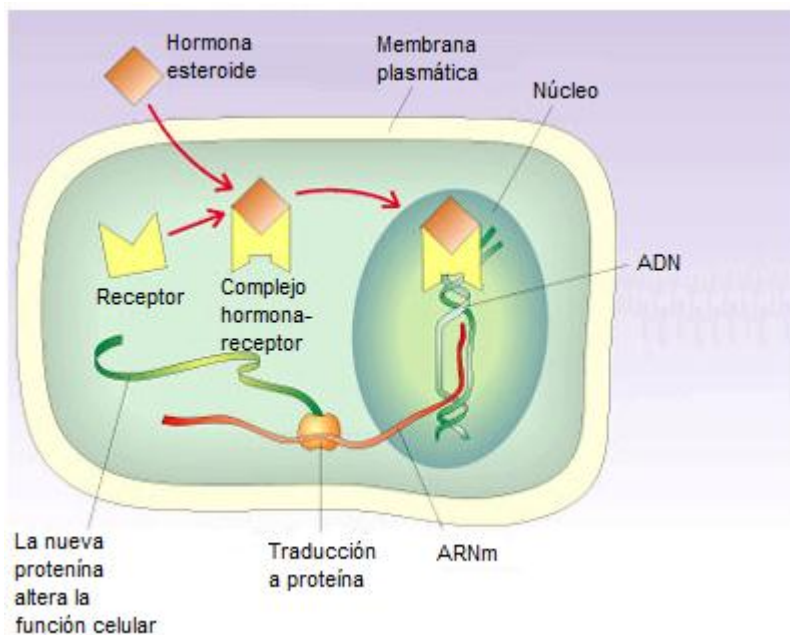


Figura 2.1 Modelo de acción de las hormonas esteroidales

2.1.1 Hormonas esteroidales

Las hormonas esteroidales regulan múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre los que destacan la homeostasis hidroelectrolítica, las respuestas al estrés y la función reproductiva, además de regular distintas conductas. Las hormonas esteroides se sintetizan a partir del colesterol en células específicas del ovario, del testículo, la corteza suprarrenal, la placenta y el sistema nervioso central mediante la acción de enzimas específicas (Figura 2.2). Dichas hormonas se clasifican en andrógenos, progestinas, estrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides. En la Tabla 2.1 se muestra un ejemplo de cada hormona, su lugar de síntesis y su función principal.⁹

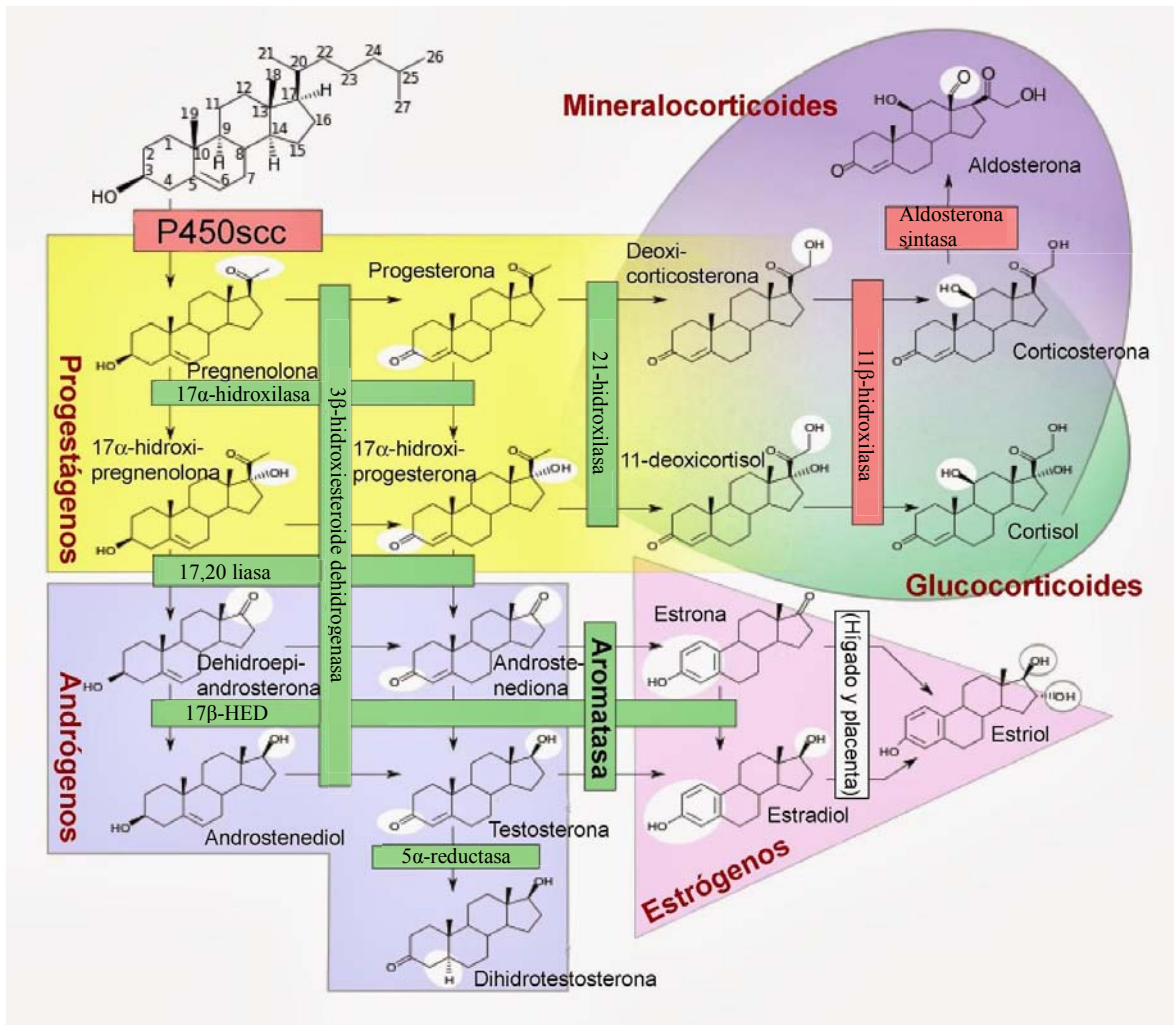
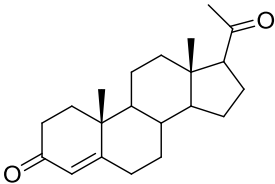
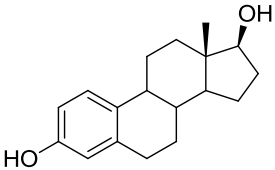
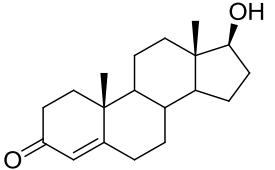
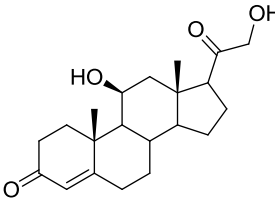
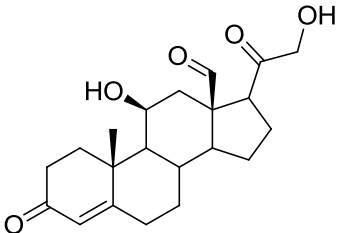


Figura 2.2 Biosíntesis de hormonas esteroidales

Tabla 2.1 Estructura y función de las hormonas esteroidales.⁹

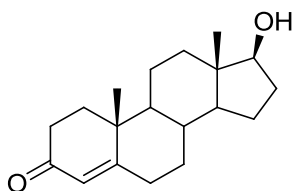
HORMONA	LUGAR DE SÍNTESIS	FUNCIÓN
<p>Progesterinas: Progesterona.</p> 	Ovario, placenta, SNC	Preparación del endometrio para la implantación del óvulo fertilizado, mantenimiento del embarazo, desarrollo de la glándula mamaria, regulación de diversas actividades en el SNC.
<p>Estrógenos: Estradiol y estrona.</p> 	Ovario, placenta, SNC	Diferenciación sexual del cerebro, conducta sexual femenina, maduración ósea.
<p>Andrógenos: Testosterona y dihidrotestosterona.</p> 	Testículo	Conducta sexual y fenotipo masculino, espermatogénesis.
<p>Glucocorticoides: Cortisol, cortisona y corticosterona.</p> 	Corteza adrenal	Regulación de las respuestas al estrés, modulación del metabolismo de glucosa y la gluconeogénesis.
<p>Mineralocorticoides: Aldosterona y 11-desoxicorticosterona.</p> 	Corteza adrenal	Metabolismo hidroelectrolítico, retención de sodio y excreción de potasio.

2.1.2 Andr6genos

Los andr6genos (del griego “*andro*” que significa masculino) son compuestos naturales o sint6ticos que controlan o estimulan el desarrollo y mantenimiento de las caracteristicas masculinas en vertebrados por la uni6n a receptores androg6nicos. Esto incluye el desarrollo y actividad de los 6rganos sexuales y el desarrollo de caracteristicas sexuales secundarias. El andr6geno principal y mejor conocido es la testosterona.¹⁰

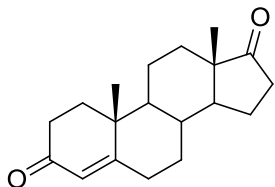
El principal subconjunto de andr6genos conocidos como andr6genos suprarrenales, tienen una estructura esteroidal con 19 carbonos y son sintetizados en la zona reticular, en la capa m1s interna de la corteza adrenal.¹⁰ A continuaci6n se presenta una lista de los andr6genos m1s importantes.

Testosterona



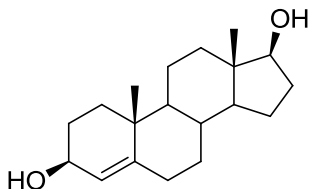
Es producida por los test6culos, ovarios y en peque1as cantidades por las gl1ndulas suprarrenales, es la principal hormona masculina.

Androstenediona



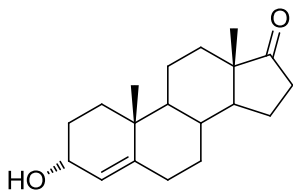
Es sintetizada en las gl1ndulas suprarrenales y en las g6nadas, es el precursor sint6tico de las hormonas masculinas y femeninas.

Androstenediol



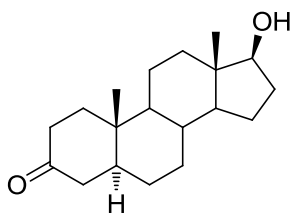
Es el metabolito esteroidal que se cree que act1a como principal regulador de la secreci6n de gonadotropina.

Androsterona



Subproducto del metabolismo de andrógenos y derivado de la progesterona. Es producida también por la corteza adrenal. Tiene efectos masculinizantes menores y es siete veces menos potente que la testosterona.

5 α -Dihidrotestosterona



Es un metabolito de la testosterona sintetizado por la enzima 5 α -reductasa. Durante la embriogénesis tiene un rol principal en la formación de los genitales externos masculinos.

2.2 Padecimientos andrógeno-dependientes

El cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna son dos padecimientos que afectan a la población masculina. Ambos padecimientos son dependientes de andrógenos, principalmente de la dihidrotestosterona (DHT), que es el andrógeno más potente y que es sintetizado a partir de la testosterona en una reacción catalizada por la enzima 5 α -reductasa.

2.2.1 Aspectos generales de la próstata

La próstata, una glándula exclusivamente masculina, está ubicada delante del recto y debajo de la vejiga, como se muestra en la Figura 2.3. El tamaño de la próstata varía con la edad. En los hombres más jóvenes, la próstata es del tamaño de una nuez. Pero, puede ser mucho más grande en hombres de más edad.

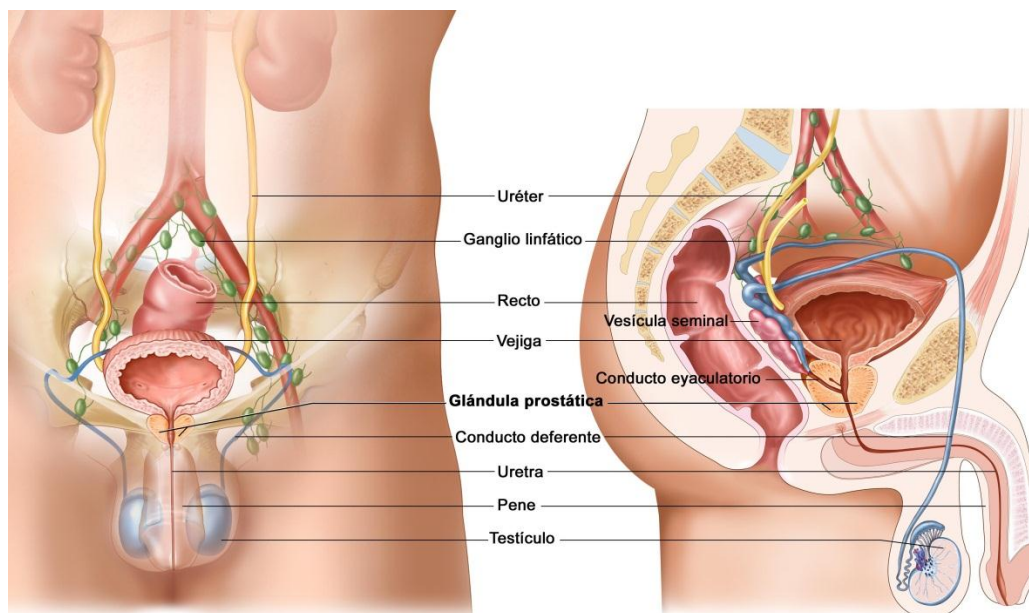


Figura 2.3 Esquema del sistema reproductor masculino¹¹

La función de la próstata consiste en producir cierta cantidad del líquido que protege y nutre a los espermatozoides presentes en el semen. Lo que causa que sea más líquido. Inmediatamente detrás de la próstata se encuentran las vesículas seminales, que producen el mayor volumen de líquido para el semen. La uretra, que es el conducto que transporta la orina y el semen fuera del cuerpo a través del pene, pasa por el centro de la próstata.¹¹

La próstata comienza a desarrollarse antes del nacimiento y continúa su crecimiento hasta que el hombre alcanza la adultez. Este crecimiento es promovido por hormonas masculinas (llamadas andrógenos). El andrógeno principal, la testosterona, se produce en los testículos. La enzima 5α -reductasa transforma la testosterona en DHT, la cual le envía una señal a la próstata para que crezca. Mientras las hormonas masculinas estén presentes, la próstata permanece del tamaño normal para un adulto. En los hombres mayores a 45 años, la parte interior de la próstata (alrededor de la uretra) a menudo sigue creciendo causando una condición común llamada hiperplasia prostática benigna (HPB). Cuando se presenta esta afección, el tejido de la próstata puede presionar la uretra, lo que causa problemas al pasar la orina. La HPB puede ser un problema de salud grave, pero no es cáncer.¹²

2.2.2 Cáncer de próstata

Varios tipos de células se encuentran en la próstata, pero casi todos los casos de cáncer de próstata se desarrollan a partir de las células de la glándula; células que producen el líquido de la próstata que se agrega al semen. Algunos cánceres de próstata pueden crecer y propagarse rápidamente, pero la mayoría de éstos crecen lentamente.¹³

Todavía no se entienden completamente las causas del cáncer de próstata, pero los investigadores han encontrado varios factores que pueden cambiar el riesgo de padecer esta enfermedad. Para algunos de estos factores, la asociación con el riesgo de cáncer de próstata aún no está clara.¹⁴

Edad. La edad es el principal factor de riesgo para el cáncer de próstata. El cáncer de próstata ocurre en muy pocas ocasiones antes de la edad de 40 años, pero la probabilidad de tener cáncer de próstata aumenta rápidamente después de los 50 años. Casi dos de tres casos de cáncer de próstata se detectan en hombres mayores de 65 años.¹⁵⁻¹⁶

Raza o grupo étnico. El cáncer de próstata ocurre con más frecuencia en los hombres de ascendencia de raza negra que en los hombres de otras razas. Además, los hombres de raza negra tienen una mayor probabilidad de ser diagnosticados en una etapa avanzada, y tienen más del doble de probabilidad de morir de cáncer de próstata en comparación con los hombres blancos. El cáncer de próstata ocurre con menos frecuencia en los hombres asiático-americanos e hispano-latinos que en los hombres blancos. No están claras las razones de estas diferencias raciales y étnicas.¹⁷⁻¹⁸

Antecedentes familiares. Parece ser que el cáncer de próstata afecta más a algunas familias, lo cual sugiere que en algunos casos puede haber un factor hereditario o genético. Si el padre o el hermano de un hombre padecen cáncer de próstata, se duplica el riesgo de que este hombre padezca la enfermedad (el riesgo es mayor para un hombre con un hermano afectado que para un hombre cuyo padre ha tenido este tipo de cáncer).¹⁹⁻²¹

Inflamación de la próstata. Algunos estudios han sugerido que la prostatitis (inflamación de la glándula prostática) puede estar asociada con un riesgo aumentado de cáncer de próstata, aunque otros estudios no han encontrado tal asociación. A menudo, la

inflamación se observa en las muestras del tejido de la próstata que también contiene cáncer. La asociación entre los dos no está clara, pero ésta es un área activa de investigación.²²

2.2.2.1 Pruebas para la detección del cáncer de próstata

La detección del cáncer de próstata implica buscar la presencia de cáncer antes de que produzca síntomas. Esto resulta útil para descubrir el cáncer en una fase temprana, cuando puede ser más fácil de tratar.²³⁻²⁴

Las pruebas que se realizan habitualmente para detectar el cáncer de próstata²⁵ son:

- **Tacto rectal (DRE, por sus siglas en inglés):** Un doctor o un enfermero insertará un dedo enguantado y lubricado en el recto para palpar la próstata, con el fin de determinar su tamaño y sentir si hay bultos u otras anomalías.
- **Prueba del antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés):** La prueba del PSA es un examen de sangre que mide los niveles de PSA en la sangre. El PSA es una proteína que produce la próstata. Los niveles del PSA en la sangre pueden ser más elevados en los hombres que tienen cáncer de próstata. Otras afecciones que afectan la próstata también pueden causar una elevación en los niveles del PSA.

2.2.2.2 Aspectos generales de las opciones de tratamiento contra cáncer de próstata

Existen diferentes tipos de tratamientos para todos los pacientes con cáncer de próstata. Algunos tratamientos son estándar (el que se usa en la actualidad) y otros están en investigación en estudios clínicos. La elección del tratamiento más adecuado para el cáncer es una decisión que idealmente involucra al paciente, su familia y al equipo de atención médica.

Vigilancia expectante. Si el cáncer de próstata se detecta en una etapa inicial y crece lentamente, y el tratamiento del cáncer provocaría más molestias que la enfermedad, el médico puede recomendar la vigilancia activa o espera vigilante. Durante la vigilancia activa, el cáncer se monitorea cuidadosamente mediante pruebas regulares del PSA y de

DRE, y la observación de síntomas con biopsias periódicas. Generalmente, se recomienda en el caso de los pacientes mucho mayores o de aquellos con otras enfermedades graves o que ponen en riesgo la vida. Si el cáncer muestra signos de empeoramiento, se suele recomendar la terapia hormonal para tratar los síntomas.²⁶⁻²⁷

Cirugía. La cirugía es la extirpación del tumor y del tejido circundante durante una operación. Se usa para tratar de eliminar un tumor antes de que se disemine fuera de la próstata. El tipo de cirugía depende del estadio de la enfermedad, del estado de salud general del hombre y de otros factores.²⁸

Radioterapia. La radioterapia es el uso de rayos de alta potencia para destruir células cancerosas. Generalmente, la radioterapia con haz externo se administra con un haz de rayos X de alta potencia.²⁸

Quimioterapia. La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas, generalmente al inhibir su capacidad para crecer y dividirse. Se usan diversos fármacos estándares para el cáncer de próstata. En general, la quimioterapia estándar comienza con docetaxel combinado con un esteroide denominado prednisona. Se ha demostrado que esta combinación ayuda a que los hombres con cáncer de próstata avanzado vivan más en comparación con otro fármaco quimioterapéutico, mitoxantrona (Novantrone), que fue una de las primeras quimioterapias aprobadas para el cáncer de próstata metastásico resistente a la castración.²⁹

Hormonoterapia: La hormonoterapia es el uso de hormonas con el fin de detener el crecimiento de las células cancerosas. Las hormonas masculinas (en especial la testosterona) pueden estimular el crecimiento del cáncer de próstata. Con el fin de detener este crecimiento se pueden administrar hormonas femeninas o medicamentos que reducen la producción de las hormonas masculinas.

La hormonoterapia constituye una valiosa arma terapéutica utilizada en el tratamiento del cáncer de próstata la cual puede incluir lo siguiente:³⁰

- **Los estrógenos** pueden impedir que los testículos produzcan testosterona. Sin embargo, los estrógenos rara vez se utilizan en el tratamiento del cáncer de próstata debido al riesgo de efectos secundarios peligrosos.³¹
- **Los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante** también pueden impedir que los testículos produzcan testosterona. Algunos ejemplos son el leuprolide, el goserelín y el busarelín.³²
- Los fármacos que pueden impedir que las glándulas suprarrenales produzcan andrógenos incluyen al ketoconazol y la aminoglutetimida.³³
- **Inhibidores de la CYP17.** Si bien los testículos son los principales productores de andrógenos, otras células del cuerpo, incluidas las células cancerosas de la próstata, pueden, de todos modos, producir pequeñas cantidades, que pueden impulsar el crecimiento del cáncer. La abiraterona (Fig. 2.4) es un fármaco que bloquea una enzima denominada CYP17 e impide que estas células produzcan determinadas hormonas, incluidos los andrógenos.³⁴

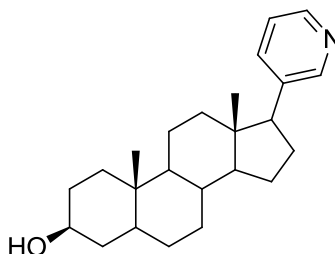
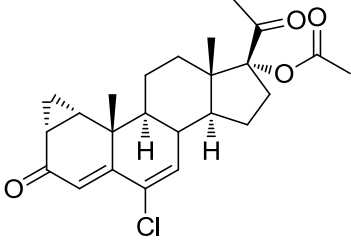
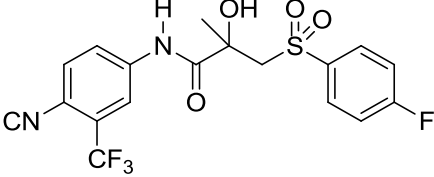
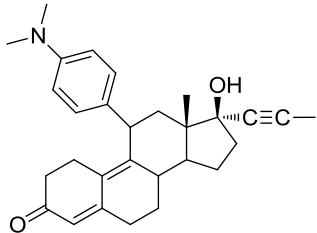
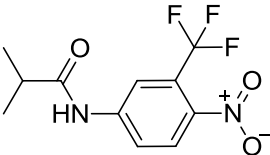
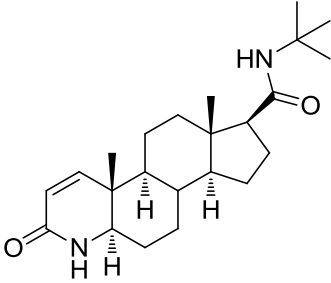
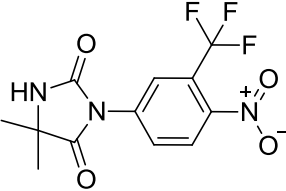


Figura 2.4 Abiraterona

- **Orquiectomía bilateral.** La orquiectomía bilateral es la extirpación quirúrgica de ambos testículos y fue el primer tratamiento usado para el cáncer de próstata metastásico más de 70 años atrás. Si bien se trata de una operación, se considera una terapia hormonal porque extirpa la fuente principal de la producción de testosterona, los testículos. Los efectos de esta cirugía son permanentes y no pueden revertirse.
- **Los antiandrógenos.** Su función consiste en suprimir la acción biológica de los andrógenos (hormonas que producen las características sexuales masculinas) ya sea bloqueando los receptores androgénicos o impidiendo la función de ciertas enzimas, que actúan en diferentes tejidos. Por lo que se refiere a los antiandrógenos, pueden

estar constituidos por moléculas con una estructura esteroidal, como los que han sido desarrollados por nuestro grupo de investigación, o ser de tipo no esteroidal.³⁵

Tabla 2.2 Ejemplos de antiandrógenos comerciales

Esteroidales	No esterooidales
<p data-bbox="430 527 721 558">Acetato de ciproterona</p> 	<p data-bbox="917 527 1089 558">Bicalutamida</p> 
<p data-bbox="488 846 660 877">Mefepristona</p> 	<p data-bbox="938 846 1068 877">Flutamida</p> 
<p data-bbox="505 1157 644 1188">Finasterida</p> 	<p data-bbox="930 1157 1076 1188">Nilutamida</p> 

Los antiandrógenos comerciales ocasionan alteraciones hormonales, fallas cardiacas, retención de líquidos, efectos nocivos en las células del hígado (hepatotóxicos), disminución del deseo sexual, vómito y diarrea, entre otros síntomas.

Por lo tanto investigaciones en este campo están enfocadas en anular lo más posible estas reacciones adversas en los antiandrógenos que se han sintetizado, y además, diseñar un proceso de síntesis rentable, con altos rendimientos y bajos costos.

2.2.3 Hiperplasia prostática benigna

La hiperplasia prostática benigna también es conocida como hipertrofia prostática benigna, crecimiento prostático benigno u obstrucción prostática benigna.

La HPB es definida de acuerdo a criterios clínicos como la presencia de una obstrucción del flujo de salida de la vejiga y el crecimiento prostático benigno. Esto es conocido también como prostatismo.³⁶

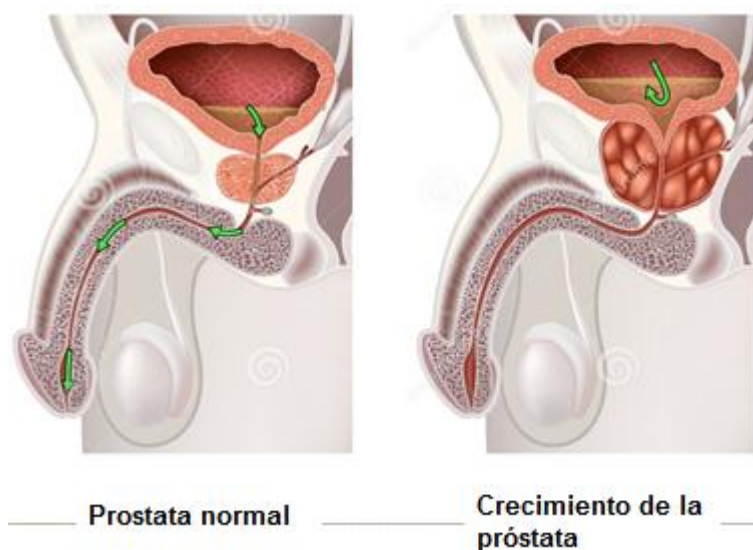


Figura 2.5 Representación de la HPB³⁶

El crecimiento de la próstata es prácticamente universal en los hombres debido a la edad y masa corporal,³⁷ cuando el tamaño de esta glándula es muy grande puede llegar a comprimir la uretra lo que lleva a una obstrucción significativa parcial o casi total de los canales de la uretra lo cual impide el paso del flujo de la orina y una retención urinaria aguda en algunos hombres.

La HPB provoca síntomas como dificultad para orinar, necesidad frecuente de orinar, disuria (dolor al orinar), aumento en el riesgo de infecciones del tracto urinario y retención urinaria. No se ha encontrado una relación directa entre la severidad de los síntomas y el tamaño de la próstata. Algunos hombres presentan síntomas severos de obstrucción urinaria con un crecimiento prostático mínimo, mientras que otros presentan síntomas mínimos con próstatas grandes.³⁶

La patogénesis de la HPB no es bien conocida hasta el momento, sin embargo algunas causas posibles son:

- Conversión de la testosterona plasmática (de los testículos) por la 5 α -reductasa en DHT, la cual promueve el crecimiento prostático.³⁸
- Un aumento de los niveles de estradiol (la enzima aromatasa convierte la testosterona a estradiol) como resultado de la edad. Los estrógenos actúan sinérgicamente con la DHT para inducir receptores androgénicos y crecimiento prostático.
- Activación de los adrenoreceptores α 1, lo que incrementa el tono del músculo liso del cuello de la vejiga y la próstata.³⁹

La HPB, se presenta en general, en los hombres mayores de 45 años y su prevalencia aumenta con la edad. La evidencia de los estudios de autopsias sugiere que más del 90% de los hombres mayores de 70 años presentan HPB. La edad a la cual se presentan los síntomas es cercana a los 65 años, y aunque para los hombres con ascendencia negra es de 60 años. A los 60 años la prevalencia de la HPB es \geq 50% y para la edad de 85 años hasta un 90% de los hombres presenta los síntomas. Sin embargo, a pesar de una alta prevalencia, la mortalidad asociada con la HPB es baja y la presencia de complicaciones serias no es frecuente.

2.2.3.1 Aspectos generales de las opciones de tratamiento contra la HPB

La elección del tratamiento apropiado se basa en la severidad de los síntomas, en el grado en que afectan el estilo de vida del individuo y en la presencia de cualquier otra

condición médica. Las opciones de tratamiento incluyen: una espera con vigilancia cuidadosa, diversas terapias con medicamentos y diversos métodos quirúrgicos.⁴⁰⁻⁴¹

Bloqueadores α_1 : La terapia médica actual puede incluir el uso de bloqueadores α_1 (doxazosina, prazosina, tamsulosina y terazosina), también utilizados frecuentemente en el tratamiento de la hipertensión arterial. Estos medicamentos se usan en el tratamiento de la HPB puesto que relajan los músculos del cuello vesical y facilitan la micción. Dos tercios de las personas tratadas con bloqueadores α_1 manifiestan mejoría de los síntomas.⁴²

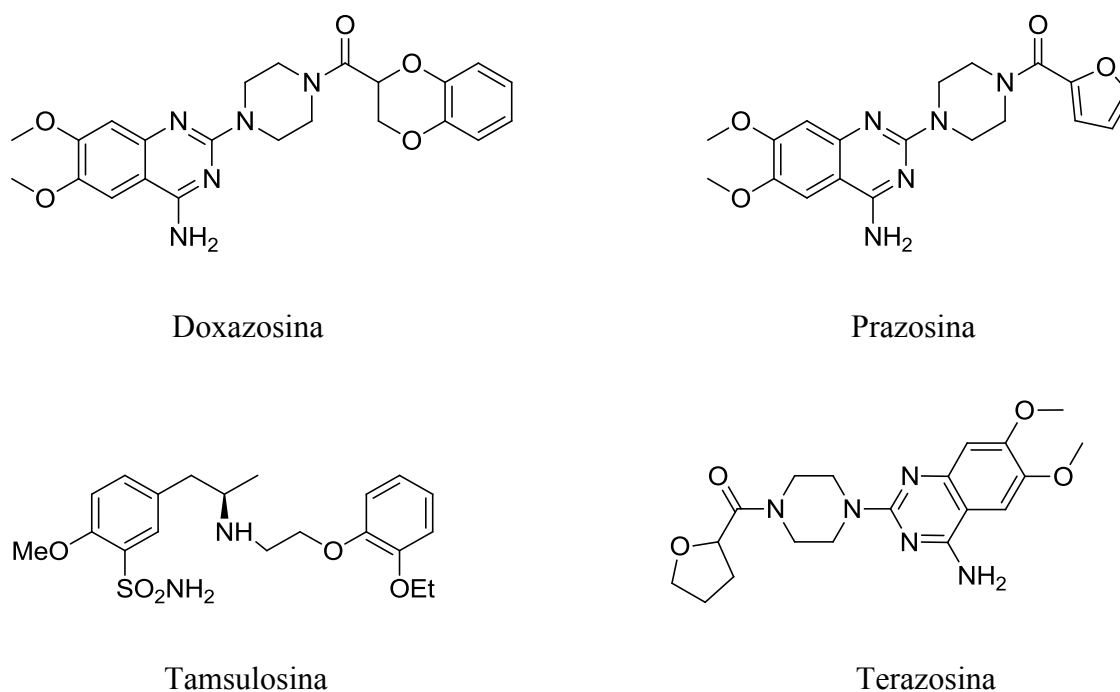


Figura 2.6 Estructura de los bloqueadores α_1

Inhibidores de la enzima 5α -reductasa. La finasterida es un 4-azaesteroide inhibidor competitivo reversible y específico de la enzima 5α -reductasa. Bloquea la transformación de testosterona en DHT a nivel de la próstata, reduciendo así su tamaño. Se ha demostrado que este fármaco aumenta el flujo de orina y disminuye los síntomas de la HPB. Sin embargo, para que se produzca una mejoría significativa de los síntomas, pueden ser necesarios hasta 6 meses de tratamiento. Entre los efectos secundarios potenciales relacionados con su uso están la disminución del impulso sexual (3.3%) y la impotencia (2.5 a 3.7%).⁴³

Cirugía. La cirugía se aconseja generalmente en los casos con síntomas de incontinencia, hematuria recurrente, retención urinaria e infecciones urinarias recurrentes. La elección del tipo de procedimiento quirúrgico generalmente se basa en la severidad de los síntomas y el tamaño y forma de la próstata.

2.2.4 Enzima 5 α -reductasa

La enzima 5 α -reductasa cataliza la reducción estereoselectiva de la testosterona a DHT utilizando como cofactor NADPH en su forma reducida. Existen dos isoformas de esta enzima denominadas tipo 1 y tipo 2, las cuales difieren en sus propiedades bioquímicas, tejido de localización y su función.⁴⁴

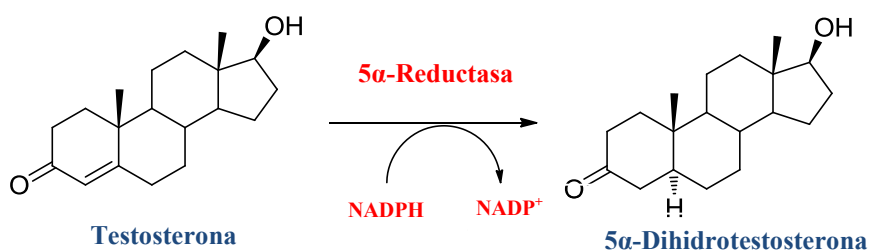


Figura 2.7 Transformación de la testosterona en DHT por acción de la enzima 5 α -reductasa

La isoenzima tipo 1 se encuentra predominantemente en el hígado, glándulas sebáceas, cuero cabelludo, cerebro y en bajas cantidades en la próstata; por otro lado, la isoforma tipo 2 se encuentra predominantemente en la próstata, piel genital y vesículas seminales. La homología entre ambas es alrededor del 50% y algunas de sus características se muestran en la siguiente tabla.⁴⁵

Tabla 2.3 Comparación de las isoformas 1 y 2 de la enzima 5 α -reductasa

Características	Isoenzima 1	Isoenzima 2
No. de aminoácidos	259	254
pH óptimo	6-8.5	5-5.5
Km (saturación)	3 μ M	5 μ M
Gen que la codifica	SRD5A1	SRD5A2

El mecanismo propuesto para la reducción irreversible de la testosterona a DHT mediante la enzima 5 α -reductasa involucra la formación de un complejo binario entre la enzima y el cofactor NADPH, seguido por la formación de un complejo terciario con la testosterona. Ocurre entonces una activación del sistema enónico mediante una interacción fuerte con un residuo electrofílico presente en el sitio activo de la enzima generando un carbocatión con carga deslocalizada, el cual es reducido selectivamente en el carbono C-5 por la cara α por la transferencia de un hidruro proveniente del NADPH. Posteriormente el enol así formado, mediante un tautomerismo ceto-enol propicia la salida de la dihidrotestosterona regenerando el complejo binario inicial entre el NADP⁺-enzima, que con la posterior liberación del NADP⁺, deja a la enzima libre para entrar a un nuevo ciclo catalítico.⁴⁵⁻⁴⁶

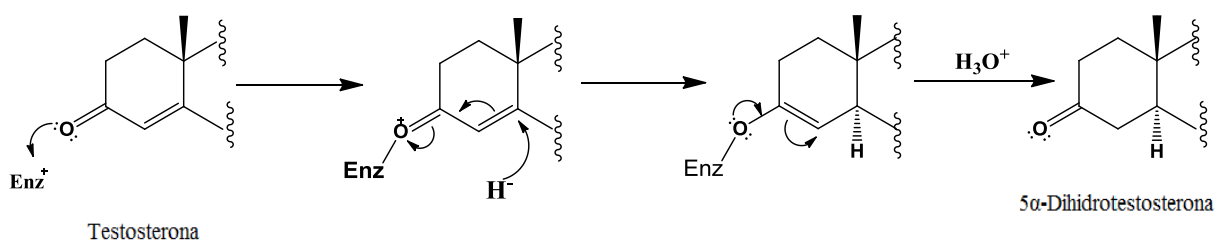


Figura 2.8 Mecanismo de reducción de la testosterona a 5 α -dihidrotestosterona por acción de la enzima 5 α -reductasa⁴⁶

Ninguna de las isoenzimas ha sido purificada a la fecha debido a su naturaleza inestable, por lo que los inhibidores de éstas han sido diseñados por modificación del sustrato.

2.2.5 Antiandrógenos esteroidales

Debido a los efectos colaterales que presentan los antiandrógenos actuales del mercado, hay una búsqueda continua por desarrollar nuevos agentes esteroidales con mayor actividad antiandrogénica y menores efectos secundarios.⁴⁷ Como ya se ha mencionado, la DHT es el andrógeno responsable de varias de las enfermedades andrógeno-dependientes y por eso se considera un excelente blanco farmacológico la inhibición de la enzima 5α -reductasa ya que de esta forma sólo se bloquea la formación de la DHT sin afectar las funciones biológicas de la testosterona.

Básicamente existen dos métodos para sintetizar un esteroide con características antiandrogénicas los cuales se describen a continuación.

Derivados del androstano. Este tipo de inhibidores han sido diseñados modificando la estructura de la testosterona y se efectúan en ella diversas modificaciones estructurales, de manera que se tenga un efecto antagónico. Así, el nuevo compuesto sintetizado tendrá la capacidad de unirse al receptor sin producir efecto androgénico, bloqueando la formación del complejo andrógeno-receptor.⁴⁸⁻⁴⁹

Derivados del pregnano. Este tipo de inhibidores han sido diseñados modificando la estructura de la progesterona, lo cual es una ventaja, ya que los compuestos obtenidos a partir de ella presentan una mayor actividad antiandrogénica, debido a que la progesterona es un antiandrógeno natural por la competencia que existe con la testosterona por la unión a la enzima 5α -reductasa. Se han obtenido una serie de compuestos esteroidales con actividad antiandrogénica que presentan una baja actividad hormonal, baja toxicidad y no disminuyen el líbido.⁵⁰⁻⁵⁴

Considerando los buenos resultados obtenidos en mis estudios de maestría,⁵⁵ relacionados con pruebas primarias en líneas celulares de cáncer, en las cuales se observó un alto porcentaje de inhibición tanto en la línea celular de cáncer de próstata, como en la de cáncer de mama, se decidió utilizar el esqueleto base de los compuestos reportados,⁵⁵ la 16-deshidropregnenolona con un carbonilo α,β -insaturado en C-6 (Figura 2.9), y hacer una modificación estructural en C-3 cambiando el grupo éster aromático por ésteres alifáticos

lineales y cíclicos, así como un grupo carbamato, con la finalidad de comparar sus actividades biológicas (Esquema 5.1) y encontrar una estructura más activa ya que se ha publicado que ésteres en esta posición presentan una alta citotoxicidad en líneas celulares de cáncer y alta actividad antiandrogénica.⁵⁶⁻⁶¹

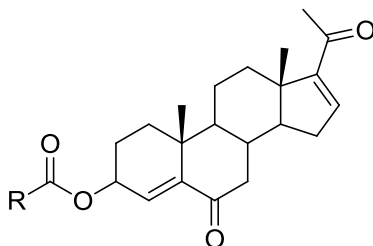


Figura 2.9 Esqueleto derivado de la 16-deshidropregnenolona con un carbonilo α,β -insaturado en C-6

Por otro lado en nuestro grupo de trabajo se demostró que el compuesto pregna-4,6-dien-4,6,20-triona (Figura 2.10) presenta una potencia de inhibición de la enzima 5α -reductasa en pruebas *in vitro* mayor que la finasterida que es el fármaco del mercado (Tabla 2.4),⁶² este resultado se atribuyó al sistema de carbonilos conjugados en los anillos A y B; sin embargo, en pruebas *in vivo* no mostró una buena actividad (Tabla 2.5), parte de nuestra hipótesis fue que esta molécula no contaba con un sustituyente lipofílico que le brindara al compuesto la capacidad de atravesar la membrana celular. Es por esto que otro de los objetivos de esta investigación fue el diseño de una ruta sintética para lograr obtener compuestos con este sistema conjugado y un éster en C-21 que aumentaría la lipofilia del compuesto (Esquema 2), en esta ruta se sintetizaron cuatro compuestos finales, dos con ésteres alifáticos y dos con aromáticos (**17a-d**).

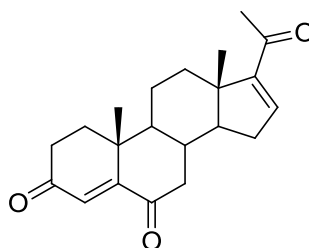


Figura 2.10 Compuesto pregna-4,6-dien-4,6,20-triona

Tabla 2.4 CI_{50} de pruebas de inhibición de la enzima 5α -reductasa del compuesto preгна-4,6-dien-4,6,20-triona⁶²

Tratamiento	CI_{50} (M) 5α -R (Tipo 2)
T+ Finasterida	8.5×10^{-9}
T+ preгна-4,6-dien-4,6,20-triona	8.5×10^{-10}

Tabla 2.5 Pruebas *in vivo* del compuesto preгна-4,6-dien-4,6,20-triona⁶²

Tratamiento	Peso de la próstata (mg)
Control	48.5±9.59
Control + T	87.6±10.2
T+ Finasterida	55.0±10.7
T+ preгна-4,6-dien-4,6,20-triona	74.1±15.9

3. HIPÓTESIS

La síntesis de compuestos esteroideos que en su estructura contengan carbonilos α,β -insaturados tendrán la característica de ser buenos inhibidores de la enzima 5α -reductasa por su similitud con la testosterona. Las funciones éster o carbamato en posiciones C-3 o C-21 le brindaran liposolubilidad a las moléculas derivadas del pregnano para que atraviesen la membrana celular más fácilmente.

La incorporación de un grupo éster en C-21 en el compuesto pregna-4,16-dien-3,6,20-triona incrementará la liposolubilidad y la actividad *in vivo* de estos derivados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Obtención de compuestos esteroidales derivados del pregnano con una función éster en C-3 y C-21 para ser probados en líneas celulares de cáncer y como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.

4.2 Objetivos específicos

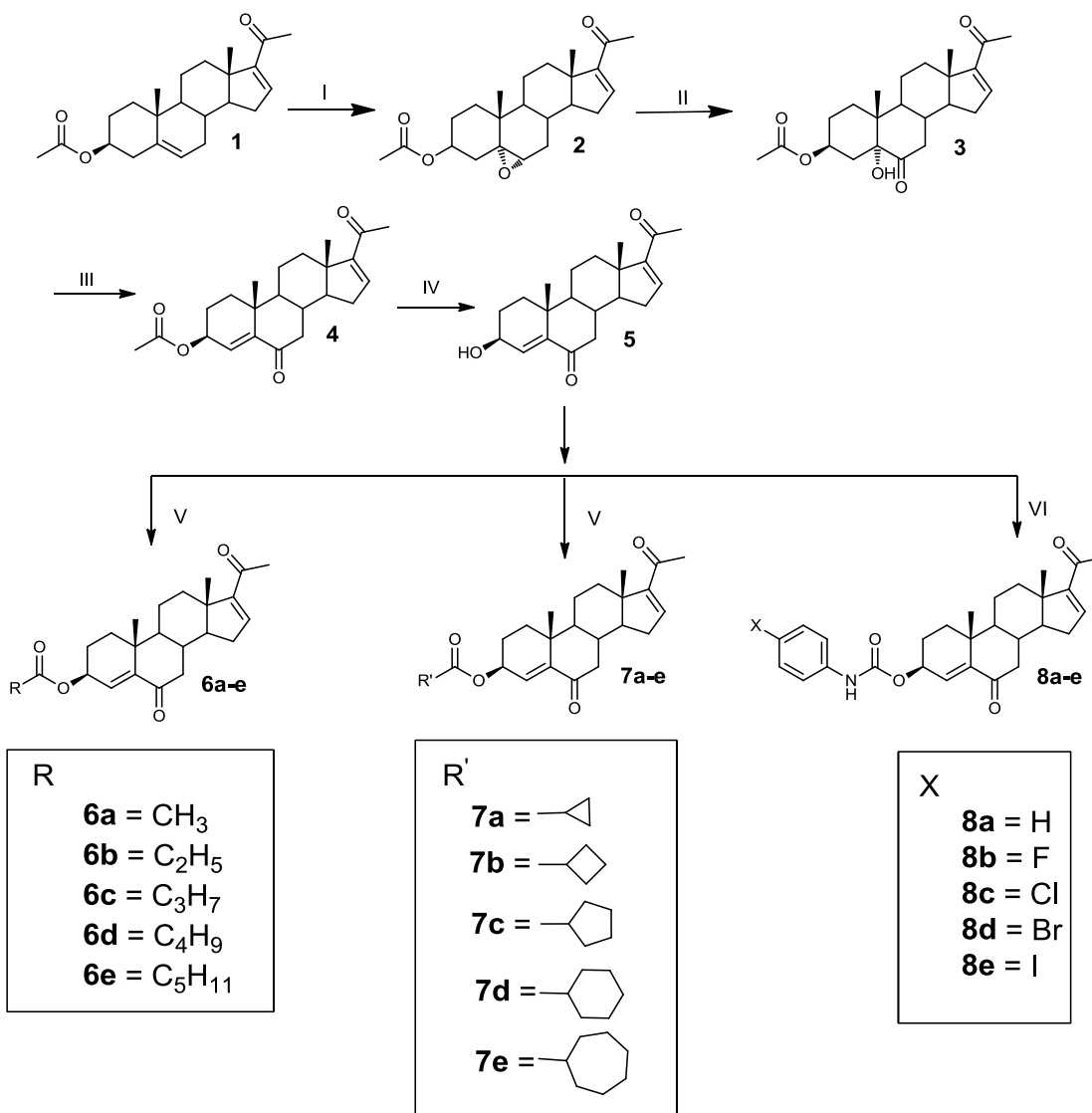
- Síntesis de compuestos derivados del pregnano con:
 - a) Carbamatos aromáticos, ésteres alifáticos y alicíclicos en C-3 así como un carbonilo α,β -insaturado en C-6 y C-20.
 - b) Ésteres aromáticos y alifáticos en C-21 con una conjugación 4-en-3,6-diona.
 - c) Ésteres aromáticos y alifáticos en C-21 con una conjugación 4-en-3-ona.
- Análisis primarios de los compuestos finales en las líneas celulares de cáncer: PC-3 (próstata), MCF-7 (mama), y SKLU-1 (pulmón). Así como pruebas de inhibición de la enzima 5 α -reductasa.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Discusión de resultados parte química

5.1.1 Síntesis de ésteres y carbamatos en C-3

Para la síntesis de compuestos esteroidales que en su estructura contengan funciones ésteres o carbamatos en C-3 así como un carbonilo α,β -insaturado en C-6 y C-20 se usó como materia prima acetato de 16-deshidropregnenolona (**1**), el tratamiento de **1** con ácido *m*-cloroperoxibenzoico produjo un epóxido en C-5 y C-6 (**2**) como se muestra en el Esquema 5.1. El tratamiento de **2** con ácido crómico provocó la apertura del epóxido y la posterior oxidación del alcohol de C-6 formando así el compuesto **3** el cual se trató con cloruro de tionilo y piridina para eliminar el hidroxilo de C-5 y de este modo formar el carbonilo α,β -insaturado (**4**), la hidrólisis del grupo acetoxi con sosa desprotegió el alcohol de C-3 (**5**) dejándolo libre para la posterior funcionalización. Este compuesto se hizo reaccionar con ácidos carboxílicos para formar dos series de ésteres, la primera serie de ésteres alifáticos (**6a-e**) y la segunda de ésteres alicíclicos (**7a-e**), y a su vez el alcohol **5** reaccionado con isocianatos aromáticos formó los carbamatos (**8a-e**).



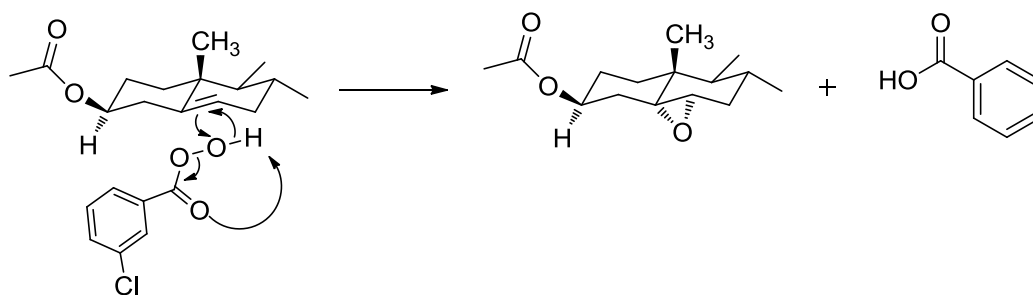
I: *m*-CPBA, CH₂Cl₂ **II:** CrO₃, H₂O, acetona **III:** SOCl₂, Py, CH₂Cl₂ **IV:** NaOH 2%, MeOH
V: ácido carboxílico correspondiente, DCC, DMAP, CH₂Cl₂ **VI:** isocianato, CuI, THF.

Esquema 5.1 Procedimiento sintético para la obtención de ésteres en C-3 con carbonilos conjugados en C-6 y C-20

5.1.1.1 Síntesis de la 3β-acetoxi-5,6α-epoxi-5α-pregn-16-en-20-ona (2)

El compuesto acetato de 16-desihidropregnenolona es comercialmente accesible, este compuesto estuvo almacenado en nuestro laboratorio por algunos años y para usarlo se tuvo que purificar mediante recristalización de metanol debido a que contenía impurezas más polares, la materia prima pura se obtuvo con un 93% de rendimiento.

La epoxidación del doble enlace 5,6 usando ácido *m*-cloroperoxisbenzoico, ha sido ampliamente estudiada y se conoce que la reacción produce la mezcla de los epóxidos 5 α ,6 α y 5 β ,6 β , obteniéndose como producto mayoritario el epóxido α . Esto se debe al impedimento estérico del metilo de C-10 que se encuentra en posición β dirigiendo el acercamiento del peroxiácido hacia el doble enlace por la cara α menos impedida (Esquema 5.2). En nuestro laboratorio se ha determinado que la relación de los isómeros α -epoxi y β -epoxi es aproximadamente 2:1.⁵⁷ Esta reacción se consiguió con un rendimiento del 78%.



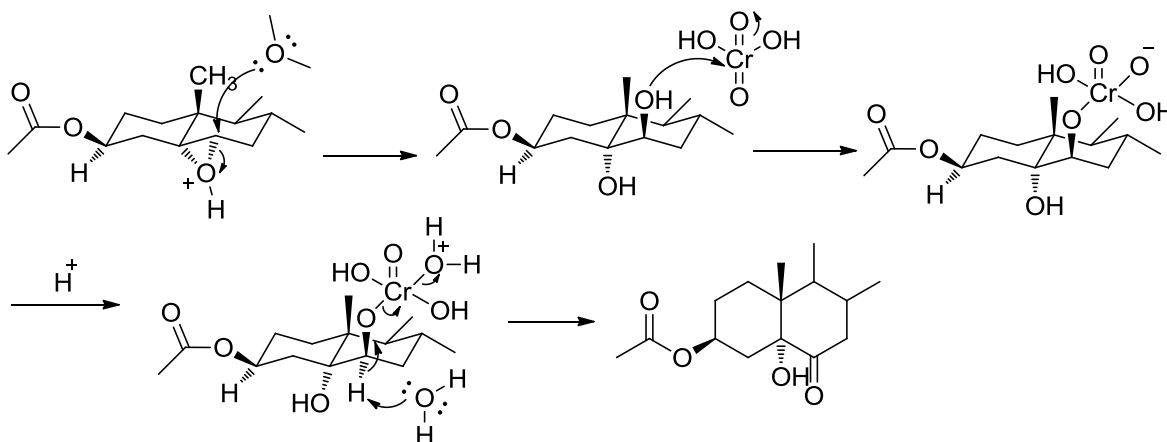
Esquema 5.2 Mecanismo de reacción para la formación del epóxido **2**

En el espectro de absorción infraroja, se corrobora la síntesis del epóxido por la banda correspondiente al estiramiento C-O-C a 1240 cm^{-1} . En el espectro de RMN ^1H se observa una señal doble a 2.91 ppm correspondiente al protón unido al C-6 del epóxido, el protón vinílico de la materia prima a 5.3 ppm no aparece. Así mismo en el espectro de RMN ^{13}C los carbonos C-5 (140.2 ppm) y C-6 (121.9 ppm) de la materia prima se desplazan a campo alto debido al cambio de grupo funcional a 60.4 ppm para C-6 y 65.3 ppm para C-5. En el espectro de masas se exhibe el ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ en m/z 372.

5.1.1.2 Síntesis de la 3 β -acetoxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-6,20-diona (**3**)

El tratamiento del compuesto **2** con ácido crómico, produjo el cetol **3** con un rendimiento del 81%, el mecanismo conlleva la apertura del epóxido formando un glicol y la posterior oxidación del alcohol de C-6. Varios autores coinciden en que las reacciones de oxidación de alcoholes esteroideas se llevan a cabo más fácilmente en alcoholes axiales que en ecuatoriales ya que el paso determinante de la reacción es la ruptura del enlace C-H

por la base y en un alcohol ecuatorial éste enlace es menos accesible. Adicionalmente se ha publicado que la transformación de un carbono tetraédrico con un grupo hidroxilo a un carbono carbonílico de geometría trigonal plana, elimina algunas interacciones de repulsión 1,3 diaxiales que producen inestabilidad en la molécula.⁶³⁻⁶⁴



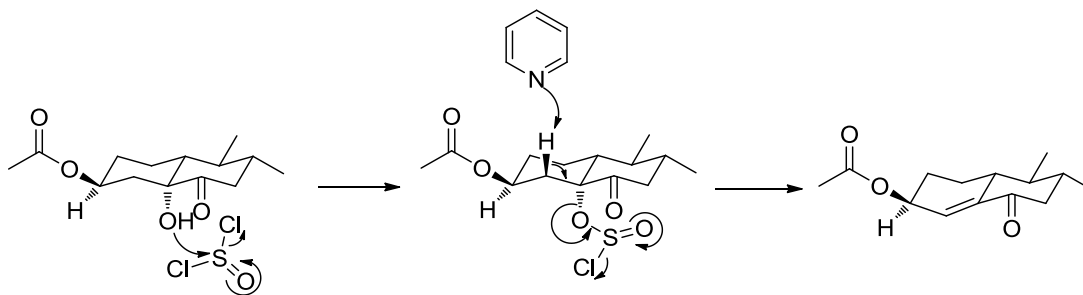
Esquema 5.3 Mecanismo de reacción para la formación del cetol **3**

El alcohol formado por la apertura del epóxido genera una banda ancha a 3364 cm^{-1} en el espectro de IR y el estiramiento $\text{C}=\text{O}$ del carbonilo se observa por una banda intensa a 1700 cm^{-1} . En el espectro de RMN de ^1H se revela una señal simple a 3.6 ppm perteneciente al alcohol y en el espectro RMN ^{13}C se presentan las señales del carbono carbonílico a 211.6 ppm y la del C-5 a 80.4 ppm. En el espectro de masas el ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ aparece a m/z 389.

5.1.1.3 Síntesis de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**4** y **6a**)

La deshidratación del alcohol de C-5 genera la cetona α,β -insaturada responsable de la actividad biológica de las moléculas. Esta reacción se lleva a cabo en presencia de cloruro de tionilo y piridina como base. El mecanismo de reacción se realiza mediante una eliminación nucleofílica bimolecular (E_2) ya que no puede experimentar una reacción de sustitución o de eliminación nucleofílica unimolecular porque el carbono unido al alcohol es un carbono cabeza de puente que impide que se forme la geometría trigonal plana

requerida por el carbocatión, por lo que se obtiene una reacción 100% E₂. El rendimiento de esta reacción fue del 81% y el mecanismo de reacción se muestra en el Esquema 5.4.

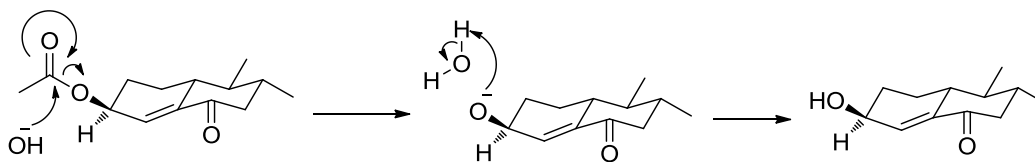


Esquema 5.4 Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 4

El carbonilo α,β -insaturado debido a su conjugación revela una banda de máxima absorción en el espectro de UV a 237 nm. En el espectro de IR no se presenta la señal del alcohol y la banda del C=O de C-6 se desplaza a 1657 cm^{-1} . El protón vinílico de C-4 se exhibe como una señal simple a 6.1 ppm y en el espectro de RMN de ^{13}C el carbonilo de C-6 se presenta a 201 ppm y los carbonos C-4 y C-5 de la doble ligadura a 129 ppm y 147.9 ppm respectivamente. El ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ en el espectro de masas se observa a m/z 371.

5.1.1.4 Síntesis de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)

El siguiente paso de reacción fue la desprotección del alcohol de C-3 en medio básico (Esquema 5.5). La reacción se obtiene con un rendimiento del 87% y se purifica fácilmente mediante recristalización de metanol.



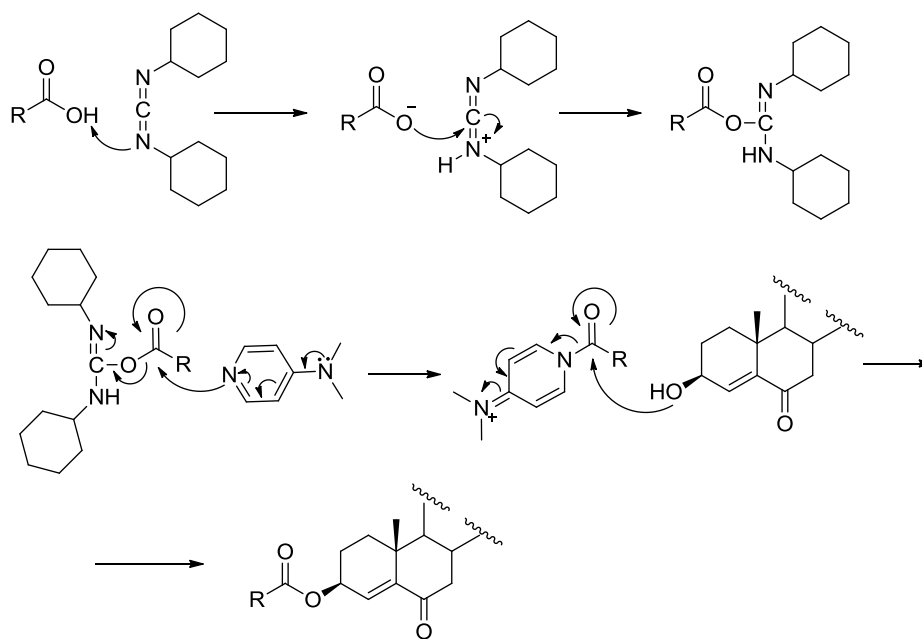
Esquema 5.5 Mecanismo de reacción para la formación del compuesto 5

La desprotección del alcohol de C-3 se comprueba en el espectro de IR con la presencia de una banda ancha a 3383 cm^{-1} y la desaparición de la banda de 1733 cm^{-1} del carbonilo del éster, en el espectro de RMN el protón del hidroxilo genera una señal simple a 3.2 ppm, el protón unido a C-3 se desplaza a campo alto (4.2 ppm) debido al cambio de

grupo funcional y en el espectro de RMN de ^{13}C el carbono de C-3 se desplaza solo 2 ppm a campo alto (67.1 ppm) y desaparecen las señales del acetoxi. En el espectro de masas se observa el ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 329.

5.1.1.5 Síntesis de los derivados esterificados (6b-e y 7a-e)

A partir del derivado **5** se esterificó el alcohol de C-3 usando ácidos alifáticos y alicíclicos mediante la reacción de Steglich.⁶⁵ El primer paso es la formación de un intermediario *O*-acilisourea a partir de DCC que le ofrece una reactividad similar a un anhídrido, posteriormente la DMAP al ser más nucleofílica que el alcohol reacciona con la *O*-acilisourea generando una amida reactiva o “éster activado” éste intermediario no puede producir productos secundarios pero reacciona rápidamente con alcoholes, la DMAP reacciona como un agente de transferencia de acilo y la posterior reacción con el alcohol da como resultado el éster (Esquema 5.6). Estas reacciones se obtuvieron con rendimientos que van del 61 al 77%



Esquema 5.6 Mecanismo de reacción para la formación de ésteres en C-3

La banda del alcohol en el espectro de IR desapareció y en su lugar se presentó una banda entre $1717\text{-}1738\text{ cm}^{-1}$ equivalente al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ del carbonilo del éster. En el

espectro de absorción en el ultra violeta todos los derivados exhiben una banda de máxima absorción a 236 nm correspondiente a los dos sistemas de carbonilos conjugados tanto en posición C-6 como en C-20. El protón de C-3 se desplaza a campo bajo y se muestra como un multiplete a 5.3 ppm. En el espectro de RMN de C^{13} se observa el desplazamiento del carbonilo del éster entre 170 y 176 ppm. Con estos datos se comprueba la obtención de los compuestos planeados.

En las Tablas 5.2 y 5.4 se encuentran los valores de desplazamiento de los protones y carbonos de las posiciones más representativas de los derivados **6a-e** y **7a-e**, así mismo en las Tablas 5.1 y 5.3 se encuentra el valor de m/z para el ión $[M+H]^+$ de cada compuesto final de estas series así como el rendimiento global de cada compuesto el cual oscila entre 50 y 27%.

Tabla 5.1 Punto de fusión, rendimiento global, bandas en los espectros de UV e IR así como el valor de m/z del ión $[M+H]^+$ de los compuestos **6a-e**

COMP.	PF (°C)	%R global	UV (nm)	IR (cm ⁻¹)	$[M+H]^+$
6a	191-193	50	236	1733, 1680, 1657	371
6b	196-198	33	236	1738, 1689, 1657	385
6c	142-144	32	236	1732, 1688, 1656	399
6d	125-127	31	236	1735, 1688, 1656	413
6e	105-106	34	236	1726, 1688, 1664	427

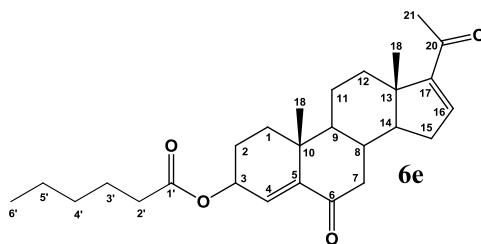


Tabla 5.2 Desplazamientos químicos en los espectro de RMN de carbono y de protón para los compuestos **6a-e**

No	6a		6b		6c		6d		6e	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
3	69.2	5.3m	69.0	5.3m	68.9	5.3m	68.9	5.3m	68.9	5.3m
4	129.0	6.1s	129.3	6.0s	129.2	6.0s	129.3	6.0s	129.2	6.0s
5	147.9	--	147.8	--	147.7	--	147.8	--	147.7	--
6	201.8	--	201.7	--	201.7	--	201.7	--	201.7	--
16	143.8	6.7s	143.7	6.7s	143.7	6.7s	143.7	6.7s	143.7	6.7s
17	154.8	--	154.9	--	154.8	--	154.9	--	154.8	--
20	196.6	--	196.5	--	196.5	--	196.5	--	196.5	--
21	27.1	2.2s	27.2	2.2s	27.0	2.2s	27.0	2.2s	27.0	2.2m
1'	170.7	--	174.0	--	173.2	--	173.5	--	173.4	--
Metilo del éster	21.1	2.0s	9.0	1.1m	13.6	0.9m	13.7	0.9m	13.8	0.9m

Tabla 5.3 Punto de fusión, rendimiento global, bandas en los espectros de UV e IR así como el valor de m/z del ión $[M+H]^+$ de los compuestos **7a-e**

COMP.	PF (°C)	%R global	UV (nm)	IR (cm ⁻¹)	$[M+H]^+$
7a	203-205	29	236	1724, 1692, 1660	397
7b	149-150	30	236	1725, 1691, 1663	411
7c	164-166	31	236	1717, 1690, 1658	425
7d	160-161	32	236	1727, 1690, 1667	439
7e	137-134	27	233	1727, 1693, 1652	453

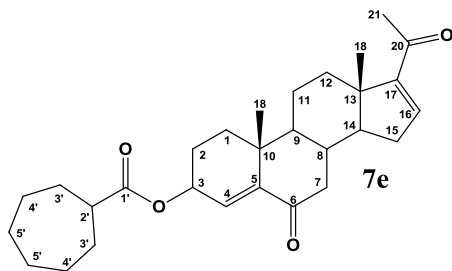
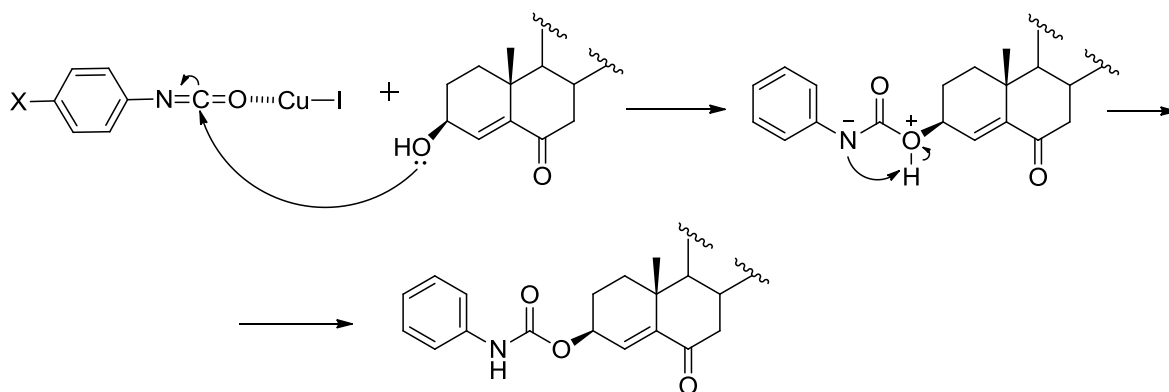


Tabla 5.4 Desplazamientos químicos en los espectro de RMN de carbono y de protón para los compuestos **7a-7e**

No.	7a		7b		7c		7d		7e	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
3	69.1	5.3m	68.9	5.3m	68.9	5.3m	68.6	5.3m	68.7	5.3m
4	129.3	6.1s	129.3	6.0s	129.5	6.0s	129.5	6.0s	129.6	6.0s
5	147.7	--	147.7	--	147.7	--	147.3	--	147.7	--
6	201.8	--	201.8	--	201.8	--	201.4	--	201.7	--
16	143.8	6.7s	143.7	6.7s	143.8	6.7s	147.3	6.7s	147.7	6.7s
17	154.8	--	154.9	--	154.9	--	154.8	--	154.3	--
20	196.6	--	196.5	--	196.6	--	196.5	--	196.5	--
21	27.1	2.2s	27.1	2.2s	27.1	2.2s	27.0	2.1s	28.0	2.2s
1'	174.5	--	175.1	--	176.4	--	175.6	--	176.6	--
2'	13.0	1.6m	38.1	2.6m	43.9	2.4m	43.2	2.2m	49.8	2.4m

5.1.1.6 Síntesis de los derivados carbamatos (**8a-e**)

Los carbamatos **8a-e** se sintetizaron a partir de los isocianatos aromáticos correspondientes y del alcohol **5**, en presencia de CuI como catalizador. Durante la reacción, el CuI se coordina con el oxígeno del isocianato atrayendo la densidad electrónica haciéndolo más electrofílico frente al ataque del alcohol (Esquema 5.7). Estos compuestos se obtuvieron con rendimientos que van del 9 al 32%, los bajos rendimientos se atribuyen a una impureza que se forma durante la reacción, en cromatografía de capa fina se observa la total conversión del compuesto **5**, sin embargo la impureza se presenta con el mismo valor de r.f. que el producto y solo revela con luz UV, cuando se realiza la separación por columna cromatográfica un bajo porcentaje de compuesto se obtiene puro, el resto se encuentra como mezcla con dicha impureza.



Esquema 5.7 Mecanismo de reacción para la formación de carbamatos en C-3

La síntesis de los carbamatos se constata con la desaparición de la banda del alcohol en el espectro de IR, así mismo se observa una banda entre 3327 y 3365 cm^{-1} perteneciente al estiramiento N-H, entre 1721 y 1727 se encuentra la señal del estiramiento C=O del carbonilo del carbamato. El protón unido al nitrógeno solo se observa en el espectro de RMN de ^1H del compuesto **8a** a 6.9 ppm como una señal simple, esto es debido a que en los demás espectros se encuentra dentro de la zona de los protones aromáticos y al mezclarse con estas señales se observa solo una señal múltiple. En el espectro de RMN de ^{13}C se aprecia una señal entre 152 y 156 ppm correspondiente al carbonilo del carbamato. En la Tabla 5.5 se encuentran los valores de $[\text{M}+\text{H}]^+$ para los derivados **8a-e**, estos derivados se obtuvieron con rendimientos globales que van del 4 al 14%.

Tabla 5.5 Punto de fusión, rendimiento global, bandas en los espectros de UV e IR así como el valor de m/z del ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ de los compuestos **8a-e**

COMP.	PF (°C)	%R global	UV (nm)	IR (cm^{-1})	$[\text{M}+\text{H}]^+$
8a	252-254	14	237	3331, 1721, 1687, 1662	448
8b	224-227	13	237	3335, 1724, 1685, 1662	466
8c	221-223	10	237	3365, 1726, 1683, 1662	482
8d	201-203	4	237	3294, 1727, 1663	526
8e	197-199	4	237	3327, 1726, 1695, 1663	574

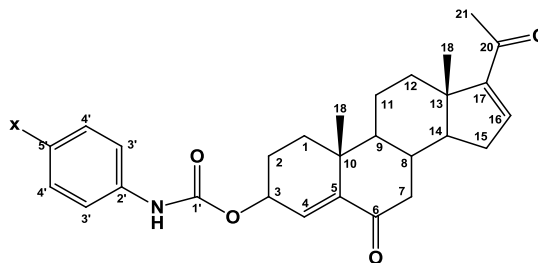


Tabla 5.6 Desplazamientos químicos en los espectro de RMN de carbono y de protón para los compuestos **8a-e**

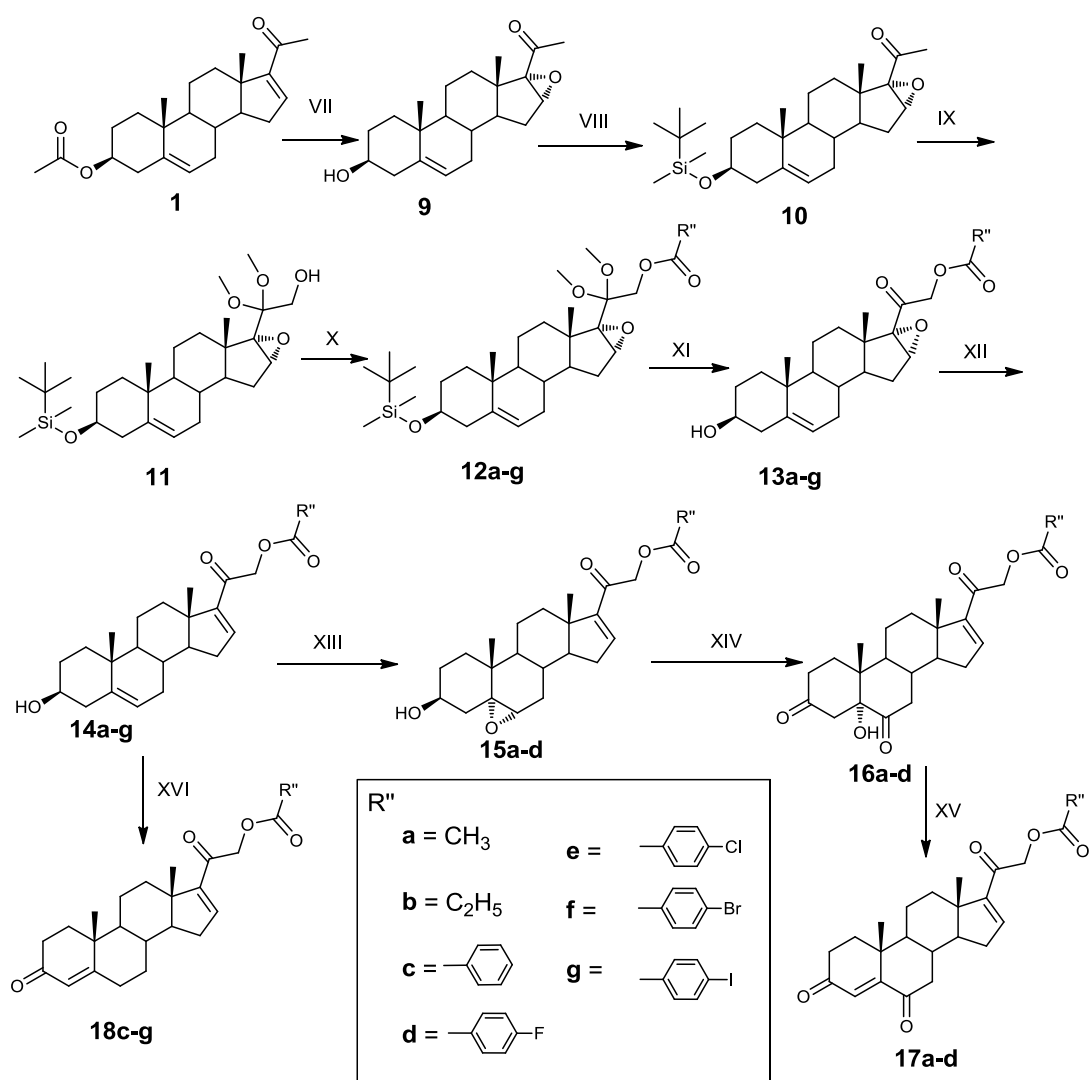
No	8a		8b		8c		8d		8e	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
3	70.01	5.35(m)	74.3	5.26(m)	70.2	5.33(m)	75.3	5.3(m)	72.1	5.3 (m)
4	129.1	6.18(s)	128.5	6.03(s)	128.9	6.16(s)	127.0	5.98(s)	128.1	5.7 (s)
5	147.9	-	150.2	-	148.0	-	152.7	-	148.6	-
6	201.9	-	206.0	-	201.8	-	212.6	-	202.0	-
16	143.8	6.71(s)	141.1	6.92(s)	143.8	6.71(s)	144.1	6.03(s)	144.2	6.1 (s)
17	154.8	-	156.7	-	154.9	-	153.2	-	154.0	-
20	196.6	-	201.3	-	196.6	-	205.9	-	196.2	-
1'	152.9	-	152.8	-	152.9	-	156.7	-	152.1	-
2'	137.6	-	133.6	-	136.3	-	139.1	-	139.3	-
3'	118.7	7.31(m)	120.3	7.49(m)	119.9	7.33(m)	120.0	7.55(m)	119.5	7.5 (m)
4'	129.0	7.37(m)	120.5	7.15(m)	129.0	7.27(m)	133.6	7.47(m)	134.5	7.3 (m)
5'	129.0	7.07(m)	163.6	-	135.0	-	121.0	-	129.1	-
NH	-	6.93(s)	-	-	-	-	-	-	-	-

NOTA: Para **8b** y **8d** se usó DMSO deuterado, para los demás se utilizó CDCl₃.

5.1.2 Síntesis de ésteres en C-21

En el Esquema 5.8 se describe la síntesis para la segunda serie de compuestos en la cual se usó la misma materia prima que en la ruta 1 (Esquema 5.1), la doble ligadura conjugada de **1** se epóxido con peróxido de hidrógeno en medio básico para obtener el compuesto **9**. Se protegió el hidroxilo de **9** con cloruro de *tert*-butildimetilsililo (**10**) para posteriormente realizar la oxidación de C-21 con diacetoxiyodobenceno bajo condiciones básicas (**11**). El alcohol de C-21 se esterificó con los correspondientes ácidos, en presencia de DCC y DMAP para formar los compuestos **12a-g**. Se desprotegieron las posiciones de C-3 y C-20 bajo condiciones ácidas para regenerar el hidroxilo en C-3 y la cetona en C-20 (**13a-g**). En el siguiente paso de síntesis se regeneró la doble ligadura de C-16 usando cloruro de cromo (II) y ácido acético (**14a-g**). Los compuestos **14a-d** se epoxidaron en la doble ligadura de C-5 con ácido *m*-cloroperoxibenzoico para formar la serie **15a-d**. Estos

epóxidos (**15a-d**) se oxidaron con CrO_3 en acetona para obtener los compuestos derivados 5-hidroxi-3,6-diona (**16a-d**). El siguiente paso fue la deshidratación del alcohol terciario en C-5 para obtener los productos finales **17a-d**. Por otro lado reaccionando el alcohol de la serie de compuestos **14c-g** mediante una reacción de Oppenauer se generó un carbonilo conjugado en C-3 (compuestos finales **18c-g**).



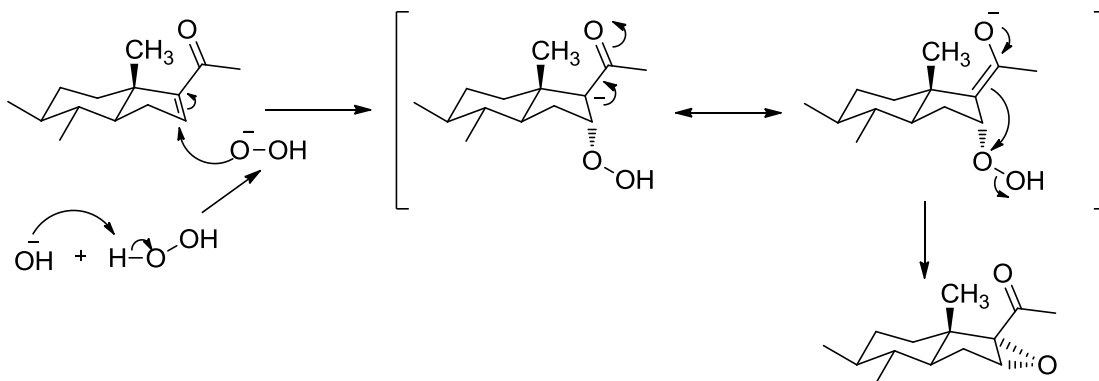
VII: H_2O_2 , NaOH 4N, MeOH **VIII:** TBDMS, imidazol, DMF **IX:** $\text{C}_6\text{H}_5\text{I}(\text{OAc})_2$, NaOH, MeOH
X: ácido carboxílico correspondiente, DCC, DMAP, CH_2Cl_2 **XI:** HCl, acetona **XII:** CrCl_2 , ácido acético, acetona **XIII:** *m*-CPBA, CH_2Cl_2 **XIV:** CrO_3 , H_2O , acetona **XV:** SOCl_2 , Py, CH_2Cl_2
XVI: $\text{Al}(\text{i-PrO})_3$, *N*-metil-4-piperidona, tolueno.

Esquema 5.8 Procedimiento sintético para la obtención de ésteres en C-21 con carbonilos conjugados en C-3, C-6 y C-20

5.1.2.1 Síntesis de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (9)

Como ya se mencionó en los antecedentes, se tuvo que diseñar una síntesis para la obtención de ésteres en C-21 partiendo del acetato de 16-deshidroprenenolona, lo primero que se propuso fue la funcionalización de C-21 usando la α halogenación de carbonilos, el problema con esta reacción fue que se halogenaba la doble ligadura de C-5 y no se obtenía el compuesto deseado. Después siguiendo la metodología publicada por Kamernitzky y colaboradores para la oxidación de C-21 en esteroides,⁶⁶ en la cual se obtiene directamente un alcohol en esta posición, se pudo comenzar de esta reacción para la obtención de los compuestos planeados. Primero, se intentó la metodología comenzando con la materia prima **1** pero la reacción no procedió, después se corrobora que es necesario el epóxido de 16,17 para lograr que el protón de C-21 sea lo suficientemente ácido para ser extraído por la base.

La síntesis del epóxido **9** a diferencia del epóxido **2** se realiza empleando como reactivos peróxido de hidrógeno e hidróxido de sodio como base. La diferencia radica en que la epoxidación del compuesto **2** se hace sobre una doble ligadura nucleofílica por lo que para este tipo de sistemas se usan más comúnmente perácidos, mientras que la doble ligadura conjugada con un carbonilo es electrofílica y se requiere un reactivo con un oxígeno nucleofílico, en este caso el anión hidroperóxido (HOO⁻). El mecanismo de reacción comienza con una adición 1,4 tipo Michael sobre el carbono β del sistema conjugado (C-16) por la cara α del esteroide, los electrones se estabilizan por resonancia entre el oxígeno del carbonilo y el carbono α , y finalmente mediante un ataque nucleofílico del enolato sobre el oxígeno del hidroperóxido se forma el compuesto **9**. El compuesto se obtiene con una estereoquímica 16 α ,17 α debido a que el metilo angular de C-18 provoca impedimento estérico sobre la cara β . Por otro lado debido a las condiciones básicas, el alcohol de C-3 se desprotegió.

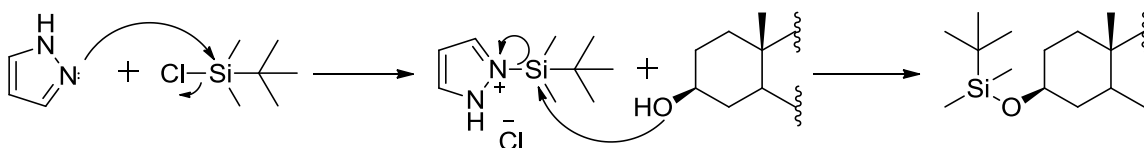


Esquema 5.9 Mecanismo de reacción para la formación del epóxido **9**

La estructura del compuesto **9** se confirmó con la banda a 3454 cm^{-1} del alcohol de C-3, y una banda a 1042 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C-O-C en el espectro de IR. En el espectro de RMN de ^1H la señal del protón unido a C-16 se desplazó a campo alto en 2.3 ppm al transformarse de protón vinílico a ser protegido por la presencia del oxígeno, el protón del alcohol se revela a 3.6 ppm como una señal simple. En el espectro de RMN de ^{13}C se observan las señales de C-3 a 70 ppm, a 60 ppm la de C-16 ambas en la región correspondiente a carbonos unidos directamente a oxígeno. En el espectro de masas el ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ aparece a m/z 331.

5.1.2.2 Síntesis de la $16\alpha,17\alpha$ -epoxi- 3β -*tert*-butildimetilsililoxipregn-5-en-20-ona (10)

Antes de obtener el hidroxilo en C-21 se tuvo que proteger el alcohol de C-3 para que la esterificación se llevara a cabo únicamente en el alcohol de C-21. La protección se hizo con cloruro de *tert*-butildimetilsililo y como base se usó imidazol. Corey⁶⁷ asumió que el mecanismo que sigue esta reacción procede formando *N-tert*-butildimetilsililimidazol siendo éste un agente muy reactivo, así mismo P. Patschinski y H. Zipse⁶⁸ demostraron que la DMF además de funcionar como disolvente cataliza la reacción.

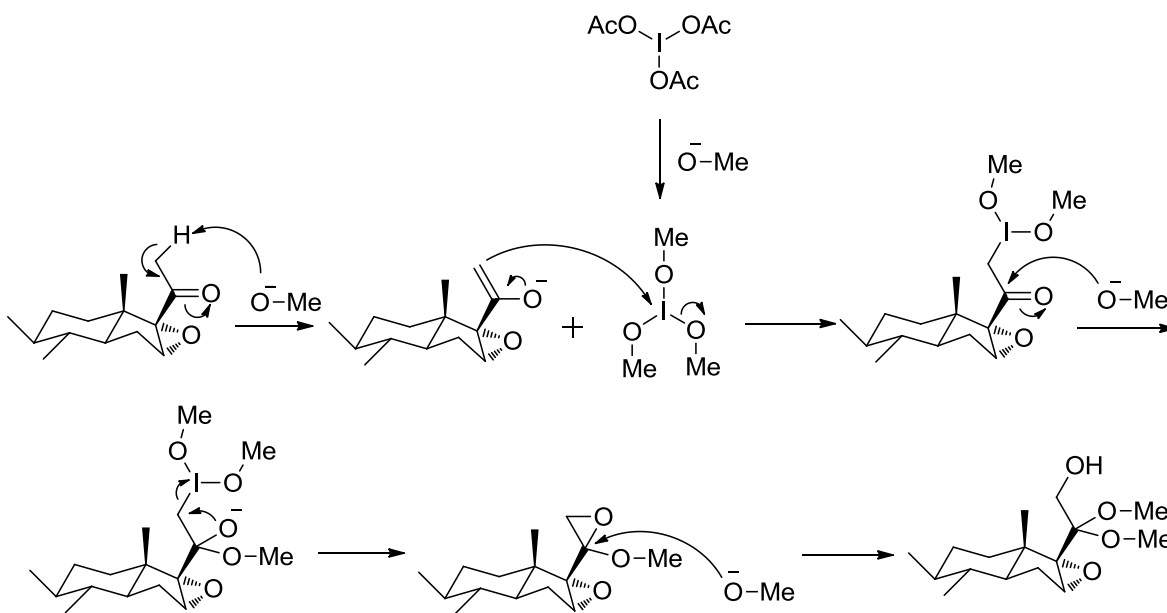


Esquema 5.10 Mecanismo de reacción para la protección del alcohol de C-3

La protección del alcohol se corrobora con la desaparición de la señal del alcohol en el espectro de IR. En el espectro de RMN de ^1H se observa la señal de los protones metílicos del grupo protector a 0.58 y 0.89 ppm, y los carbonos de este grupo se observan en el espectro de ^{13}C a 25.9 y 31.4 ppm. En el espectro de masas el ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ se encuentra a m/z 445.

5.1.2.3 Síntesis de la 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20-dimetoxi-3 β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-eno (11)

En la síntesis de oxidación de C-21 se usó diacetoxiyodobenceno (DIB), los compuestos derivados de yodo (III) hipervalente como el DIB se usan comúnmente como agentes en oxidaciones selectivas, sin embargo su función no es de oxidante sino que son electrófilos fuertes y en pasos posteriores buenos grupos salientes como se representa en el mecanismo del Esquema 5.11. La ventaja de estas reacciones es que se realiza en condiciones suaves y amigables al medio ambiente.⁶⁹ El mecanismo propuesto comienza con la desprotonación de C-21 por la base, seguido de un ataque nucleofílico por parte del enolato al yodo hipervalente altamente electrofílico. El medio básico con el disolvente forman metoxilos que atacan el carbonilo de C-20 produciendo un anión hemiacetal; el oxígeno cargado negativamente lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el carbono C-21 generando un oxirano y yodobenceno como grupo saliente. Finalmente, el ataque de un metoxilo al carbono de C-20 produce la apertura del epóxido formando un α -hidroxicetal.⁷⁰

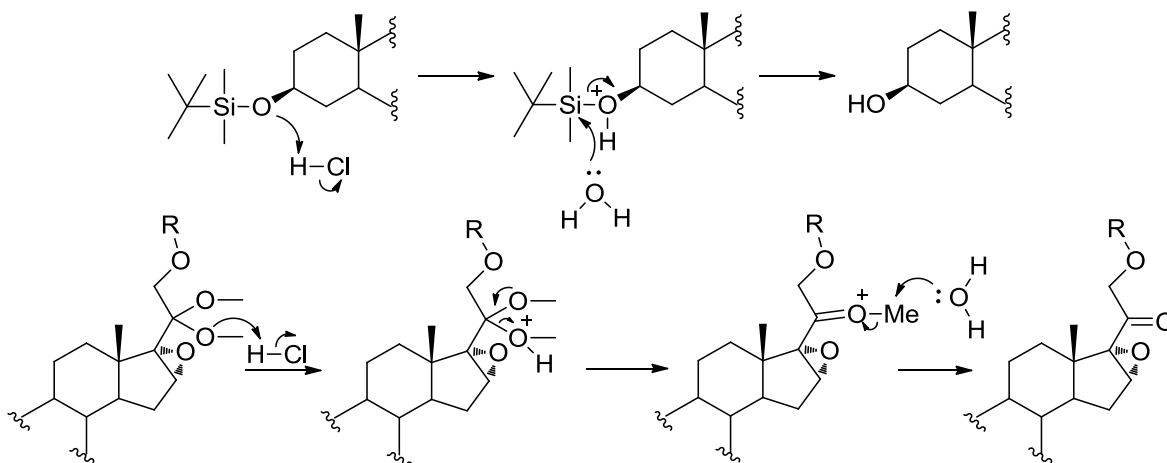


Esquema 5.11 Mecanismo de reacción para la formación del intermediario **11**

El alcohol formado en C-21 así como el cetal de C-21 se comprobaron por la banda de 3596 cm^{-1} del hidroxilo y la presencia de una banda intensa a 1077 cm^{-1} equivalente al estiramiento C-O. El espectro de RMN de ^1H exhibió una señal simple a 3.46 ppm del alcohol, una señal múltiple en 3.2 ppm que integra para 6 protones del cetal. En el espectro de RMN ^{13}C se observa el desplazamiento del carbono C-20 a campo bajo en 101 ppm por la unión con los metoxilos. En el espectro de masas el ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ se encuentra a m/z 507.

5.1.2.4 Esterificación en el alcohol de C-21 (13a-g)

El mecanismo para esta reacción es el mismo que fue descrito en la sección 5.1.1.5 y el cual se muestra en el Esquema 5.6, el crudo de reacción no se purificó ya que el tratamiento de la reacción conlleva lavados con solución acuosa ácida y después de este paso se observa la formación de nuevos compuestos (en cromatografía de capa fina). Por lo que se decidió tomar el crudo de reacción para el siguiente paso que es la desprotección del alcohol de C-3 y el cetal de C-20 en medio ácido (Esquema 5.12).



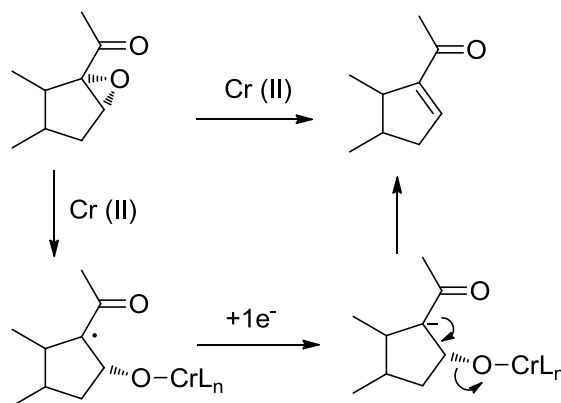
Esquema 5.12 Mecanismo de reacción para la formación de los compuestos **13a-g**

La obtención de la serie de compuestos **13a-g** se comprobó en IR con una banda ancha entre 3320 y 3566 cm^{-1} del estiramiento O-H del hidroxilo y una banda entre 1721 y 1754 cm^{-1} del estiramiento C=O del carbonilo del éster. En RMN de ^1H se presenta una señal entre 3.7 y 3.8 ppm del protón del alcohol, los protones de C-21 se encuentran como dobletes a un desplazamiento entre 4.6 y 4.9 ppm con una $J=16$ Hz, al parecer lo voluminoso del éster no permite el libre giro de éste provocando que los protones no sean equivalentes. Se observan así mismo los protones aromáticos de los ésteres benzoicos y los protones de los metilos y metilenos de los ésteres alifáticos. La espectroscopía de RMN de ^{13}C confirmó la formación del éster mediante la presencia de una señal entre 165-170 ppm y las respectivas señales de los carbonos aromáticos entre 120-167 ppm.

5.1.2.3 Síntesis de los derivados 4,16-diénicos (**14a-g**)

La función del epóxido como grupo electroattractor en la reacción clave de esta síntesis se cumplió de forma exitosa, para eliminarlo y regenerar el carbonilo α,β -insaturado se probó primero usando hidruro de litio y aluminio; sin embargo, esta reacción generaba un mezcla compleja de productos. Después se probó una reacción publicada por Cole en 1954⁷¹ en la cual se usan sales de cromo para reducir el epóxido la cual dio muy

buenos resultados. En 1968 Kochi propuso un mecanismo vía radicales libres⁷²⁻⁷³ para esta reacción (Esquema 5.13).



Esquema 5.13 Mecanismo de reducción de epóxido con Cr (II)

La regeneración del carbonilo α,β -insaturado de C-20 se probó mediante la banda de máxima absorción en el espectro de UV la cual se encuentra entre 233 y 242 nm para los compuestos de la toda la serie. En el espectro de IR se observan entre 1670 y 1677 cm^{-1} las bandas correspondientes al estiramiento C=O del carbonilo conjugado. El protón vinílico de C-16 se expresa entre 6.7 y 6.8 ppm en el espectro de RMN de ^1H . El espectro de RMN de ^{13}C presenta las señales del carbono vinílico C-16 entre 143 y 144 ppm, las de C-17 entre 151 y 152 ppm y las del carbonilo en 190 ppm.

5.1.2.5 Síntesis de epóxidos 15a-d

Una vez obtenido el éster en C-21 y regenerado el carbonilo conjugado, se procedió a formar el sistema 4-en-3,6-diona de los anillos A y B del esqueleto esteroideal. Para este fin se epóxido la doble ligadura Δ^5 usando ácido *m*-cloroperoxibenzoico y el mismo procedimiento descrito en la sección 5.1.1.1. El mecanismo de esta reacción se encuentra representado en el Esquema 5.2.

La formación de la serie **15a-d** se comprobó por espectrometría de UV con la banda de máxima absorción entre 233-242 nm debida a la presencia del carbonilo α,β -insaturado. En el espectro de IR se observa una banda entre 1057-1087 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C-O-C del epóxido formado. El espectro de RMN de ^1H exhibe una señal

doble entre 2.8 y 2.9 ppm del protón de C-6 con una $J= 4$ Hz. En el espectro de RMN de ^{13}C se observan las señales de C-5 entre 65 y 66 ppm y la de C-6 entre 58 y 59 ppm.

5.1.2.6 Síntesis de los derivados 5 α -hidroxi-3,6-dicetónicos 16a-d

Para la síntesis de estos derivados se siguió la reacción descrita en la sección 5.1.1.2 y el mecanismo del Esquema 5.3. La única diferencia fue que para esta reacción se necesitó el doble de equivalentes de Cr (VI) por los dos hidroxilos que se sometieron a la oxidación.

Los compuestos oxidados de la serie **16a-d** muestran una banda común entre 3324 y 3346 cm^{-1} perteneciente al estiramiento O-H del hidroxilo de C-5. El espectro de RMN de ^1H exhibe una señal simple entre 3.7 y 3.8 ppm del protón del alcohol, así mismo la señal de los protones unidos a C-3 y C-6 desaparecen. En el espectro de RMN de ^{13}C se comprueba la obtención de estos compuestos con las señales de los carbonilos entre 209 y 210 ppm para los carbonilos C-3 y C-6, el carbono terciario C-5 que soporta el grupo $-\text{OH}$ se encuentra desplazado entre 81 y 82 ppm.

5.1.2.7 Síntesis de las dicetonas conjugadas 17a-d

Los compuestos finales **17a-d** se obtuvieron por la eliminación del alcohol con cloruro de tionilo y piridina como se describe en la sección 5.1.1.3.

La espectroscopía demuestra que se consiguió la síntesis de estos compuestos por la desaparición de la banda ancha del alcohol en el espectro IR. En el espectro de UV la banda de absorción de los dos carbonilos conjugados aparece entre 242 y 246 nm. En el espectro de RMN de ^1H se presenta una señal simple del protón vinílico de C-4 entre 6.1 y 6.2 ppm y en el espectro de RMN de ^{13}C se presenta la señal de la doble ligadura entre 124 y 125 ppm para el C-4 y entre 159 y 160 ppm para C-5. En las Tablas 5.7 se muestran los rendimientos globales de esta serie de compuestos que están entre el 10 y 16%, así como los valores de $[\text{M}+\text{H}]^+$ de cada uno de los derivados obtenidos, en la Tabla 5.8 se resumen las señales más representativas de cada compuesto final.

Tabla 5.7 Punto de fusión, rendimiento global, bandas en los espectros de UV e IR así como el valor de m/z del ión $[M+H]^+$ de los compuestos **17a-d**

COMP.	PF (°C)	%R	UV (nm)	IR (cm ⁻¹)	$[M+H]^+$
Global					
17a	215-217	16	246	2942, 1745, 1677	385
17b	212-215	11	242	2940, 1743, 1671	399
17c	165-167	13	243	2930, 1721, 1683	447
17d	182-185	10	244	2942, 1722, 1681	465

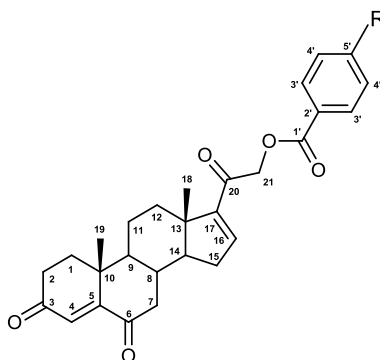


Tabla 5.8 Desplazamientos químicos en los espectro de RMN de carbono y de protón para los compuestos **17a-d**

No	17a		17b		17c		17d	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
3	199.18	--	199.1	--	198.3	--	199.2	--
4	125.18	6.2 (s)	125.5	6.2 (s)	124.8	6.13 (s)	125.8	6.2 (s)
5	160.41	--	160.2	--	159.51	--	160.4	--
6	201.2	--	201.0	--	200.4	--	201.6	--
16	153.16	6.76 (s)	142.1	6.67 (s)	142.3	6.78 (s)	143.3	6.8 (s)
17	151.37	--	150.6	--	150.3	--	151.4	--
20	190.3	--	189.7	--	189.3	--	190.1	--
21	65.57	4.9 (d) ^a 5.3 (d)	64.3	4.8 (d) ^a 5.2 (d)	67.14	5.08 (d) ^a 5.2 (d)	66.0	5.14 (d) ^a 5.26 (d)
1'	170.34	--	172.8	--	165.0	--	165.0	--
2'	-	-	-	-	129.8	--	127.6	--
3'	-	-	-	-	128.89	8.05 (s)	132.4	8.11 (s)
4'	-	-	-	-	127.43	7.52 (m)	115.7	7.13 (s)
5'	-	-	-	-	132.3	8.05 (s)	167.0	--
Metilo del éster	20.6	2.19 (s)	26.2	1.12 (m)	-	-	-	-

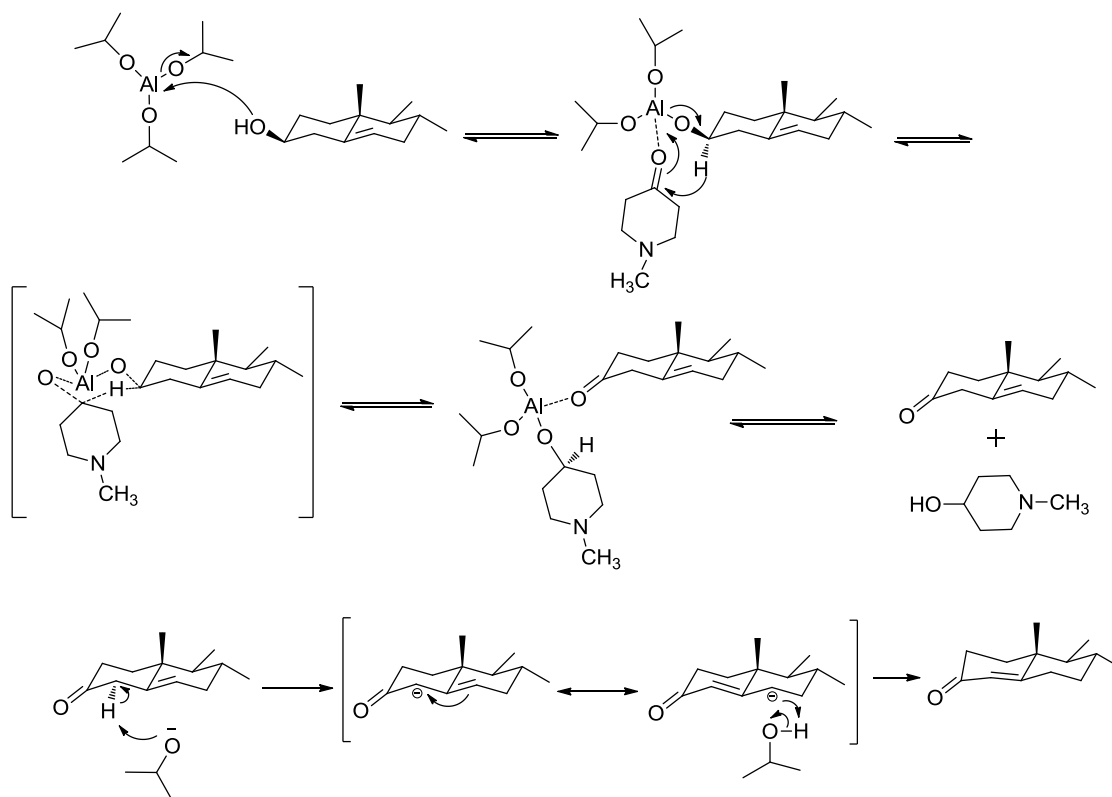
NOTA: ^a $J=16$ Hz

5.1.2.8 Síntesis de las cetonas conjugadas 18c-g

La reacción de Oppenauer a partir de los derivados **14c-g** (compuestos que tienen un alcohol en C-3) completó la síntesis de la serie **18c-g**. Esta reacción ha sido ampliamente usada en la química de esteroides debido a su selectividad en la oxidación de alcoholes secundarios y los reactivos son más amigables al medio ambiente en comparación con los oxidantes a base de cromo. Esta reacción es muy útil ya que las condiciones de reacción permiten la migración del doble enlace Δ^5 para formar un carbonilo conjugado. Como reactivos se usó *N*-metil-4-piperidona siendo el aceptor de hidruro e isopropóxido de aluminio como catalizador.

Esta reacción se estandarizó anteriormente en nuestro laboratorio⁷⁰⁻⁷⁴ y durante las pruebas se determinó que la *N*-metil-4-piperidona funciona mucho mejor que otras cetonas como son la ciclohexanona y la 1,1,1-trifluoroacetona. Otro factor crucial del procedimiento experimental es mantener las condiciones anhidras antes de adicionar el isopropóxido de aluminio porque en presencia de humedad se hidroliza, con una destilación azeotrópica se logran estas condiciones.

El mecanismo de reacción (Figura 5.12) comienza con una ataque nucleofílico del alcohol hacia el catalizador formando un éter de aluminio e isopropanol como grupo saliente. El aluminio cataliza la reacción de transferencia de electrones entre la cetona que se reduce y el alcohol que se oxida mediante un estado de transición cíclico de seis miembros. La cetona de la *N*-metil-4-piperidona se coordina con el aluminio y es activada por la transferencia de un hidruro del alcóxido mientras se forma un doble enlace en C-3. La migración del doble enlace de C-5 es debido al medio básico de reacción, favoreciendo la formación de un carbanión en C-4 estabilizado por dos sistemas π vecinos, el carbonilo de C-3 y el doble enlace de C-5. Finalmente se produce el movimiento de electrones desde el enolato y la protonación del carbanión de C-6, la migración del enlace se favorece debido a la alta estabilidad del sistema conjugado del carbonilo α,β -insaturado.⁷⁵



Esquema 5.14 Mecanismo de la reacción de Oppenauer

Los compuestos de la serie **18c-g** al no presentar la banda de estiramiento O-H en los espectros de IR se confirma la formación del carbonilo en C-3, la banda que se presenta entre 1672 y 1678 cm^{-1} prueba la síntesis de los carbonilos conjugados tanto de C-20 como de C-3. El protón vinílico de C-4 se revela en el espectro de RMN de ^1H entre 5.6 y 5.7 ppm, la señal del alcohol, la del protón unido a C-3 y de los protones de C-4 no se presentan. En el espectro de RMN de ^{13}C el carbonilo de C-3 se exhibe entre 198 y 199 ppm y los carbonos C-4 y C-5 de la doble ligadura formada se encuentran entre 122-124 ppm y 169-170 ppm respectivamente. La Tabla 5.9 contiene los rendimientos globales que se obtuvieron para cada compuesto de la serie, estos van del 14 al 16%, los iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ también se encuentran en esta tabla. En la Tabla 5.10 se presentan resumidas las señales más representativas de espectrometría de RMN de ^{13}C y ^1H .

Tabla 5.9 Punto de fusión, rendimiento global, bandas en los espectros de UV e IR así como el valor de m/z del ión $[M+H]^+$ de los compuestos **18c-g**

COMP.	PF (°C)	%R	UV (nm)	IR (cm ⁻¹)	$[M+H]^+$
Global					
18c	192-194	16	236	2953, 1727, 1672	433
18d	148-150	18	237	2929, 1728, 1678	451
18e	157-159	16	241	2951, 1727, 1676	467
18f	161-163	16	239	2929, 1727, 1677	511
18g	186-188	14	242	2932, 1729, 1675	559

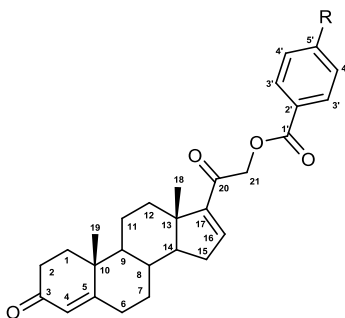


Tabla 5.10 Desplazamientos químicos en los espectro de RMN de carbono y de protón para los compuestos **18c-g**

No	18c		18d		18e		18f		18g	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
3	199.39	--	198.51	--	199.1	--	199.1	--	199.0	--
4	124.03	5.73 (s)	122.78	5.67 (s)	123.04	5.67 (s)	124.1	5.67 (s)	124.1	5.66 (s)
5	170.65	--	170.1	--	170.6	--	170.3	--	169.9	--
16	143.74	6.83 (s)	143.08	6.13 (s)	143.22	6.76 (s)	144.3	6.77 (s)	144.0	6.74 (s)
17	151.35	--	154.14	--	150.8	--	153.9	--	154.1	--
20	190.38	--	195.69	--	196.3	--	196.4	--	197.2	--
21	66.03	5.11 (d) ^a 5.27 (d) ^a	67.15	5.15 (d) ^a 5.3 (d) ^a	67.16	5.04 (d) ^a 5.2 (d) ^a	67.5	5.1 (d) ^a 5.25 (d) ^a	67.0	5.03 (d) ^a 5.19 (d) ^a
1'	166.01	--	166.7	--	169.6	--	166.3	--	167.3	--
2'	129.89	--	127.79	--	127.77	--	129.0	--	129.3	--
3'	129.8	8.09 (t) ^b	131.45	8.1 (m)	130.29	7.98 (d) ^b	132.4	7.7 (d) ^b	130.9	7.88 (d) ^b
4'	128.38	7.4 (t) ^b	114.67	7.3 (m)	129.85	7.36 (d) ^b	130.1	7.6 (d) ^b	137.5	7.8 (d) ^b
5'	133.26	7.57 (t) ^b	169.91	--	142.9	--	127.1	--	99.5	--

NOTA: ^a $J=16$ Hz, ^b $J=8$ Hz

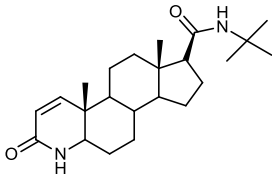
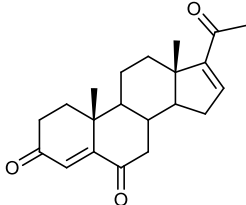
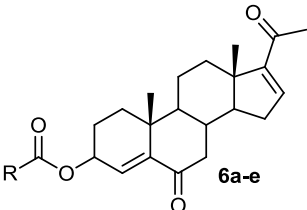
5.2 Discusión de resultados parte biológica

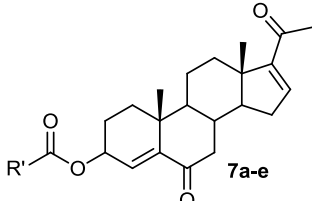
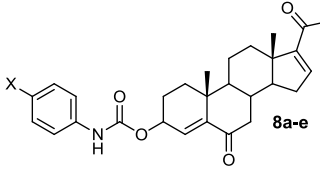
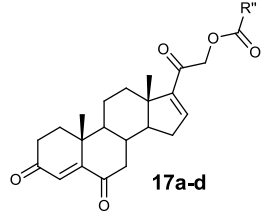


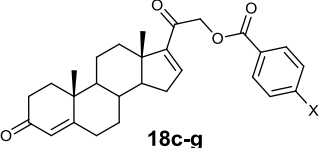
Parte de la hipótesis de esta tesis, fue que los ésteres o carbamatos le brindarían liposolubilidad a las moléculas sintetizadas, dentro de los alcances de este trabajo, no se pudieron realizar pruebas biológicas para probar esta teoría; sin embargo, se calcularon los coeficientes de partición teóricos expresados como Log P de los compuestos finales para compararlos con los de la finasterida y con los del compuesto pregna-4,6-dien-4,6,20-triona (Tabla 5.11).

Los resultados muestran que el compuesto pregna-4,6-dien-4,6,20-triona es mucho menos liposoluble que la finasterida lo que en cierta medida prueba la hipótesis que se tuvo acerca de la causa de la baja actividad *in vivo* ya que asertivamente se adjudicó el resultado biológico a la falta de esta propiedad en el compuesto.

A su vez comparando los resultados de las series de compuestos sintetizados contra las referencias se prueba la teoría de que efectivamente los grupos funcionales ésteres o carbamatos aumentan la liposolubilidad de las moléculas.

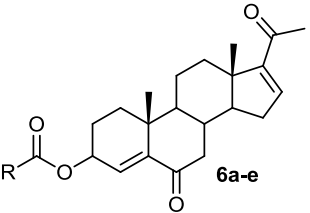
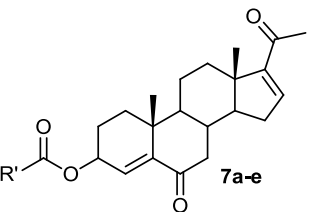
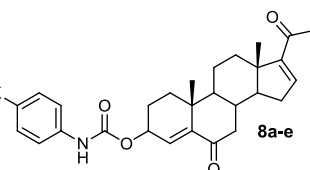
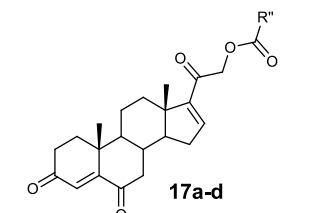


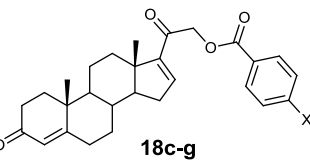
Tabla 5.11 Valores de Log P de los compuestos finales

Estructura	Compuesto	Log P
	Finasterida	3.15
	Pregna-4,6-dien-4,6,20-triona	1.6
	6a (R= CH ₃)	2.19
	6b (R= C ₂ H ₅)	2.85
	6c (R= C ₃ H ₇)	3.26
	6d (R= C ₄ H ₉)	3.68
	6e (R= C ₅ H ₁₁)	4.1

	7a (R= C₃H₅)	2.92
	7b (R= C₄H₇)	3.33
	7c (R= C₅H₉)	3.75
	7d (R= C₆H₁₁)	4.17
	7e (R= C₇H₁₃)	4.58
	8a (X=H)	3.76
	8b (X=F)	3.92
	8c (X=Cl)	4.32
	8d(X=Br)	4.59
	8e (X=I)	5.12
	17a (R''= CH₃)	1.15
	17b (R''=C₂H₅)	1.8
	17c (R''= )	3.05
	17d (R''= )	3.2
	18c (X=H)	4.31
	18d (X=F)	4.47
	18e (X=Cl)	4.87
	18f (X=Br)	5.14
	18g (X=I)	5.67

Como parte del proyecto, se propuso hacer análisis primarios de los compuestos antiandrogénicos en tres líneas celulares de cáncer: PC-3 (próstata), MCF-7 (mama) y SKLU-1 (pulmón). Los resultados obtenidos se muestran como porcentajes de inhibición a una concentración de 50 μ M solubilizados en DMSO (Tabla 5.12).

Tabla 5.12 Pruebas primarias en líneas celulares de cáncer

Estructura	Compuesto (50 μ M)	PC-3	MCF-7	SKUL-1
Ketoconazol				
		88.48 \pm 3.9	95.16 \pm 4.8	73.39 \pm 1.6
	6a (R= CH₃)	78.1 \pm 3.3	50.6 \pm 3.4	87.14 \pm 5.1
	6b (R= C₂H₅)	59.7 \pm 2.4	39.5 \pm 2.5	71.5 \pm 1.9
	6c (R= C₃H₇)	82.7 \pm 4.9	66.5 \pm 3.0	98.4 \pm 1.5
	6d (R= C₄H₉)	NA	16.9 \pm 2.4	17.2 \pm 4.9
	6e (R= C₅H₁₁)	71.8 \pm 4.7	68.9 \pm 1.8	99.3 \pm 0.4
	7a (R= C₃H₅)	19.7 \pm 4.1	15.6 \pm 3.7	8.8 \pm 1.5
	7b (R= C₄H₇)	97.3 \pm 2.6	90.9 \pm 3.4	100
	7c (R= C₅H₉)	52.8 \pm 2.9	64.9 \pm 7.7	76.4 \pm 4.3
	7d (R= C₆H₁₁)	68.7 \pm 2.2	76.2 \pm 6.2	85.2 \pm 2
	7e (R= C₇H₁₃)	72.0 \pm 9.4	87.8 \pm 5.7	78.9 \pm 5.6
	8a (X=H)	4.5 \pm 2.0	34.7 \pm 6.2	27.3 \pm 2.3
	8b (X=F)	33.0 \pm 5.4	34.6 \pm 1.7	31.9 \pm 1.3
	8c (X=Cl)	63.4 \pm 10.9	13.7 \pm 5.3	19.5 \pm 4.7
	8d (X=Br)	26.9 \pm 2.4	14.0 \pm 2.5	15.6 \pm 9.6
	8e (X=I)	42.8 \pm 1.5	33.1 \pm 3.9	48.5 \pm 3.4
	17a (R''= CH₃)	49.8 \pm 2.9	75.3 \pm 2.5	94.2 \pm 0.6
	17b (R''=C₂H₅)	21.5 \pm 0.9	56.6 \pm 2.8	63.3 \pm 4.8
	17c (R''= )	57.5 \pm 3.4	40.2 \pm 3.7	67.7 \pm 4.8
	17d (R''= )	98.1 \pm 1.9	92.2 \pm 2.5	100
	18c (X=H)	19.0 \pm 1.8	25.9 \pm 3.6	27.6 \pm 3.6
	18d (X=F)	92.0 \pm 4.3	89.1 \pm 4.9	98.1 \pm 1.9
	18e (X=Cl)	55.9 \pm 3.0	43.9 \pm 5.8	63.7 \pm 1.9
	18f (X=Br)	50.0 \pm 7.0	65.7 \pm 6.1	51.8 \pm 7.1
	18g (X=I)	57.1 \pm 7.4	95.5 \pm 2.0	68.9 \pm 4.4

NA=No activo

Los compuestos con ésteres alifáticos lineales en C-3 (**6a-e**) mostraron una actividad biológica tipo zigzag en las tres líneas celulares que se probaron, aquellos con cadena lateral de carbono impar tienen una mayor actividad biológica (mayor porcentaje de inhibición) que los que presentan una cadena par, esta tendencia también se observa en los compuestos con este tipo de ésteres en C-21 (**17a** y **17b**). Se cree que la forma en la que se acomodan los compuestos en el sitio activo es la causa de esta actividad tan singular ya que

con el aumento del número de carbonos impares en la cadena también aumenta el porcentaje de inhibición del crecimiento celular.

Los compuestos con grupos carbamatos (**8a-e**) fueron los primeros que se sintetizaron y probaron, debido a su baja actividad biológica y a la dificultad de su síntesis se decidió no probarlos en la ruta 2 (Esquema 2). Así mismo, los ésteres cíclicos tampoco mostraron una actividad biológica significativa en los ensayos primarios, por lo que se tomó la misma decisión.

Para los dos ésteres aromáticos que se probaron en la ruta 2, en la que el compuesto contiene dos carbonilos conjugados en C-3 y C-6 (**17c** y **17d**), uno con un éster benzoico en C-21 sin sustitución y otro con un sustituyente flúor en posición *para*, se observó que el compuesto **17c** muestra una actividad baja en líneas celulares en comparación con el compuesto fluorado (**17d**), esto también se observa en los compuestos **18c** y **18d** que solo difieren de los anteriores en que no contienen el carbonilo de C-6. En las pruebas de inhibición de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 (Tabla 5.14), esta tendencia continúa, ya que el compuesto sin sustitución (**17c**) no muestra actividad mientras que el compuesto **17d** muestra una CI_{50} de 0.179 nM (Tabla 5.14). Este fenómeno podría deberse a la capacidad que tiene el flúor (enlazado covalentemente) de formar interacciones electrostáticas con ciertos grupos funcionales y de esta forma aumentar la afinidad de los compuestos organofluorados con en el sitio activo de la enzima.⁷⁶

Considerando que los compuestos organofluorados están virtualmente ausentes en los productos naturales resulta interesante preguntarse porque entre el 20-25% de los medicamentos contienen al menos un átomo de flúor. Uno de los primeros agentes farmacéuticos fluorados fue el 5-fluorouracilo, un potente antimetabolito utilizado en el tratamiento del cáncer, el cual fue sintetizado por primera vez en 1957. Desde la llegada del 5-fluoroacilo, las sustituciones con flúor se han usado comúnmente en la química medicinal contemporánea para mejorar la estabilidad metabólica, la biodisponibilidad y las interacciones ligando-proteína. Entre los medicamentos clave del mercado que contienen este tipo de sustitución se encuentran: la Fluoxetina (antidepresivo), Faslodex (anticancerígeno), Fluritromicina (antibacterial) y Efavirenz (antiviral), cuatro medicamentos que ilustran el amplio rango de padecimientos que se pueden tratar con el

uso de la química del flúor y desde un punto de vista molecular, la diversidad estructural de los componentes fluorados.⁷⁶

La participación del flúor en interacciones electrostáticas es ampliamente aceptada y se cree que podría contribuir a la afinidad de enlace entre los compuestos organofluorados y el sitio activo de las enzimas. El efecto de las sustituciones del anillo benzoico con flúor ha sido investigado en una serie de inhibidores de la trombina, muchos compuestos fluorados y clorados fueron probados y se ha encontrado que tienen una constante inhibitoria similar a la molécula líder. Notablemente se encontró que solo los derivados 4-fluorofenil eran significativamente más activos (Tabla 5.13). Las medidas de Log P mostraron que un incremento en la lipofilia no explica el incremento en la potencia de unión con la enzima. Los análisis de cristalografía de rayos X del análogo *p*-fluorado unido a la trombina revelan que el enlace C-F presenta un contacto cercano con un carbono polarizado positivamente de un carbonilo y de un H-C_α en una unidad Asn₉₈. Estas interacciones dipolares C-F...H-C_α y C-F...C=O se cree que son las determinantes en la potencia observada de este compuesto (Figura 5.1).⁷⁷

Tabla 5.13 Concentraciones inhibitorias según la sustitución para inhibidores de la trombina⁷⁷

Sustitución aromática	K _i [μM]
H	0.31
2-F	0.50
3-F	0.36
4-F	0.057
2,3-F ₂	0.49
2,6-F ₂	0.61
3,4-F ₂	0.26
3,5-F ₂	0.59
1,2,3,4,5-F ₅	0.27
4-Cl	0.19

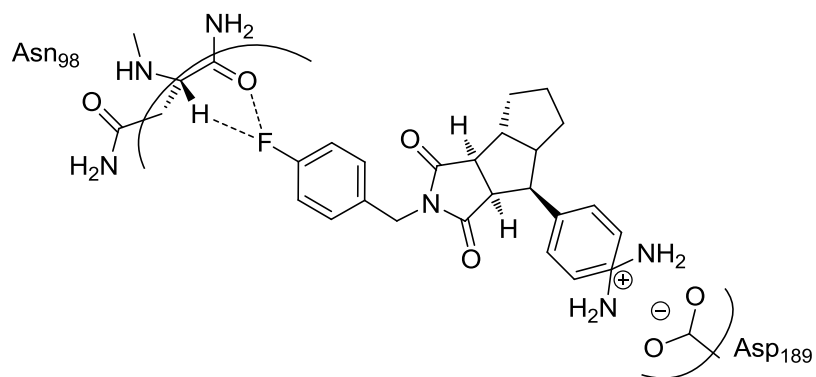
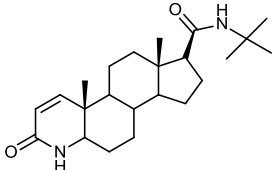
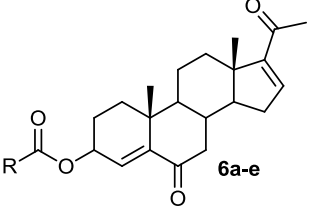
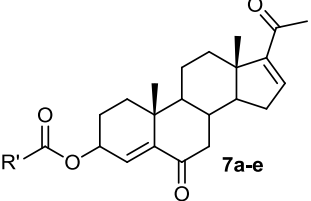
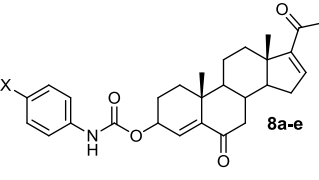
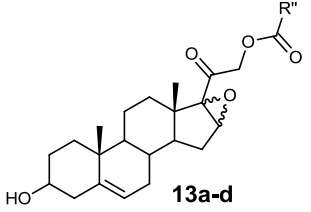


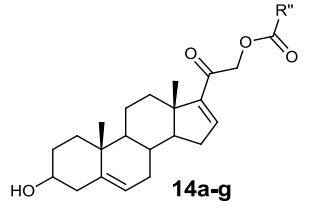


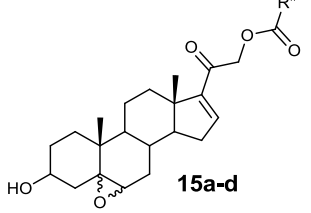


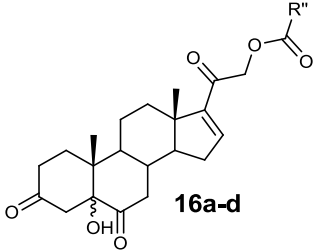
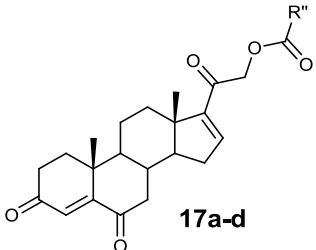


Figura 5.1 Representación de las interacciones electrostáticas del flúor en un potente inhibidor de la trombina, determinadas por análisis de rayos X⁷⁷

Según los datos obtenidos por Olsen y colaboradores en los estudios con inhibidores de la trombina anteriormente mencionados, se cree que la actividad biológica mostrada por el compuesto **17d** en la inhibición de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 también se debe a las interacciones electrostáticas del flúor con algún sitio de la enzima que permite una unión más potente en comparación con los otros derivados, ya que la lipofilia no parece ser un factor determinante debido a que los compuestos presentan valores de Log P similares. Esto se podría comprobar haciendo estudios de cristalografía de rayos X pero lamentablemente la enzima 5 α -reductasa, como ya se explicó en los antecedentes, no ha podido ser purificada.

Tabla 5.14 Pruebas de inhibición de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 y 2

Estructura	Compuesto	5 α -R (Tipo 2)	5 α -R (Tipo1)
	Finasterida	8.5 nM	0.63 μ M
	6a (R= CH₃)	4 nM	25 μ M
	6b (R= C₂H₅)	40 μ M	1.52 μ M
	6c (R= C₃H₇)	NA	15.22 μ M
	6d (R= C₄H₉)	NA	1.25 μ M
	6e (R= C₅H₁₁)	NA	11.26 μ M
	7a (R= C₃H₅)	NA	22 μ M
	7b (R= C₄H₇)	NA	NA
	7c (R= C₅H₉)	40 nM	NA
	7d (R= C₆H₁₁)	6 nM	NA
	7e (R= C₇H₁₃)	NA	83 μ M
	8a (X=H)	NA	NA
	8b (X=F)	NA	NA
	8c (X=Cl)	NA	NA
	8d (X=Br)	NA	NA
	8e (X=I)	NA	NA
	13a (R''=CH₃)	>1000	69 μ M
	13b (R''=C₂H₇)	NA	NA
	13c (R''= )	NA	NA
	13d (R''= )	34 nM	100 μ M
	14a (R''=CH₃)	1870 nM	NA
	14b (R''=C₂H₇)	1490 nM	NA
	14c (R''= )	NA	NA
	14d (R''= )	20 nM	150 μ M
	15a (R''=CH₃)	1.09 nM	NA
	15b (R''=C₂H₇)	74.8 nM	NA
	15c (R''= )	NA	43.42 nM
	15d (R''= )	179 nM	100 μ M

 <p>16a-d</p>	16a (R''=CH₃)	1000 nM	60 μM
	16b (R''=C₂H₅)	>1000 nM	NA
	16c (R''=C₆H₅)	NA	NA
	16d (R''=4-F-C₆H₄)	33 nM	NA
 <p>17a-d</p>	17a (R''=CH₃)	553 nM	NA
	17b (R''=C₂H₅)	568 nM	NA
	17c (R''=C₆H₅)	NA	NA
	17d (R''=4-F-C₆H₄)	0.179 nM	1 μM

Así mismo, los resultados (CI₅₀) de pruebas de inhibición de la enzima 5α-reductasa tipo 1 y 2 que se muestran en la Tabla 5.14, solo muestran buenos resultados para los compuestos que contienen flúor en su estructura, el compuesto **6a** tuvo una potencia dos veces mayor que la finasterida, sin embargo no es selectivo hacia un solo tipo como lo hace el compuesto **7d**, el mejor resultado sin duda fue el del compuesto **17d** con un CI₅₀ de 0.179 nM (47 veces más potente que la finasterida) y resultado selectivo hacia la isoenzima tipo 2 (relacionada al cáncer de próstata e HPB).

Los compuestos **14d**, **15d** y **17d** fueron elegidos para realizar las pruebas biológicas *in vivo*, estas se llevaron a cabo en hámster castrados de la cepa Sirian Golden. En estas pruebas se analizó el diámetro de la mancha pigmentada que es una mancha que se encuentra en el dorso de los hámster y es dependiente de andrógenos, también se midió el peso de la próstata y el de las vesículas seminales (Tabla 5.15). Los resultados obtenidos muestran que el compuesto **17d** tiene resultados muy parecidos a la finasterida

Tabla 5.15 Pruebas *in vivo* de los compuestos **14d**, **15d** y **17d**.

Tratamiento	Diámetro de la mancha pigmentada (mm)	Peso de la próstata (mg)	Peso de las vesículas seminales (mg)
CONTROL (C)	1.77±0.3*	30.6±5.32*	133.1±48.3*
Testosterona (T)	4.1±1.0	59.6±5.92	208.6±17.9
T+F	2.8±0.95	49.6±2.7*	122.7±4.5*
T+14d	3.4±0.4	64.2±5.5	242.8±8.3*
T+ 15d	3.8±0.4	55.7±8.5	178.6±13.9
T+ 17d	3.3±0.6	50.7±2.37	155.1±11.6

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 Parte química

6.1.1 Condiciones generales

La pureza de los productos y el avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando cromatoplasmas de gel de sílice (60GF254, Merck) y un sistema de elución hexano-acetato de etilo 6:4. Para visualizar las placas se empleó una solución de CoCl_2 al 2% (m/v) en H_2SO_4 2N y lámpara de luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

La purificación de los productos se realizó mediante cromatografía en columna usando gel de sílice Kiesegel 60 de 0.063-0.2 mm o Fluorisil de malla 60-100 de Aldrich.

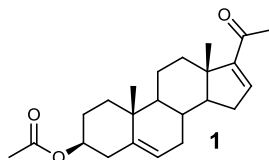
Para la técnica de espectrofotometría de absorción en el ultravioleta (UV) se empleó el espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer modelo Lambda 2, utilizando como disolvente metanol, las unidades se expresan en nm. Para la espectrofotometría de absorción en el infrarrojo (IR) se utilizó un espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer modelo 200; las unidades se presentan como cm^{-1} .

Para la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) y de carbono (RMN ^{13}C) se utilizaron los equipos Inova Varian de 400 MHz y VRX-300s respectivamente, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) para RMN ^1H y CDCl_3 para RMN ^{13}C ; las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hz.

Por último para la espectrometría de masas se empleó un espectrómetro de masas Termo-Electron, modelo DFS (Double Focus Sector) con un analizador másico de doble sector (magnético y eléctrico, geometría inversa), mediante la técnica FAB con bombardeo de iones de cesio a una temperatura de cámara menor a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ mediante detección de iones positivos. Se reporta para cada compuesto sintetizado el ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ en unidades m/z .

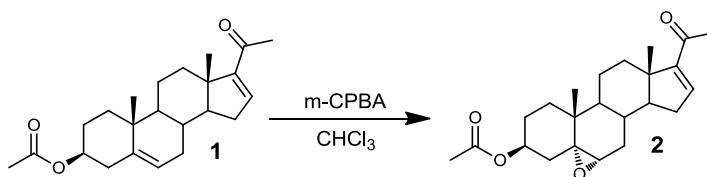
6.1.2 Síntesis de ésteres y carbamatos en C-3

6.1.2.1 Purificación de la 3β-acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (1)



En un vaso de precipitados de 200 mL se disolvió la materia prima **1** (20 g) con 100 mL de metanol, se recrystalizó y filtró obteniéndose un polvo cristalino blanco (18.6 g). El rendimiento de esta purificación fue del 93%. **P.F.** 170-172 °C. **UV** (nm): 237.96. **IR** (cm⁻¹): 1728.30, 1660.22, 1583.66. **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.92 (s, 3H, H-18), 1.06 (s, 3H, H-19), 2.03 (s, 3H, CH₃ del éster), 2.26 (s, 3H, H-21), 4.6 (m, 1H, H-3), 5.38 (d, 1H, *J*=4.5 Hz, H-6), 6.71 (d, 1H, *J*=1.2 Hz, H-16). **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.72 (C-18), 19.23 (C-19), 20.64 (C-11), 21.42 (CH₃ del éster), 27.73 (C-21), 30.16 (C-8), 31.54 (C-7), 34.61 (C-12), 36.87 (C-10), 38.15 (C-1), 46.08 (C-13), 50.39 (C-9), 56.36 (C-14), 73.86 (C-3), 121.98 (C-6), 140.27 (C-5), 144.37 (C-16), 155.35 (C-17), 170.52 (C=O del éster), 196.8 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) *m/z* 357 [M+H]⁺.

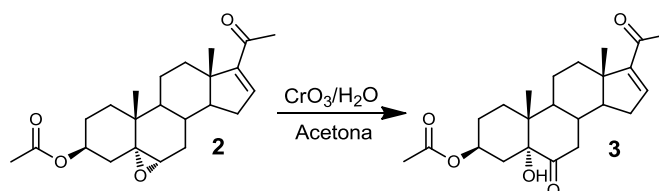
6.1.2.2 Síntesis de la 3β-acetoxi-5,6α-epoxi-5α-pregn-16-en-20-ona (2)



En un matraz bola de 100 mL se colocó un gramo del esteroide **1** (2.82 mmol) y ácido *m*-cloroperoxibenzoico (1.62 g, 9.4 mmol) en cloroformo (50 mL), la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Una vez concluida la epoxidación se adicionó una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (85 mL) que contenía bisulfito de sodio (1 g). El producto se extrajo con cloroformo (3×50 mL), la fase orgánica se lavó con agua destilada (3×50 mL) y se secó con sulfato de sodio para posteriormente remover el disolvente por destilación a presión reducida en un rotaevaporador. El producto

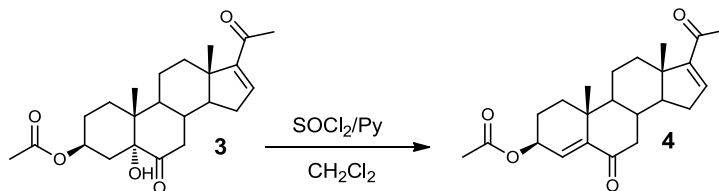
crudo se recrystalizó de metanol obteniéndose cristales blancos (810 mg) con un rendimiento del 78%. No se separaron los isómeros α y β del epóxido, estando en mayor proporción el isómero α . **P.F.** 173-175 °C. **UV** (nm): 237.69. **IR** (cm^{-1}): 1733, 1659, 1240. **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.85 (s, 3H, H-18), 1.11 (s, 3H, H-19), 2.25 (s, 3H, CH_3 del éster), 2.02 (s, 3H, H-21), 4.77(m, 1H, H-3), 2.91(d, 1H, $J=4.5$ Hz, H-6). **RMN** ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.83 (C-18), 16.97(C-19), 21.3 (CH_3 del éster), 27.11 (C-21), 60.42 (C-6), 65.3 (C-5), 71.25 (C-3), 144.08 (C-16), 155.11 (C-17), 170.53 (C=O del éster), 196.71 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) m/z 372 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.1.2.3 Síntesis de la 3 β -acetoxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-6,20-diona (3)



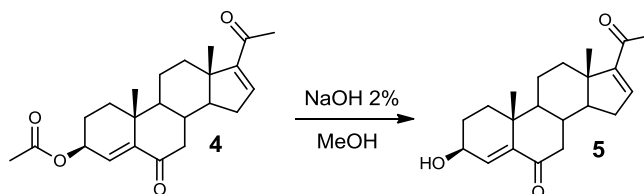
En un matraz bola de 50 mL se disolvió un gramo de esteroide **2** (2.7 mmol) en 20 mL de acetona. Se adicionó una solución de óxido de cromo (VI) en agua (2.3 g de óxido de cromo (VI) en 12 mL de agua) en tres tiempos divididos en 30 minutos cada uno. Al término de la reacción se adicionó 150 mL de hielo/agua para precipitar el producto, se filtró y se lavó con agua hasta que el compuesto quedó completamente blanco. El producto se recrystalizó de metanol obteniéndose cristales blancos (850 mg) con un rendimiento del 81%. **P.F.** 244-245 °C. **UV** (nm): 238.55. **IR** (cm^{-1}): 3364, 1700, 1733, 1663. **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.85 (s, 3H, H-18), 1.01(s, 3H, H-19), 2.02 (s, 3H, CH_3 del éster), 2.27 (s, 3H, H-21), 3.68(s, 1H, OH), 5.03 (m, 1H, H-3), 6.69(s, 1H, H-16). **RMN** ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 13.89 (C-18), 15.79(C-19), 27.11 (CH_3 del éster), 21.35 (C-21), 32.42 (C-4), 70.44 (C-3), 80.4 (C-5), 143.93 (C-16), 155.05 (C-17), 170.95 (C=O del éster), 196.67 (C-20), 211.62 (C-6). **EM-FAB** (6 eV) m/z 389 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.1.2.4 Síntesis de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (4 y 6a)



En un matraz bola de 50 mL bajo atmósfera inerte (N_2) se disolvió un gramo de esteroide **3** (2.57 mmol) en 8 mL de CH_2Cl_2 y 0.8 mL de piridina, la mezcla se enfrió en baño de hielo, y se adicionó 0.2 mL de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante dos horas. Terminada la reacción se agregó 10 mL de una solución acuosa de HCl al 10% y se agitó por 30 minutos. Se separó la fase orgánica, se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (3×50 mL), y con agua destilada (3×50 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró en un rotaevaporador. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando gel de sílice y como eluyente hexano-acetato de etilo 85:15. Se obtuvieron cristales blancos (780 mg) con un rendimiento de 81%. **P.F.** 193-195 °C. **UV** (nm): 237. **IR** (cm^{-1}): 1733.90, 1680.64, 1657.47. **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.93 (s, 3H, H-18), 1.06(s, 3H, H-19), 2.07 (s, 3H, CH_3 del éster), 2.27(s, 3H, H-21), 5.33(m, 1H, H-3), 6.1 (s, 1H, H-4), 6.7(m, 1H, H-16). **RMN ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 15.78 (C-18), 19.59 (C-19), 21.19 (CH_3 del éster), 27.12 (C-21), 69.22 (C-3), 129.04 (C-4), 143.82 (C-16), 147.90 (C-5), 154.88 (C-17), 170.72 (C=O del éster), 196.60 (C-20), 201.80 (C-6). **EM-FAB** (6 eV) m/z 371 $[M+H]^+$.

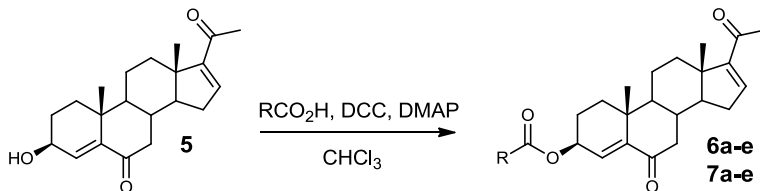
6.1.2.5 Síntesis de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (5)



En un matraz bola de 200 mL se disolvió un gramo del esteroide **4** (2.7 mmol) con 150 mL de metanol, posteriormente se adicionaron 10 mL de una solución acuosa de

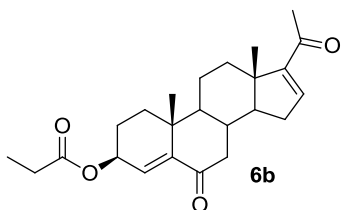
hidróxido de sodio al 2%. La hidrólisis se completó en 15 minutos, el metanol se evaporó a presión reducida a baja temperatura, posteriormente el compuesto se precipitó en agua fría y se filtró y lavó con agua (3×50 mL). El producto se purificó por columna cromatográfica utilizando gel de sílice y como eluyente hexano-acetato de etilo 8:2, obteniéndose un polvo blanco (770 mg) con un rendimiento del 87%. **P.F.** 168-170 °C. **UV** (nm): 237.59. **IR** (cm⁻¹): 3383.72, 1685.75, 1654.29. **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.93 (s, 3H, H-18), 1.07(s, 3H, H-19), 2.27(s, 3H, H-21), 3.22 (s, 1H, -OH), 4.25(m, 1H, H-3), 6.18(m, 1H, H-4), 6.7(m, 1H, H-16). **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.80 (C-18), 19.83 (C-19), 27.18 (C-21), 67.18 (C-3), 133.23 (C-4), 143.8 (C-16), 154.94 (C-17), 196.63 (C-20), 202.00 (C-6). **EM-FAB** (6 eV) *m/z* 329 [M+H]⁺.

6.1.2.6 Metodología general para la síntesis de compuestos esteroidales con una función éster en C-3 (6b-e y 7a-e)



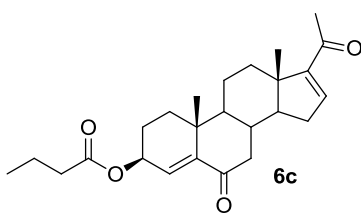
En un matraz bola de 100 mL se disolvió un gramo del esteroide **5** (3.05 mmol) en 33 mL de diclorometano, se agregó DCC (3g, 15 mmol), DMAP (1.8g, 15 mmol) y el ácido carboxílico correspondiente (15 mmol), se dejó en agitación durante 4 horas. Terminada la reacción se adicionaron 135 mL de acetato de etilo, se dejó precipitar la DCU en refrigeración y se filtró. El líquido filtrado se lavó con una solución acuosa de HCl al 10% (3×50 mL), una solución saturada de bicarbonato de sodio (3×50 mL) y agua destilada (3×50 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró en un rotaevaporador. El producto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna usando como fase móvil hexano-acetato de etilo (8:2), obteniéndose compuestos blancos con rendimientos que van del 61 al 77%.

6.1.2.6.1 Caracterización de la 3β-propioniloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6b)



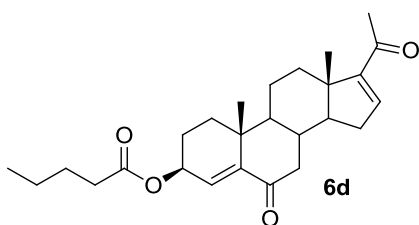
Rendimiento 75% P.F. 196-198 °C. UV (nm): 236. IR (cm⁻¹): 1738, 1689, 1657. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (s, 3H, H-18), 1.0(s, 3H, H-19), 1.1 (m, 3H, CH₃ del éster), 2.27(s, 3H, H-21), 5.3(m, 1H, H-3), 6.0 (s, 1H, H-4), 6.7(m, 1H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 9.0 (CH₃ del éster), 15.7 (C-18), 19.6 (C-19), 27.72 (C-21), 69.0 (C-3), 129.3 (C-4), 143.7 (C-16), 147.8 (C-5), 154.9 (C-17), 174.0 (C=O del éster), 196.5 (C-20), 201.7 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 385 [M+H]⁺.

6.1.2.6.2 Caracterización de la 3β-butiriloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6c)



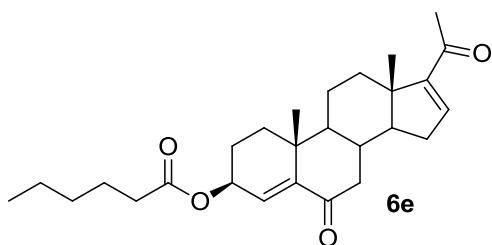
Rendimiento 73% P.F. 142-144 °C. UV (nm): 236. IR (cm⁻¹): 1732, 1688, 1656. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (m, 3H, CH₃ del éster), 0.92 (s, 3H, H-18), 1.3(s, 3H, H-19), 2.2(s, 3H, H-21), 5.3(m, 1H, H-3), 6.0 (s, 1H, H-4), 6.7(m, 1H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.6 (CH₃ del éster), 15.5 (C-18), 19.4 (C-19), 27.0 (C-21), 68.9 (C-3), 129.2 (C-4), 143.7 (C-16), 147.7 (C-5), 154.8 (C-17), 173.2 (C=O del éster), 196.5 (C-20), 201.7 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 399 [M+H]⁺.

6.1.2.6.3 Caracterización de la 3β-pentanoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6d)



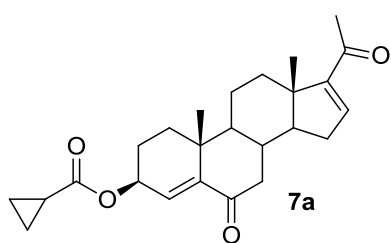
Rendimiento 69% P.F. 125-127 °C. UV (nm): 236. IR (cm⁻¹): 1735, 1688, 1656. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (m, 3H, CH₃ del éster), 0.92 (s, 3H, H-18), 1.3(s, 3H, H-19), 2.2(s, 3H, H-21), 5.3(m, 1H, H-3), 6.0 (s, 1H, H-4), 6.7(m, 1H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.7 (CH₃ del éster), 15.8 (C-18), 19.6 (C-19), 27.0 (C-21), 68.9 (C-3), 129.3 (C-4), 143.7 (C-16), 147.8 (C-5), 154.9 (C-17), 173.5 (C=O del éster), 196.5 (C-20), 201.7 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 413 [M+H]⁺.

6.1.2.6.4 Caracterización de la 3β-hexanoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6e)



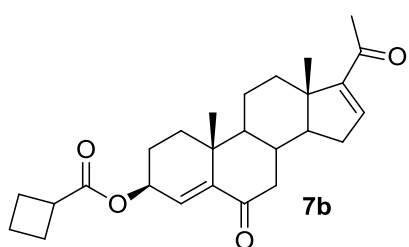
Rendimiento 77% P.F. 105-106 °C. UV (nm): 236. IR (cm⁻¹): 1726, 1688, 1664. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (m, 3H, CH₃ del éster), 0.95 (s, 3H, H-18), 1.1(s, 3H, H-19), 2.2(s, 3H, H-21), 5.3(m, 1H, H-3), 6.0 (s, 1H, H-4), 6.7(m, 1H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.8 (CH₃ del éster), 15.7 (C-18), 19.5 (C-19), 27.0 (C-21), 68.9 (C-3), 129.2 (C-4), 143.7 (C-16), 147.7 (C-5), 154.8 (C-17), 173.4 (C=O del éster), 196.5 (C-20), 201.7 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 427 [M+H]⁺.

6.1.2.6.5 Caracterización de la 3β-ciclopropilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7a)



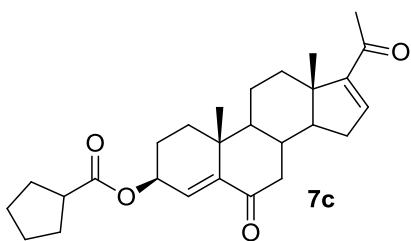
Rendimiento 65% P.F. 203-205 °C. UV (nm): 236. IR (cm⁻¹): 1724, 1692, 1660. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1(s, 3H, H-19), 1.6 (m, 1H, CH del éster), 2.2(s, 3H, H-21), 5.3(m, 1H, H-3), 6.1 (s, 1H, H-4), 6.7(m, 1H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.0 (CH del éster), 15.7 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 69.1 (C-3), 129.3 (C-4), 143.8 (C-16), 147.7 (C-5), 154.8 (C-17), 174.5 (C=O del éster), 196.6 (C-20), 201.8 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 397 [M+H]⁺.

6.1.2.6.6 Caracterización de la 3β-ciclobutilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7b)



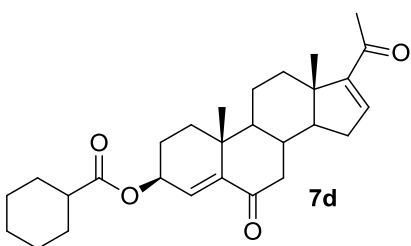
Rendimiento 67% P.F. 149-150 °C. UV (nm): 236. IR (cm⁻¹): 1725, 1691, 1663. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1(s, 3H, H-19), 2.2(s, 3H, H-21), 2.6 (m, 1H, CH del éster), 5.3(m, 1H, H-3), 6.0 (s, 1H, H-4), 6.7(m, 1H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.7 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 38.1 (CH del éster), 68.9 (C-3), 129.3 (C-4), 143.7 (C-16), 147.7 (C-5), 154.9 (C-17), 175.1 (C=O del éster), 196.6 (C-20), 201.8 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 411 [M+H]⁺.

6.1.2.6.7 Caracterización de la 3β-ciclopentilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7c)



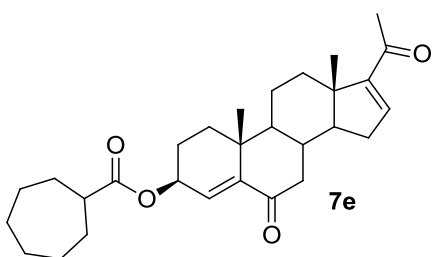
Rendimiento 70% P.F. 164-166 °C. UV (nm): 236. IR (cm⁻¹): 1717, 1690, 1658. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1(s, 3H, H-19), 2.2(s, 3H, H-21), 2.4 (m, 1H, CH del éster), 5.3(m, 1H, H-3), 6.0 (s, 1H, H-4), 6.7(m, 1H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.7 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 43.9 (CH del éster), 68.9 (C-3), 129.5 (C-4), 143.8 (C-16), 147.7 (C-5), 154.9 (C-17), 176.4 (C=O del éster), 196.6 (C-20), 201.8 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 425 [M+H]⁺.

6.1.2.6.8 Caracterización de la 3β-ciclohexilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7d)



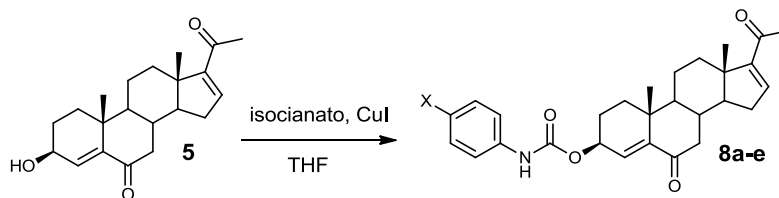
Rendimiento 71% P.F. 160-161 °C. UV (nm): 236. IR (cm⁻¹): 1727, 1690, 1667. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1(s, 3H, H-19), 2.1(s, 3H, H-21), 2.2 (m, 1H, CH del éster), 5.3(m, 1H, H-3), 6.0 (s, 1H, H-4), 6.7(m, 1H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.5 (C-18), 19.6 (C-19), 28.9(C-21), 43.2 (CH del éster), 68.6 (C-3), 129.5 (C-4), 147.3 (C-16), 147.7 (C-5), 154.8 (C-17), 175.6 (C=O del éster), 196.5 (C-20), 201.4 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 439 [M+H]⁺.

6.1.2.6.9 Caracterización de la 3β-cicloheptilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (7e)



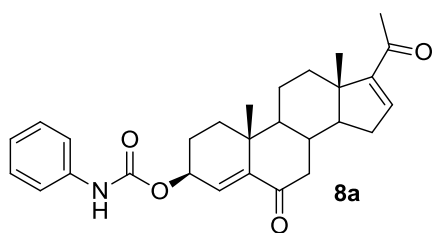
Rendimiento 61% P.F. 134-137 °C. UV (nm): 236. IR (cm⁻¹): 1727, 1693, 1652. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1(s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 2.4 (m, 1H, CH del éster), 5.3(m, 1H, H-3), 6.0 (s, 1H, H-4), 6.7(m, 1H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.0 (C-18), 19.1 (C-19), 28.0(C-21), 49.8 (CH del éster), 68.7 (C-3), 129.6 (C-4), 147.7 (C-16), 147.7 (C-5), 154.3 (C-17), 176.6 (C=O del éster), 196.5 (C-20), 201.7 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 453 [M+H]⁺.

6.1.2.7 Metodología general para la síntesis de compuestos esteroidales con una función carbamato en C-3 (8a-e)



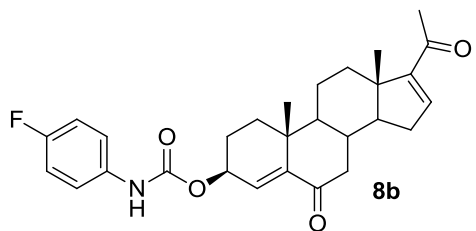
En un matraz bola de dos bocas se disolvió el compuesto **5** (1 mmol) y el CuI (0.1 mmol) en THF seco bajo atmosfera de nitrógeno, posteriormente se adicionó el isocianato correspondiente (3 mmol) y la reacción se dejó en agitación por 24 horas a temperatura ambiente. Al finalizar la reacción se adicionó cloroformo (50 mL) y se filtró el catalizador. La fase orgánica se lavó con una solución de ácido clorhídrico al 10% (3×20 mL), una solución de bicarbonato de sodio 5% (3×20 mL) y agua (3×20) y se secó con sulfato de sodio anhidro. La purificación se realizó en una columna cromatográfica de sílica gel usando como sistema de elución hexano-acetato de etilo (9:1) para obtener de esta forma los derivados **8a-e** con rendimientos que van del 9 al 32%.

6.1.2.7.1 Caracterización de la 3β-fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**8a**)



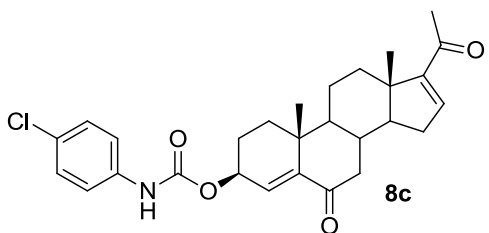
Rendimiento 32% P.F. 252-254 °C. UV (nm): 237. IR (cm⁻¹): 3331, 1721, 1687, 1662. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.3 (m, 1H, H-3), 6.1 (s, 1H, H-4), 6.7 (s, 1H, H-16), 6.9 (s, 1H, N-H), 7.0 (m, 1H, Ar-H), 7.3 (m, 2H, Ar-H), 7.3(m, 2H, Ar-H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.7 (C-18), 19.5 (C-19), 27.1 (C-21), 70.0 (C-3), 118.7 (Ar-C), 129.0 (Ar-C), 129.1 (C-4), 129.3 (Ar-C), 137.6 (Ar-C), 143.8 (C-16), 147.9 (C-5), 152.9 (carbonilo del carbamato), 154.8 (C-17), 196.6 (C-20), 201.9 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 448 [M+H]⁺.

6.1.2.7.2 Caracterización de la 3 β -(*p*-fluoro)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8b)



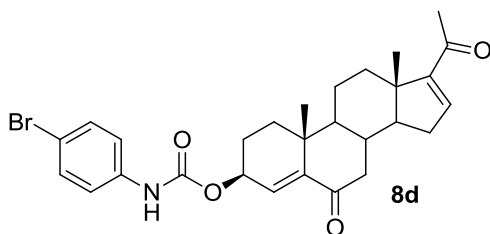
Rendimiento 29% P.F. 224-227 °C. UV (nm): 237. IR (cm⁻¹): 3335, 1724, 1685, 1662 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (s, 3H, H-18), 1.0 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.2 (m, 1H, H-3), 6.0 (s, 1H, H-4), 6.9 (s, 1H, H-16), 7.1 (m, 2H, Ar-H), 7.4 (m, 2H, Ar-H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.6 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 74.3 (C-3), 120.3 (Ar-C), 120.5 (Ar-C), 128.5 (C-4), 133.6 (Ar-C), 141.1 (C-16), 150.3 (C-5), 152.8 (carbonilo del carbamato), 156.7 (C-17), 163.7 (Ar-C), 201.3 (C-20), 206.0 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 466 [M+H]⁺.

6.1.2.7.3 Caracterización de la 3 β -(*p*-cloro)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8c)



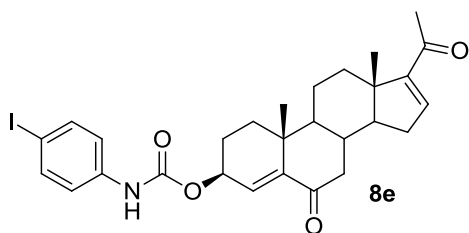
Rendimiento 23% P.F. 221-223 °C. UV (nm): 237. IR (cm⁻¹): 3365, 1726, 1683, 1662. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (s, 3H, H-18), 1.0 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.3 (m, 1H, H-3), 6.2 (s, 1H, H-4), 6.7 (s, 1H, H-16), 6.8 (s, 1H, N-H), 7.2 (m, 2H, Ar-H), 7.3 (m, 2H, Ar-H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.6 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 70.2 (C-3), 119.9 (Ar-C), 128.9 (C-4), 129.0 (Ar-C), 135.0 (Ar-C), 136.4 (Ar-C), 143.8 (C-16), 148.0 (C-5), 152.9 (carbonilo del carbamato), 154.9 (C-17), 196.6 (C-20) y 201.8 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 482 [M+H]⁺.

6.1.2.7.4 Caracterización de la 3 β -(*p*-bromo)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8d)



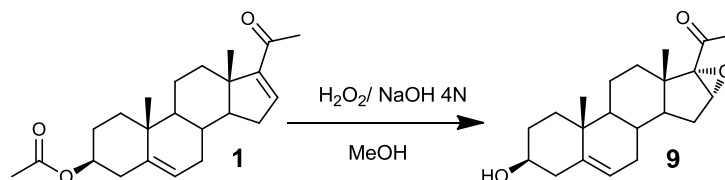
Rendimiento 9% P.F. 201-203 °C. UV (nm): 237. IR (cm⁻¹): 3294, 1727, 1692, 1663. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (s, 3H, H-18), 1.2 (s, 3H, H-19), 2.1 (s, 3H, H-21), 5.3 (m, 1H, H-3), 5.9 (s, 1H, H-4), 6.0 (s, 1H, H-16), 7.4 (m, 2H, Ar-H), 7.5(m, 2H, Ar-H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.6 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 75.31 (C-3), 120.0 (Ar-C), 121.0 (Ar-C), 127.0 (C-4), 133.6 (Ar-C), 139.2 (Ar-C), 144.1 (C-16), 152.7 (C-5), 156.7 (carbonilo del carbamato), 153.2 (C-17), 205.9 (C-20), 212.6 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 526 [M+H]⁺.

6.1.2.7.5 Caracterización de la 3 β -(*p*-Iodo)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (8e)



Rendimiento 9% P.F. 197-199 °C. UV (nm): 237. IR (cm⁻¹): 3327, 1726, 1695, 1663. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.3 (m, 1H, H-3), 5.7 (s, 1H, H-4), 6.1 (s, 1H, H-16), 7.3 (m, 2H, Ar-H), 7.5 (m, 2H, Ar-H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.7 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 72.1 (C-3), 119.5 (Ar-C), 128.1 (C-4), 129.1 (Ar-C), 134.5 (Ar-C), 139.3 (Ar-C), 144.2(C-16), 148.6 (C-5), 152.1 (carbonilo del carbamato), 154.0 (C-17), 196.2 (C-20), 202.0 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 574 [M+H]⁺.

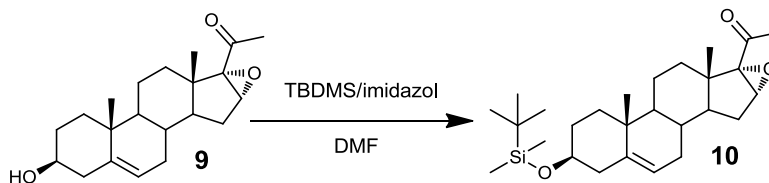
6.1.2.8 Síntesis de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (9)



En un matraz bola de 100 mL se disolvió 1g (2.8 mmol) de acetato de 16-dehidropregnenolona (**1**) en 66 mL de metanol, se adicionó gota a gota 2 mL (8 mmol) de una solución 4N de hidróxido de sodio y peróxido de hidrogeno al 30% (4 mL, 0.135 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente, finalizado el tiempo de reacción el disolvente se evaporó a presión reducida.

El producto se lavó con agua destilada para eliminar el hidróxido de sodio, el precipitado obtenido se filtró y dejó secar al vacío para posteriormente recristalizarlo de metanol obteniéndose 0.87 g del producto con un rendimiento del 95%. **P.F.** 180-182 °C. **IR** (cm⁻¹): 3454, 2936, 1642, 1042, 1692. **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.05 (s, 3H, H-18), 1.02 (s, 3H, H-19), 2.2 (m, 2H, H-21), 2.3 (m, 1H, H-16), 3.5 (m, 1H, H-3), 3.68 (s, 1H, -OH), 5.33 (m, 1H, H-6). **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.1 (C-18), 19.3 (C-19), 27.51 (C-21), 60.4 (C-16), 71.02 (C-17), 71.06 (C-3), 120.9 (C-6), 141.12 (C-5), 204.9 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) m/z 331 [M+H]⁺.

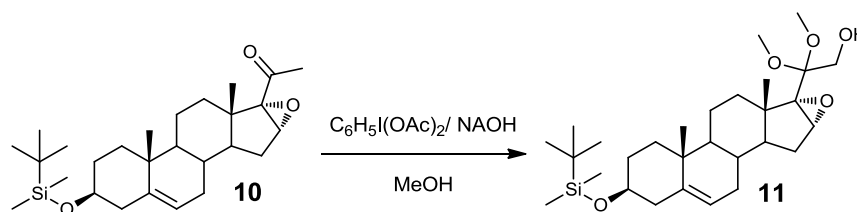
6.1.2.9 Síntesis de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-en-20-ona (10)



En un matraz bola de 50 mL se disolvió 1g (3 mmol) del compuesto **9** en 15 mL de *N,N*-dimetilformamida, 450 mg (5 mmol) de imidazol y 760 mg (6.8 mmol) de cloruro de *tert*-butildimetilsililo, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 2 horas.

Al término de la reacción se eliminó el disolvente por medio de evaporación a presión reducida para posteriormente precipitar el compuesto en agua (50 mL), el producto se filtró y lavó con agua destilada (3×50 mL) para finalmente obtener 1.3 g de compuesto con un rendimiento del 98%. **P.F.** 126-127 °C. **IR** (cm^{-1}): 2929, 1659, 1698, 1083. **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.58 (m, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.89 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 1.0 (s, 3H, H-18), 1.04 (s, 3H, H-19), 2.3 (s, 3H, H-21), 2.2(m, 1H, H-16), 3.4 (m, 1H, H-3), 5.24 (d, $J=4.9$ Hz, 1H, H-6). **RMN** ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.1 (C-18), 19.3 (C-19), 27.5 (C-21), 25.9 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 31.4 (C-Si), 60.5 (C-16), 71.0 (C-17), 72.4 (C-3), 120.4 (C-6), 141.9 (C-5), 204.8 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) m/z 445 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.1.2.10 Síntesis de la 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20-dimetoxi-3 β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-eno (**11**)

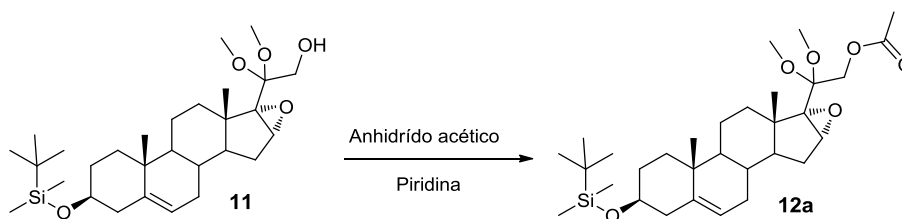


En un matraz bola de 100 mL se disolvió NaOH (1g, 25 mmol) en 20 mL de metanol, a esta solución se adicionó diacetoxiyodobenceno (1.2g, 3.72 mmol) y 1 g del compuesto **10** (2.25 mmol) disuelto en 10 mL de diclorometano. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 18 horas. La reacción fue monitoreada por cromatografía en capa fina, la placa tomada después del tiempo descrito mostró un producto más polar. El disolvente fue evaporado a presión reducida y el compuesto se precipitó en agua, se filtró y lavó con agua destilada.

El crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica usando sílica gel como fase estacionaria y hexano-acetato de etilo (9:1) como fase móvil, obteniéndose 0.74 g del compuesto **11** con un rendimiento del 65%. **P.F.** 205-207 °C. **IR** (cm^{-1}): 3596, 1666, 1070, 1033. **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.05 (m, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.89 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 1.02 (s, 3H, H-18), 1.26 (s, 3H, H-19), 2.2(m, 1H, H-16), 3.24 (m, 1H, H-3), 3.25 (m, 6 H, $\text{CH}_3\text{O}-$), 3.46 (s, 1H, -OH), 3.64 (d, $J=6$ Hz, 1 H, H-21), 5.31 (m, 1H, H-6).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.1 (C-18), 19.3 (C-19), 25.9 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 31.57 (C-Si), 50.75 (C-16), 50.3 (CH_3OH -), 62.6 (C-21), 69.6 (C-17), 72.5 (C-3), 101.8 (C-20), 120.7 (C-6), 141.8 (C-5). **EM-FAB** (6 eV) m/z 507 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

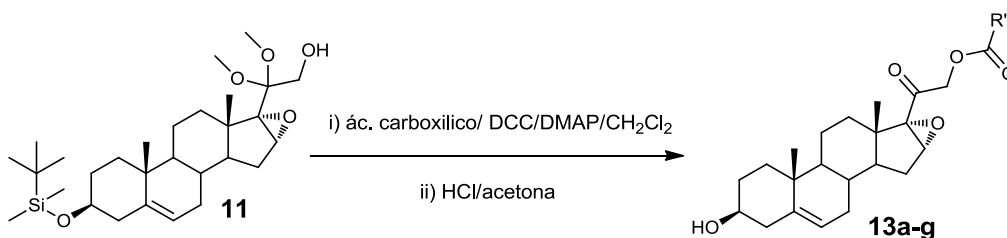
6.1.2.10 Síntesis de la 21-acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-dimetoxi-3 β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-eno (12a)



En un matraz bola de 25 mL se disolvió el compuesto **11** (2g, 3.94 mmol) en 4 mL de anhídrido acético y 4 mL de piridina, la mezcla de reacción se agitó durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo la reacción se vertió sobre una solución de 200 mL de salmuera y hielo formándose un precipitado blanco el cual se filtró y lavó con agua destilada.

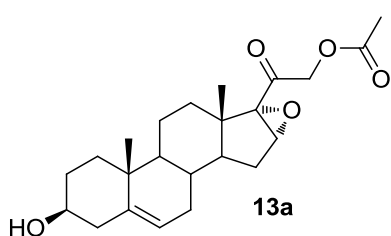
El compuesto se recrystalizó de metanol obteniéndose 1.8 g con un rendimiento del 85%. **P.F.** 109-111 °C. **IR** (cm^{-1}): 2931, 1748, 1667, 1072. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.6 (m, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ -), 0.89 (s, 3 H, H-18), 1.01 (s, 3 H, H-19), 2.1 (s, 1 H, H-16), 3.23 (m, 3 H, CH_3O -), 3.48 (m, 1 H, H-3), 4.16 (d, 1 H, $J=16$ Hz, H-21), 5.3 (d, 1H, $J=5$ Hz, H-6). **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.11 (C-18), 19.3 (C-19), 20.7 (CH_3COO -), 25.9 ($(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ -), 31.5 (CSi-), 58.66 (C-16), 61.96 (C-21), 68.78 (C-17), 72.5 (C-3), 101.39 (C-20), 120.7 (C-6), 141.7 (C-5), 170.3 (CH_3COO -). **EM-FAB** (6 eV) m/z 549 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.1.2.12 Metodología general para la síntesis de compuestos esteroidales con una función éster en C-21



En un matraz bola de 200 mL se disolvieron dos gramo del esteroide **11** (3.05 mmol) en 65 mL de diclorometano, se agregó DCC (3.95g, 19.75 mmol), DMAP (2.37g, 19.75 mmol) y el ácido carboxílico correspondiente (19.75 mmol) y se dejó en agitación durante 4 horas. Terminada la reacción se adicionaron 250 mL de acetato de etilo, se dejó precipitar la DCU en refrigeración y se filtró. El líquido filtrado se lavó con una solución acuosa de HCl al 10% (3×70 mL), una solución saturada de bicarbonato de sodio (3×70 mL) y agua destilada (3×70 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró en un rotaevaporador. El crudo de reacción se disolvió en 30 mL de acetona y se adicionó gota a gota 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se mantuvo la agitación durante 15 min. Finalizada la reacción se adicionaron 100 mL de una mezcla agua-hielo para precipitar el compuesto, el precipitado se filtró y se lavó con agua destilada. El producto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna usando como fase móvil hexano-acetato de etilo (9:1), obteniéndose compuestos blancos con rendimientos que van del 80-87 %.

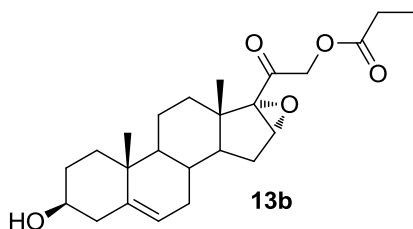
6.1.2.12.1 Síntesis de la 21-acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**13a**)



Para sintetizar este compuesto se tomó el compuesto **12a** y se realizó el segundo tratamiento descrito anteriormente en la metodología general, obteniéndose un rendimiento del 87%. **P.F.** 174-176 °C. **IR** (cm⁻¹): 3566, 2943, 1754, 1380, 1058. **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.02 (s, 3 H, H-18), 1.11 (s, 3 H, H-19), 2.16 (s, 3 H, -COOCH₃), 3.52 (m, 1 H, H-3), 3.79 (s, 1 H, -OH),

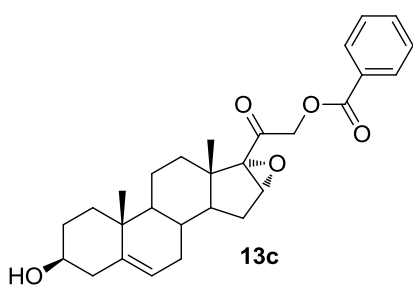
4.62 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 4.70 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.33 (s, 1 H, H-6). **RMN** ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.13 (C-18), 19.32 (C-19), 20.38 ($\text{CH}_3\text{COO-}$), 42.14 (C-4), 61.55 (C-21), 65.93 (C-16), 70.56 (C-17), 71.58 (C-3), 120.89 (C-6), 141.1 (C-5), 170.4 ($\text{CH}_3\text{COO-}$), 199.16 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) m/z 389 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.1.2.12.2 Caracterización de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-propionoxipregn-5-en-20-ona (13b)



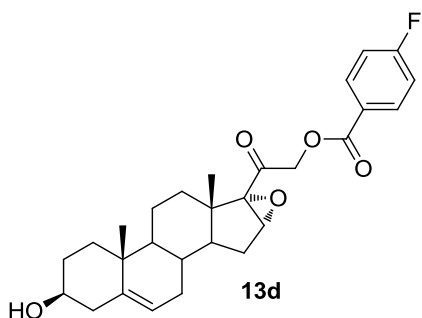
Rendimiento 80%, **P.F.** 186-187 °C. **IR** (cm^{-1}): 3326, 2930, 1744, 1379, 1057. **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.03 (s, 3 H, H-18), 1.12 (s, 3 H, H-19), 2.28 (m, 3 H, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 2.24 (m, 2 H, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 3.49 (m, 1 H, H-3), 3.8 (s, 1 H, $-\text{OH}$), 4.63 (d, $J=20$ Hz, 1 H, H-21), 4.71 (d, $J=20$ Hz, 1 H, H-21), 5.31 (s, H-6). **RMN** ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.98 ($-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 15.14 (C-18), 19.3 (C-19), 27.1 ($-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 42.41 (C-4), 61.54 (C-21), 65.78 (C-16), 70.57 (C-17), 71.58 (C-3), 120.91 (C-6), 141.1 (C-5), 173.88 ($-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 199.26 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) m/z 403 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.1.2.12.3 Caracterización de la 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13c)



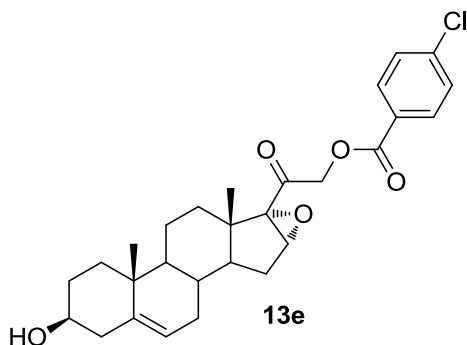
Rendimiento 82%. **P.F.** 202-203 °C. **IR** (cm^{-1}): 3484, 3206, 1739, 1379, 1051. **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.02 (s, 3 H, H-18), 1.13 (s, 3 H, H-19), 3.52 (m, 1 H, H-3), 3.87 (s, 1 H, $-\text{OH}$), 4.86 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 4.94 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.33 (s, 1 H, H-6), 7.45 (t, $J=8$ Hz, 2 H, H-Ar), 7.58 (t, $J=8$ Hz, 1 H, H-Ar), 8.08 (d, $J=8$ Hz, 2 H, H-Ar). **RMN** ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.17 (C-18), 19.3 (C-19), 42.18 (C-4), 61.58 (C-21), 66.33 (C-16), 70.65 (C-17), 71.58 (C-3), 120.88 (C-6), 126.40 (C-Ar), 128.42 (C-Ar), 129.8 (C-Ar), 133.31 (C-Ar), 141.12 (C-5), 165.99 ($-\text{COO}$), 198.94 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) m/z 451 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.1.2.12.4 Caracterización de la 21-(*p*-fluorobenzoiloxi)-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13d)



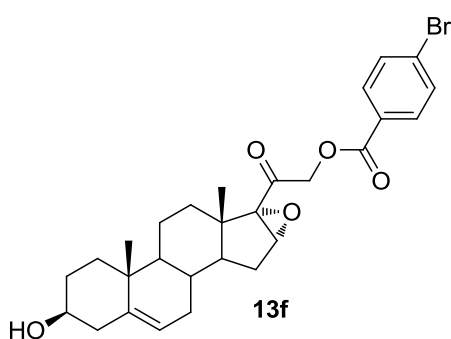
Rendimiento 82%. **P.F.** 210-212 °C. **IR** (cm^{-1}): 3320, 3044, 2936, 1721, 1381, 1055. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.02 (s, 3 H, H-18), 1.13 (s, 3 H, H-19), 3.48 (m, 1 H, H-3), 3.87 (s, 1 H, -OH), 4.85 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 4.94 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.33 (s, 1 H, H-6), 7.12 (t, $J=12$ Hz, 2 H, H-Ar), 8.1 (t, $J=8$ Hz, 2 H, H-Ar). **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.17 (C-18), 19.33 (C-19), 42.18 (C-4), 61.66 (C-21), 66.44 (C-16), 70.66 (C-17), 71.60 (C-3), 115.74 (C-Ar), 120.91 (C-6), 125.54 (C-Ar), 132.43 (C-Ar), 141.13 (C-5), 165.54 (-COO), 167.26 (C-Ar), 198.95 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) m/z 469 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.1.2.12.5 Caracterización de la 21-(*p*-clorobenzoiloxi)-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13e)



Rendimiento 81%, **P.F.** 164-166 °C. **IR** (cm^{-1}): 3366, 3210, 2927, 1733, 1380, 1067. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1.02 (s, 3 H, H-18), 1.13 (s, 3 H, H-19), 3.52 (m, 1 H, H-3), 3.87 (s, 1 H, -OH), 4.84 (d, $J=20$ Hz, 1 H, H-21), 4.94 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.35 (s, 1 H, H-6), 7.43 (d, $J=8$ Hz, 2 H, H-Ar), 8.1 (d, $J=12$ Hz, 2 H, H-Ar). **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.15 (C-18), 19.31 (C-19), 42.19 (C-4), 61.62 (C-21), 66.48 (C-16), 70.65 (C-17), 71.62 (C-3), 120.90 (C-6), 127.77 (C-Ar), 128.77 (C-Ar), 131.24 (C-Ar), 139.82 (C-Ar), 141.13 (C-5), 165.12 (-COO), 198.78 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) m/z 485 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

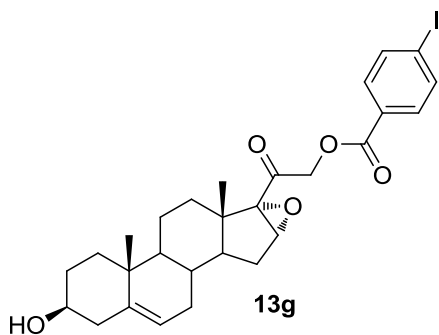
6.1.2.12.6 Caracterización de la 21-(*p*-bromo)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13f)



Rendimiento 83%, P.F. 172-174 °C. IR (cm⁻¹): 3567, 3322, 2926, 1754, 1380, 1058. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.02 (s, 3 H, H-18), 1.11 (s, 3 H, H-19), 3.52 (m, 1 H, H-3), 3.78 (s, 1 H, -OH), 4.61 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 4.69 (d, *J*=20 Hz, 1 H, H-21), 5.33 (s, 1 H, H-6), 7.6 (d, *J*=12 Hz, 2 H, H-Ar), 7.95 (d, *J*=8 Hz, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ ppm 15.14 (C-18), 19.33 (C-19), 42.20 (C-4), 61.55 (C-21), 65.92 (C-16), 70.58 (C-17), 71.65 (C-3), 120.94 (C-6), 128.55 (C-Ar), 128.62 (C-Ar), 131.62 (C-Ar), 131.8 (C-Ar), 141.12 (C-5), 170.37 (-COO), 199.12 (C-20). EM-FAB (6 eV) *m/z* 529 [M+H]⁺.

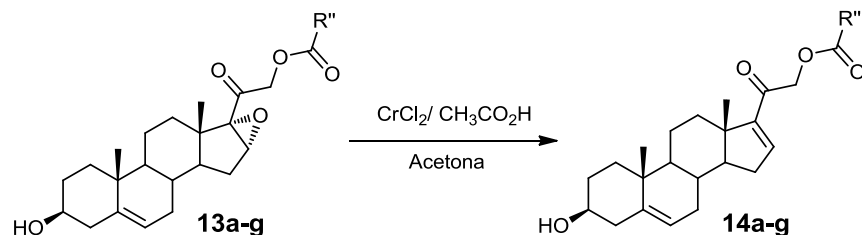
6.1.2.12.7 Caracterización de la 21-(*p*-yodo)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13g)



Rendimiento 82%, P.F. 216-218 °C. IR (cm⁻¹): 3474, 3324, 2931, 1721, 1379, 1056. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.02 (s, 3 H, H-18), 1.13 (s, 3 H, H-19), 3.53 (m, 1 H, H-3), 3.86 (s, 1 H, -OH), 4.84 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 4.94 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.34 (s, 1 H, H-6), 7.8 (m, 4 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.17 (C-18), 19.34 (C-19), 42.21 (C-

4), 61.64 (C-21), 66.51 (C-16), 70.65 (C-17), 71.65 (C-3), 101.25 (C-Ar), 120.93 (C-6), 128.83 (C-Ar), 131.26 (C-Ar), 137.81 (C-Ar), 141.13 (C-5), 165.54 (-COO), 198.75 (C-20). EM-FAB (6 eV) *m/z* 577 [M+H]⁺.

6.1.2.13 Metodología general para sintetizar los derivados 4,16-diénicos 14a-g

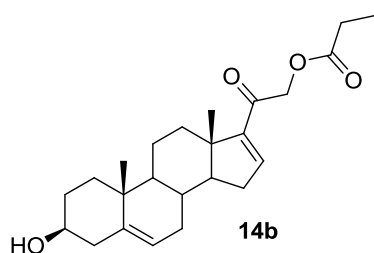


En un matraz bola de 250 mL se disolvió la materia prima **13a-g** (1 mmol) en una mezcla de 50 mL de acetona y 25 mL de ácido acético, posteriormente se añadió CrCl_2 (615 mg, 5 mmol) y se agitó durante 45 min. Una vez concluida la reacción se vertió en una mezcla de agua-hielo (250 mL). El compuesto precipitado se filtró y lavó con agua destilada. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía usando una mezcla hexano-acetato de etilo (9:1), obteniéndose compuestos blancos con rendimientos del 57 al 69%.

6.1.2.13.1 Caracterización de la 21-acetoxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (14a)

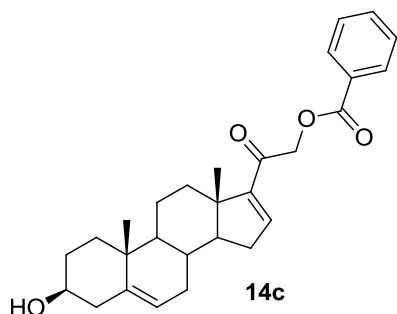
Rendimiento 65%, P.F. 156-157 °C. UV (nm): 239. IR (cm^{-1}): 3464, 2935, 1729, 1677. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.93 (s, 3 H, H-18), 1.03 (s, 3 H, H-19), 2.16 (s, 3 H, $-\text{COOCH}_3$), 3.51 (m, 1 H, H-3), 4.87 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.01 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.35 (s, 1 H, H-6), 6.74 (s, 1 H, H-16). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.83 (C-18), 19.28 (C-19), 20.53 ($\text{CH}_3\text{COO}-$), 65.62 (C-21), 71.64 (C-3), 120.90 (C-6), 141.37 (C-5), 144.07 (C-16), 151.96 (C-17), 170.4 ($\text{CH}_3\text{COO}-$), 190.54 (C-20). EM-FAB (6 eV) m/z 373 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.1.2.13.2 Caracterización de la 3β-hidroxi-21-propionoxipregna-5,16-dien-20-ona (14b)



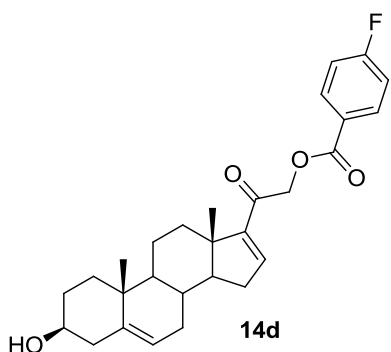
Rendimiento 60% P.F. 183-185 °C. UV (nm): 239. IR (cm⁻¹): 3486, 2929, 1732, 1676. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.93 (s, 3 H, H-18), 1.03 (s, 3 H, H-19), 1.18 (m, 3 H, -COOCH₂CH₃), 2.48 (m, 2 H, -COOCH₂CH₃), 3.51 (m, 1 H, H-3), 4.2 (s, 1 H, -OH), 4.88 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.03 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.34 (s, 1 H, H-6), 6.75 (s, 1 H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 9.03 (COOCH₂CH₃), 15.84 (C-18), 19.29 (C-19), 27.19 (CH₃CH₂COO-), 65.49 (C-21), 71.67 (C-3), 120.91 (C-6), 141.37 (C-5), 143.92 (C-16), 152.02 (C-17), 173.86 (CH₃CH₂COO-), 190.69 (C-20). EM-FAB (6 eV) *m/z* 387 [M+H]⁺.

6.1.2.13.3 Caracterización de la 21-benzoiloxi-3β-hidroxi-5,16-dien-20-ona (14c)



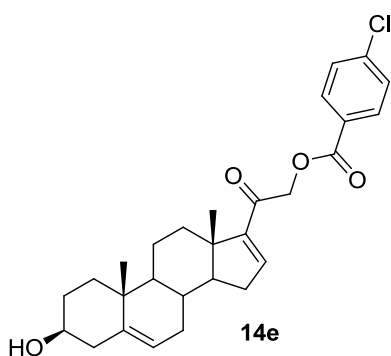
Rendimiento 61% P.F. 163-165 °C. UV (nm): 233. IR (cm⁻¹): 3484, 2932, 1730, 1675. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.97 (s, 3 H, H-18), 1.04 (s, 3 H, H-19), 3.53 (m, 1 H, H-3), 4.17 (s, 1 H, -OH), 4.62 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.13 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.37 (s, 1 H, H-6), 6.84 (s, 1 H, H-16), 7.45 (t, *J*=12 Hz, 2 H, H-Ar), 7.58 (t, *J*=8 Hz, 1 H, H-Ar), 8.11 (d, *J*=12 Hz, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.94 (C-18), 19.35 (C-19), 66.12 (C-21), 71.72 (C-3), 120.99 (C-6), 128.43 (C-Ar), 129.5 (C-Ar), 129.96 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 141.41 (C-5), 144.24 (C-16), 152.08 (C-17), 166.11 (-COO), 190.53 (C-20). EM-FAB (6 eV) *m/z* 435 [M+H]⁺.

6.1.2.13.4 Caracterización de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (14d)



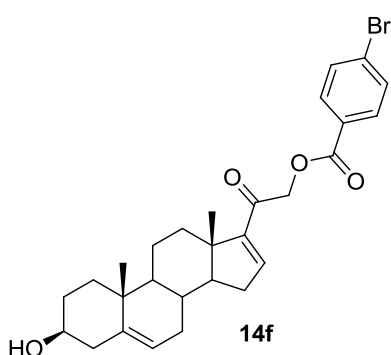
Rendimiento 69% P.F. 280-282 °C. UV (nm): 234. IR (cm⁻¹): 3325, 2933, 1723, 1677. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.95 (s, 3 H, H-18), 1.03 (s, 3 H, H-19), 3.51 (m, 1 H, H-3), 3.85 (s, 1 H, -OH), 5.11 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.25 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.34 (s, 1 H, H-6), 6.82 (s, 1 H, H-16), 7.11 (t, *J*=8 Hz, 2 H, H-Ar), 8.11 (t, *J*=8 Hz, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.88 (C-18), 19.29 (C-19), 66.09 (C-21), 71.68 (C-3), 115.67 (C-Ar), 120.93 (C-6), 125.7 (C-Ar), 132.45 (C-Ar), 141.34 (C-5), 144.26 (C-16), 152.0 (C-17), 165.07 (-COO), 167.21 (C-Ar) 190.31 (C-20). EM-FAB (6 eV) *m/z* 453 [M+H]⁺.

6.1.2.13.5 Caracterización de la 21-(*p*-cloro)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (14e)



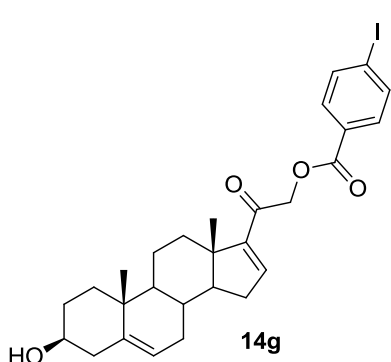
Rendimiento 60% P.F. 168-170 °C. UV (nm): 242. IR (cm⁻¹): 3252, 2934, 1723, 1670. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.96 (s, 3 H, H-18), 1.04 (s, 3 H, H-19), 3.53 (m, 1 H, H-3), 3.86 (s, 1 H, -OH), 5.12 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.26 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.37 (s, 1 H, H-6), 6.83 (s, 1 H, H-16), 7.43 (d, *J*=8 Hz, 2 H, H-Ar), 8.04 (d, *J*=8 Hz, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.88 (C-18), 19.29 (C-19), 66.15 (C-21), 71.68 (C-3), 120.92 (C-6), 127.93 (C-Ar), 128.74 (C-Ar), 131.29 (C-Ar), 139.73 (C-Ar), 141.35 (C-5), 144.28 (C-16), 152.01 (C-17), 165.19 (-COO), 190.19 (C-20). EM-FAB (6 eV) *m/z* 469 [M+H]⁺.

6.1.2.13.6 Caracterización de la 21-(*p*-bromo)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (14f)



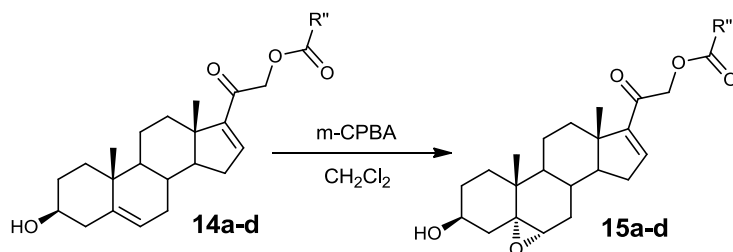
Rendimiento 63% **P.F.** 157-159 °C. **UV** (nm): 240. **IR** (cm^{-1}): 3466, 2930, 1729, 1677. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.94 (s, 3 H, H-18), 1.05 (s, 3 H, H-19), 3.51 (m, 1 H, H-3), 3.78 (s, 1 H, -OH), 4.88 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.03 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.35 (s, 1 H, H-6), 6.75 (s, 1 H, H-16), 7.6 (d, $J=8$ Hz, 2 H, H-Ar), 7.95 (d, $J=8$ Hz, 2 H, H-Ar). **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.86 (C-18), 19.31 (C-19), 65.65 (C-21), 71.69 (C-3), 120.94 (C-6), 127.51 (C-Ar), 129.51 (C-Ar), 131.11 (C-Ar), 132.04 (C-Ar), 141.39 (C-5), 144.03 (C-16), 152.02 (C-17), 170.43 (-COO), 190.55 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) m/z 513 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.1.2.13.7 Caracterización de la 21-(*p*-yodo)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (14g)



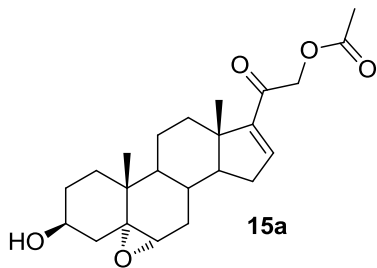
Rendimiento 57%, **P.F.** 195-197 °C. **UV** (nm): 242. **IR** (cm^{-1}): 3476, 2932, 1735, 1677. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.96 (s, 3 H, H-18), 1.04 (s, 3 H, H-19), 3.53 (m, 1 H, H-3), 3.85 (s, 1 H, -OH), 5.12 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.25 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.77 (s, 1 H, H-6), 6.82 (s, 1 H, H-16), 7.8 (m, 4 H, H-Ar). **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 15.17 (C-18), 19.31 (C-19), 66.19 (C-21), 71.72 (C-3), 101.15 (C-Ar), 120.95 (C-6), 129.0 (C-Ar), 131.33 (C-Ar), 137.77 (C-Ar), 141.37 (C-5), 144.25 (C-16), 152.06 (C-17), 165.59 (-COO), 190.17 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) m/z 561 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.1.2.14 Metodología general para la síntesis de epóxidos 15a-d



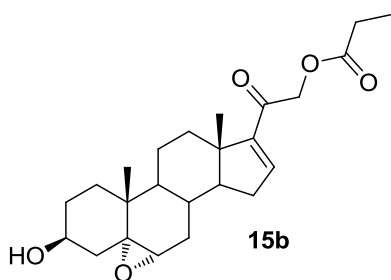
En un matraz bola de 50 mL se disolvió el esteroide de partida **14a-g** (1 mmol) con 15 mL de diclorometano, posteriormente se adicionaron 519 mg (3 mmol) de ácido *m*-cloroperoxibenzoico y se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Una vez concluida la epoxidación se adicionó una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (30 mL) que contenía bisulfito de sodio (300 mg). El producto se extrajo con cloroformo (3×15 mL), la fase orgánica se lavó con agua destilada (3×15 mL) y se secó con sulfato de sodio para posteriormente remover el disolvente por destilación a presión reducida en un rotaevaporador. El producto crudo se recrystalizó de metanol obteniéndose cristales blancos con rendimientos que van del 70-78%. No se separaron los isómeros α y β del epóxido, estando en mayor proporción el isómero α .

6.1.2.14.1 Caracterización de la 21-acetoxi-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-16-en-20-ona (15a)



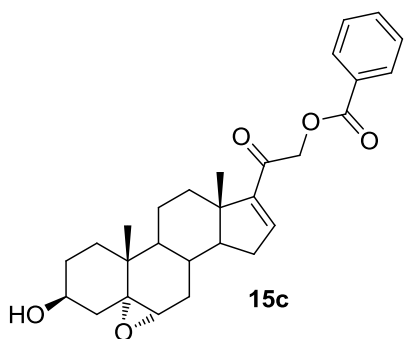
Rendimiento 78%, **P.F.** 191-195 °C. **UV** (nm): 239. **IR** (cm⁻¹): 3446, 2936, 1749, 1677, 1076. **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.84 (s, 3 H, H-18), 1.06 (s, 3 H, H-19), 2.14 (s, 3 H, -COOCH₃), 2.89 (d, *J*= 4Hz, 1 H, H-6), 3.45 (s, 1 H, -OH), 3.86 (m, 1 H, H-3), 4.8 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 4.99 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 6.69 (s, 1 H, H-16). **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.74 (C-18), 15.88 (C-19), 20.30 (CH₃COO-), 58.75 (C-6), 65.57 (C-21), 65.8 (C-5), 68.59 (C-3), 143.7 (C-16), 151.78 (C-17), 170.38 (CH₃COO-), 190.48 (C-20). **EM-FAB** (6 eV) *m/z* 389 [M+H]⁺.

6.1.2.14.2 Caracterización de la 5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-propionoxipregn-16-en-20-ona (15b)



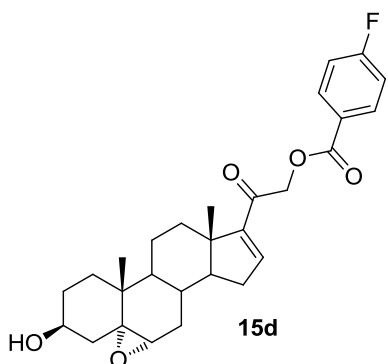
Rendimiento 70% P.F. 219-221 °C. UV (nm): 239. IR (cm⁻¹): 3493, 2929, 1729, 1679, 1056. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.86 (s, 3 H, H-18), 1.08 (s, 3 H, H-19), 1.17 (m, 3 H, -COOCH₂CH₃), 2.47 (m, 2 H, -COOCH₂CH₃), 2.91 (d, *J*= 4Hz, 1 H, H-6), 3.47 (s, 1 H, -OH), 3.89 (m, 1 H, H-3), 4.84 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.03 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 6.72 (s, 1 H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 9.02 (COOCH₂CH₃), 15.77 (C-18), 15.9 (C-19), 27.18 (CH₃ CH₂COO-), 58.8 (C-6), 65.47 (C-21), 65.8 (C-5), 68.6 (C-3), 143.63 (C-16), 151.84 (C-17), 173.85 (CH₃CH₂COO-), 190.66 (C-20). EM-FAB (6 eV) *m/z* 403 [M+H]⁺.

6.1.2.14.3 Caracterización de la 21-benzoiloxi-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-16-en-20-ona (15c)



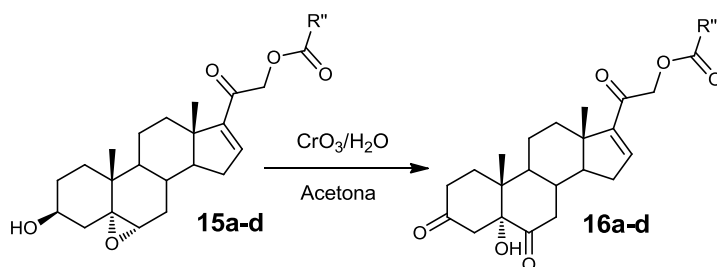
Rendimiento 75% P.F. 194-197 °C. UV (nm): 231. IR (cm⁻¹): 3423, 2928, 1721, 1624, 1087. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.92 (s, 3 H, H-18), 1.12 (s, 3 H, H-19), 2.95 (d, *J*= 4Hz, 1 H, H-6), 3.49 (s, 1 H, -OH), 3.92 (m, 1 H, H-3), 5.13 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.3 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 6.84 (s, 1 H, H-16), 7.48 (t, *J*= 12 Hz, 2 H, H-Ar), 7.61 (t, *J*= 12 Hz, 1 H, H-Ar), 8.13 (d, *J*=8 Hz, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.86 (C-18), 15.94 (C-19), 58.9 (C-6), 65.97 (C-21), 66.1 (C-5), 68.56 (C-3), 128.43 (C-Ar), 129.93 (C-Ar), 133.32 (C-Ar), 144.01 (C-16), 151.82 (C-17), 166.08 (COO-), 190.48 (C-20). EM-FAB (6 eV) *m/z* 451 [M+H]⁺.

6.1.2.14.4 Caracterización de la 21-(*p*-fluorobenzoiloxi)-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregnen-16-en-20-ona (15d)



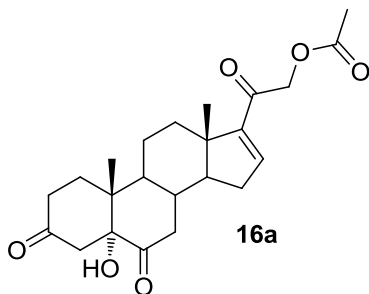
Rendimiento 77% P.F. 213-215 °C. UV (nm): 233. IR (cm⁻¹): 3517, 2930, 1718, 1678, 1087. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.89 (s, 3 H, H-18), 1.1 (s, 3 H, H-19), 2.93 (d, *J*= 4 Hz, 1 H, H-6), 3.84 (s, 1 H, -OH), 3.91 (m, 1 H, H-3), 5.09 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.27 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 6.8 (s, 1 H, H-16), 7.12 (t, *J*= 8 Hz, 2 H, H-Ar), 8.11 (m, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.14 (C-18), 15.91 (C-19), 58.8 (C-6), 65.87 (C-21), 66.08 (C-5), 68.60 (C-3), 115.47 (C-Ar), 125.71 (C-Ar), 132.56 (C-Ar), 143.97 (C-16), 151.81 (C-17), 165.06.08 (COO-), 167.22 (C-Ar), 198.8 (C-20). EM-FAB (6 eV) *m/z* 469 [M+H]⁺.

6.1.2.15 Metodología general la síntesis de derivados 5 α -hidroxi-3,6-dicetónicos 16a-d



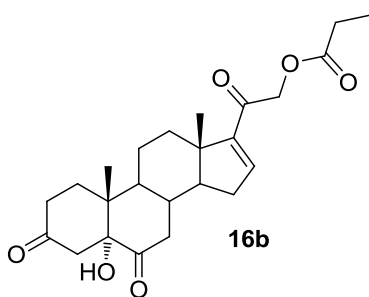
En un matraz bola de 25 mL se disolvió el esteroide de partida **15a-d** (1 mmol) en 10 mL de acetona. Se adicionó una solución acuosa de óxido de cromo (VI) (0.85 g de óxido de cromo (VI) en 4.5 mL de agua) en tres tiempos divididos en 30 minutos cada uno. Al término de la reacción se adicionó 75 mL de hielo/agua para precipitar el producto, se filtró y se lavó con agua. El producto se recrystalizó de metanol obteniéndose cristales blancos con rendimientos que van del 76-82%.

6.1.2.15.1 Caracterización de la 21-acetoxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16a)



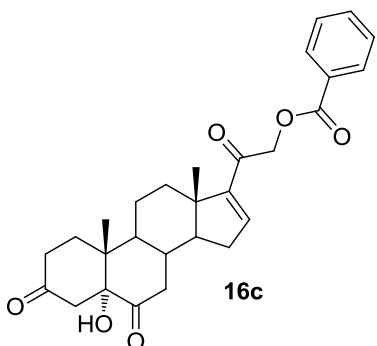
Rendimiento 82%, P.F. 218-220 °C. UV (nm): 238. IR (cm⁻¹): 3346, 2943, 1711, 1681. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.89 (s, 3 H, H-18), 1.0 (s, 3 H, H-19), 2.14 (s, 3 H, -COOCH₃), 2.84 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-4), 2.87 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-4), 3.78 (s, 1 H, -OH), 4.85 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 4.99 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 6.71 (s, 1 H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.75 (C-18), 15.88 (C-19), 20.48 (CH₃COO-), 65.58 (C-21), 82.69 (C-5), 143.44 (C-16), 151.57 (C-17), 170.44 (CH₃COO-), 190.44 (C-20), 210.2 (C-3), 211.13 (C-6). EM-FAB (6 eV) m/z 403 [M+H]⁺.

6.1.2.15.2 Caracterización de la 5-hidroxi-21-propionoxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16b)



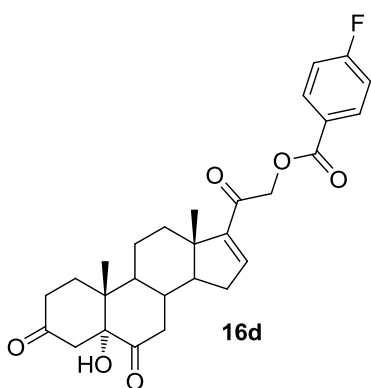
Rendimiento 76%, P.F. 288-190 °C. UV (nm): 231. IR (cm⁻¹): 3327, 2943, 1750, 1678. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.86 (s, 3 H, H-18), 0.97 (s, 3 H, H-19), 1.12 (m, 3 H, -COOCH₂CH₃), 2.4 (m, 2 H, -COOCH₂CH₃), 2.8 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-4), 2.87 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-4), 3.75 (s, 1 H, -OH), 4.86 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 4.98 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 6.67 (s, 1 H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 9.95 (COOCH₂CH₃), 13.8 (C-18), 14.9 (C-19), 26.19 (CH₃CH₂COO-), 64.47 (C-21), 81.79 (C-5), 142.3 (C-16), 150.67 (C-17), 172.8 (CH₃CH₂COO-), 189.59 (C-20), 209.05 (C-3), 209.94 (C-6). EM-FAB (6 eV) m/z 417 [M+H]⁺.

6.1.2.15.3 Caracterización de la 21-benzoiloxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16c)



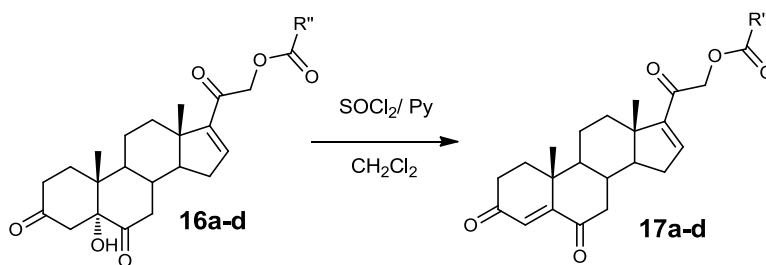
Rendimiento 78%, P.F. 203-205 °C. UV (nm): 234. IR (cm⁻¹): 3324, 2928, 1711, 1679. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.92 (s, 3 H, H-18), 1.25 (s, 3 H, H-19), 2.88 (s, 2 H, H-4), 3.6 (s, 1 H, -OH), 5.13 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.27 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 6.83 (s, 1 H, H-16), 7.46 (t, *J*= 8 Hz, 2 H, H-Ar), 7.5 (m, 1 H, H-Ar), 8.1 (d, *J*=8 Hz, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.05 (C-18), 15.95 (C-19), 68.15 (C-21), 82.72 (C-5), 128.41 (C-Ar), 128.78 (C-Ar), 129.91 (C-Ar), 130.88 (C-Ar), 132.41 (C-Ar), 133.31 (C-Ar), 143.54 (C-16), 151.66 (C-17), 167.7 (-COO), 190.38 (C-20), 210.22 (C-3), 210.9 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 465 [M+H]⁺.

6.1.2.15.4 Caracterización de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16d)



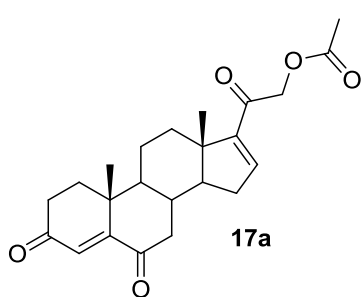
Rendimiento 86%, P.F. 135-136 °C. UV (nm): 235. IR (cm⁻¹): 3332, 2950, 1710, 1685. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.95 (s, 3 H, H-18), 1.04 (s, 3 H, H-19), 2.8 (m, 2 H, H-4), 3.89 (s, 1 H, -OH), 5.12 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.26 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 6.81 (s, 1 H, H-16), 7.13 (t, *J*= 8 Hz, 2 H, H-Ar), 8.12 (m, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.82 (C-18), 15.98 (C-19), 66.1 (C-21), 82.77 (C-5), 115.52 (C-Ar), 125.68 (C-Ar), 132.59 (C-Ar), 143.62 (C-16), 151.68 (C-17), 165.09 (-COO), 167.28 (C-Ar), 190.26 (C-20), 210.18 (C-3), 210.87 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 483 [M+H]⁺.

6.1.2.16 Metodología general para la síntesis de las dicetonas conjugadas 17a-d



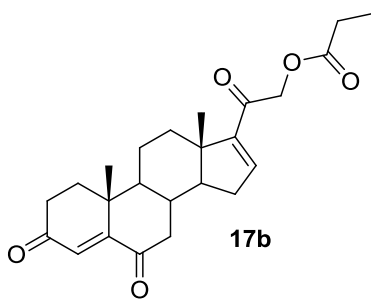
En un matraz bola de 10 mL bajo atmósfera inerte (N_2) se disolvió 1 mmol de esteroide (**16a-d**) en 4 mL de CH_2Cl_2 y 0.4 mL de piridina, la mezcla se enfrió en baño de hielo, y se adicionó 0.1 mL de cloruro de tionilo. La reacción se agitó durante dos horas, posteriormente se agregó 10 mL de una solución acuosa de HCl al 10% y se dejó en agitación por 30 minutos. Se separó la fase orgánica, se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (3×25 mL), y con agua destilada (3×25 mL), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró en un rotaevaporador. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna usando gel de sílice y como eluyente hexano-acetato de etilo 85:15 obteniéndose rendimientos que van del 82-87%.

6.1.2.16.1 Caracterización de la 21-acetoxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (17a)



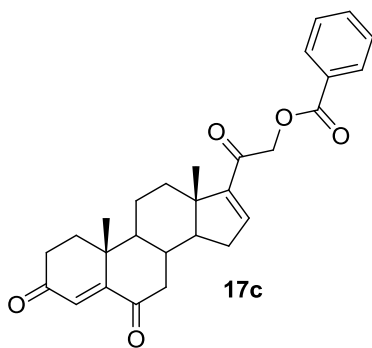
Rendimiento 87%, P.F. 215-217 °C. UV (nm): 246. IR (cm^{-1}): 2942, 1745, 1677. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.98 (s, 3 H, H-18), 1.21 (s, 3 H, H-19), 2.19 (s, 3 H, -COOCH₃), 4.9 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.3 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 6.2 (s, 1 H, H-4), 6.76 (s, 1 H, H-16). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 15.84 (C-18), 17.45 (C-19), 20.6 (CH₃COO-), 65.57 (C-21), 125.81 (C-4), 143.16 (C-16), 151.37 (C-17), 160.41 (C-5), 170.34 (CH₃COO-), 190.3 (C-20), 199.18 (C-3), 201.2 (C-6). EM-FAB (6 eV) m/z 385 $[M+H]^+$.

6.1.2.16.2 Caracterización de la 21-propionoxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (17b)



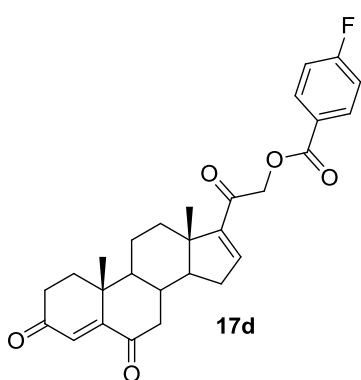
Rendimiento 83%, P.F. 212-215 °C. UV (nm): 242. IR (cm⁻¹): 2940, 1743, 1671. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.97 (s, 3 H, H-18), 1.0 (s, 3 H, H-19), 1.12 (m, 3 H, -COOCH₂CH₃), 2.4 (m, 2 H, -COOCH₂CH₃), 4.8 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.2 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 6.2 (s, 1 H, H-4), 6.67 (s, 1 H, H-16). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 9.95 (COOCH₂CH₃), 14.9 (C-18), 16.1 (C-19), 26.2 (CH₃ CH₂COO-), 64.3 (C-21), 125.5 (C-4), 142.1 (C-16), 150.6 (C-17), 160.2 (C-5), 172.8 (CH₃CH₂COO-), 189.7 (C-20), 199.1 (C-3), 201.0 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 399 [M+H]⁺.

6.1.2.16.3 Caracterización de la 21-benzoiloxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (17c)



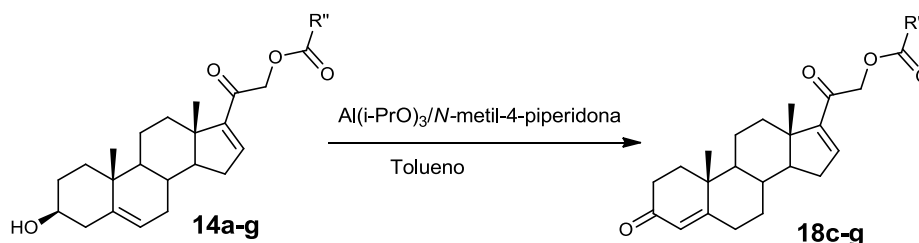
Rendimiento 83%, P.F. 165-167 °C. UV (nm): 243. IR (cm⁻¹): 2930, 1721, 1683. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.13 (s, 3 H, H-18), 1.18 (s, 3 H, H-19), 5.08 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.2 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 6.13 (s, 1 H, H-4), 6.78 (s, 1 H, H-16), 7.36 (s, 2 H, H-Ar), 7.52 (m, 1 H, H-Ar), 8.05 (s, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.8 (C-18), 16.45 (C-19), 67.14 (C-21), 124.8 (C-4), 127.43 (C-Ar), 128.89 (C-Ar), 129.8 (C-Ar), 132.3 (C-Ar), 142.3 (C-16), 150.3 (C-17), 159.51 (C-5), 165.0 (COO-), 189.3 (C-20), 198.3 (C-3), 200.4 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 447 [M+H]⁺.

6.1.2.16.4 Caracterización de la 21-(*p*-fluor)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (17d)



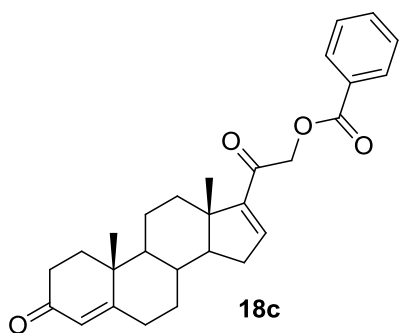
Rendimiento 82%, P.F. 182-185. UV (nm): 244. IR (cm⁻¹): 2942, 1722, 1681. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.0 (s, 3 H, H-18), 1.21 (s, 3 H, H-19), 5.14 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.26 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 6.2 (s, 1 H, H-4), 6.8 (s, 1 H, H-16), 7.13 (s, 2 H, H-Ar), 8.11 (s, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.9 (C-18), 17.4 (C-19), 66.0 (C-21), 115.5 (C-Ar), 115.7 (C-Ar), 125.8 (C-4), 127.6 (C-Ar), 132.4 (C-Ar), 143.3 (C-16), 151.4 (C-17), 160.4 (C-5), 165.0 (C=O), 167.0 (C-Ar), 190.1 (C-20), 199.2 (C-3), 201.3 (C-6). EM-FAB (6 eV) *m/z* 465 [M+H]⁺.

6.1.2.17 Metodología general para la síntesis de las cetonas conjugadas 18c-g



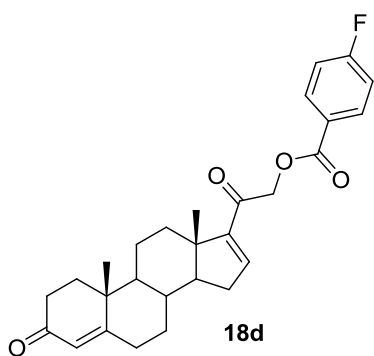
En un matraz bola de 100 mL conectado a un sistema dean-stark, se disolvió 1 mmol del esteroide **14a-g** en 40 mL de tolueno y se agregó 2.3 mL de *N*-metil-4-piperidona (20 mmol), posteriormente se destilaron 10 mL de tolueno para eliminar el agua de la reacción. En seguida se adicionó el *i*-propoxido de aluminio (1.02 g, 5 mmol) y se destilaron otros 10 mL de tolueno. La reacción se dejó en agitación y reflujo por 18 horas. La mezcla de reacción se disolvió en 50 mL de acetato de etilo y se agregó una solución de HCl al 15%, se agitó por 30 minutos y la fase orgánica se separó y lavó nuevamente con solución ácida (1×30 mL), con una solución saturada de bicarbonato de sodio (3×30 mL) y con agua destilada (3×30 mL), la fase orgánica se evaporó y el crudo de reacción se purificó mediante columna cromatográfica usando un sistema de elución hexano-acetato de etilo (9:1). Los rendimientos van del 58-65%.

6.1.2.17.1 Caracterización de la 21-benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (18c)



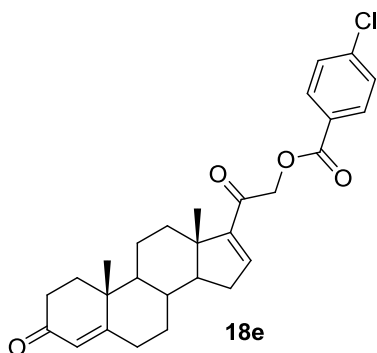
Rendimiento 63%, P.F. 192-194 °C. UV (nm): 236. IR (cm⁻¹): 2953, 1727, 1672. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.98 (s, 3 H, H-18), 1.21 (s, 3 H, H-19), 5.11 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.27 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.73 (s, 1 H, H-4), 6.83 (s, 1 H, H-16), 7.4 (t, *J*= 8 Hz, 2 H, H-Ar), 7.57 (t, *J*= 8 Hz, 1 H, H-Ar), 8.09 (t, *J*=8 Hz, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.96 (C-18), 20.7 (C-19), 66.03 (C-21), 124.03 (C-4), 128.38 (C-Ar), 129.89 (C-Ar), 133.26 (C-Ar), 143.74 (C-16), 151.35 (C-17), 166.01 (C=O), 170.65 (C-5), 190.38 (C-20), 199.39 (C-3). EM-FAB (6 eV) *m/z* 433 [M+H]⁺.

6.1.2.17.2 Caracterización de la 21-(*p*-fluoro)benziloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (18d)



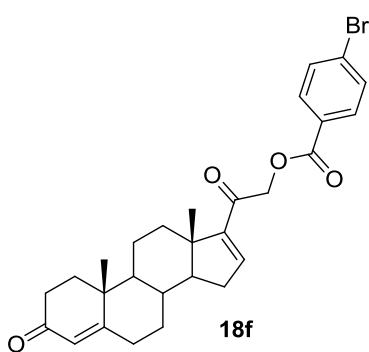
Rendimiento 61%, P.F. 148-150 °C. UV (nm): 237. IR (cm⁻¹): 2929, 1728, 1678. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.87 (s, 3 H, H-18), 1.15 (s, 3 H, H-19), 5.15 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.3 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.67 (s, 1 H, H-4), 6.63 (s, 1 H, H-16), 7.3 (m, 2 H, H-Ar), 8.1 (m, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.78 (C-18), 19.73 (C-19), 67.15 (C-21), 114.45 (C-Ar), 122.97 (C-4), 127.78 (C-Ar), 129.86 (C-Ar), 131.45 (C-Ar), 143.08 (C-16), 154.14 (C-17), 166.74 (C=O), 169.91 (C-Ar), 170.1 (C-5), 195.69 (C-20), 198.51 (C-3). EM-FAB (6 eV) *m/z* 451 [M+H]⁺.

6.1.2.17.3 Caracterización de la 21-(*p*-cloro)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (18e)



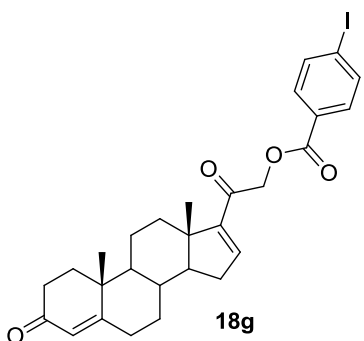
Rendimiento 65%, P.F. 157-159 °C. UV (nm): 241. IR (cm⁻¹): 2931, 1727, 1676. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.89 (s, 3 H, H-18), 1.15 (s, 3 H, H-19), 5.04 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.2 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.67 (s, 1 H, H-4), 6.76 (s, 1 H, H-16), 7.36 (d, *J*= 8 Hz, 2 H, H-Ar), 7.98 (d, *J*= 8 Hz, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.99 (C-18), 19.73 (C-19), 67.16 (C-21), 123.04 (C-4), 127.77 (C-Ar), 129.85 (C-Ar), 130.29 (C-Ar), 142.9 (C-Ar), 143.22 (C-16), 150.8 (C-17), 169.6 (C=O), 170.6 (C-5), 196.3 (C-20), 199.1 (C-3). EM-FAB (6 eV) *m/z* 467 [M+H]⁺.

6.1.2.17.4 Caracterización de la 21-(*p*-bromo)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (18f)



Rendimiento 60%, P.F. 161-163 °C. UV (nm): 239. IR (cm⁻¹): 2929, 1727, 1677. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.94 (s, 3 H, H-18), 1.16 (s, 3 H, H-19), 5.1 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.25 (d, *J*=16 Hz, 1 H, H-21), 5.67 (s, 1 H, H-4), 6.77 (s, 1 H, H-16), 7.6 (d, *J*= 8 Hz, 2 H, H-Ar), 7.7 (d, *J*= 8 Hz, 2 H, H-Ar). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 15.1 (C-18), 19.9 (C-19), 67.5 (C-21), 124.1 (C-4), 127.1 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 130.1 (C-Ar), 132.4 (C-Ar), 144.3 (C-16), 153.9 (C-17), 166.3 (C=O), 170.3 (C-5), 196.4 (C-20), 199.1 (C-3). EM-FAB (6 eV) *m/z* 511 [M+H]⁺.

6.1.2.17.5 Caracterización de la 21-(*p*-yodo)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (18g)



Rendimiento 58%, **P.F.** 186-188 °C. **UV** (nm): 242. **IR** (cm^{-1}): 2932, 1729, 1675. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.97 (s, 3 H, H-18), 1.15 (s, 3 H, H-19), 5.03 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.19 (d, $J=16$ Hz, 1 H, H-21), 5.66 (s, 1 H, H-4), 6.74 (s, 1 H, H-16), 7.8 (d, $J=8$ Hz, 2 H, H-Ar), 7.88 (d, $J=8$ Hz, 2 H, H-Ar). **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.9 (C-18), 19.6 (C-19), 67.0 (C-21), 98.5 (C-Ar), 124.1 (C-4), 129.3 (C-Ar), 130.9 (C-Ar), 137.5 (C-Ar), 144.0 (C-16), 154.1 (C-17), 167.3 (COO-), 169.9 (C-5), 197.2 (C-20), 199.0 (C-3). **EM-FAB** (6 eV) m/z 559 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6.2 Parte biológica

6.2.1 Ensayo *in vitro*, citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas

Para analizar las series de compuestos **6a-e**, **7a-e**, **8a-e**, **17a-d** y **18c-g** se utilizaron tres líneas celulares cancerosas humanas (próstata, mama y pulmón) que fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI). Dichas células se cultivaron en el medio RPMI-1640, enriquecido con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL Penicilina G, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sulfato de estreptomicina, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B y 1% de aminoácidos no esenciales; se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

Posteriormente se tomó 100 μL de la línea celular correspondiente, el contenido de células por pozo varía entre 5000 a 10 000 dependiendo de la línea celular; se incubó por 24 h. Se preparó una solución stock en dimetilsulfóxido (DMSO) de cada compuesto a evaluar, dicha solución se adicionó a cada pozo de las líneas celulares en 100 μL de medio de cultivo, siendo la concentración final de cada compuesto de 50 μM y se incubó por 48 horas (plato experimental). Adicionalmente se preparó otro pozo al cuál se adicionó únicamente medio de cultivo, éste último se incubó por 1 hora (plato basal); ambas

incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C en atmósfera con 5% CO₂ y 100% de humedad relativa.

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

Finalmente, se determinó la densidad óptica a 515 nm utilizando un lector de ELISA. Los resultados del análisis primario se muestran en la Tabla 5.12 en la sección de análisis de resultados.

6.2.2 Pruebas de inhibición de la enzima 5 α -reductasa

6.2.2.1 Material biológico

Cuatro horas después de que un hombre de 57 años murió debido a un infarto del miocardio, su próstata normal fue extirpada en el Departamento de Patología del Hospital General de la Ciudad de México el protocolo fue aprobado por el comité de ética de este mismo hospital.

El material fue lavado e inmediatamente después fue enfriado con hielo en una solución de NaCl 150 mM y almacenada a -20 °C. La próstata humana fue descongelada, enjuagada y homogeneizada utilizando el medio A (20 mM fosfato de sodio, 0.32 M sucrosa, 0.1 mM ditiotretitol, pH= 6.5) con un molino de análisis básico IKA₁ A11 (Equipo de laboratorio IKA). A menos que otra cosa sea especificada, los procedimientos se llevaron a cabo a 4 °C.

6.2.2.1.1 Enzima 5 α -reductasa tipo 2

La próstata humana se usó para este experimento porque este tejido es abundante de esta isoforma de la enzima. La isoforma tipo 1 no es tan abundante como la 2 en este órgano. El tejido prostático fue homogeneizado en un equipo Ultra-Turrax IKA, T18. Los homogeneizados se centrifugaron (1500g, 60 min) en un rotor SW60 Ti. Los pellets se resuspendieron en el medio A y se almacenaron a -70 °C. Esta suspensión tuvo una concentración final de 5 mg de proteína/mL, la cual fue determinada por el método de Bradford.⁷⁸

6.2.2.1.2 Enzima 5 α -reductasa tipo 1

Todos los procedimientos que conllevan el uso de animales fueron aprobados por el comité institucional de uso y cuidado de animales de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Dos ratas adultas (de 8 meses) fueron sometidas a ayuno durante la noche para reducir los niveles de glicógeno antes de que los hígados fueran extraídos para usarlos como recurso de la enzima 5 α -reductasa tipo 1, como se recomienda por Levy y colaboradores.⁷⁹ Para preparar los microsomas, los hígados (30g) fueron triturados en un volumen del medio A, usando el molino de tejidos. El tejido se homogeneizó y la suspensión fue centrifugada (10000g; 30 min; 0 °C) en una centrifuga Beckman L70K obteniéndose un pellet. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de nailon (tamaño de poro de 11mm) y se centrifugó (100000g; 60 min). El pellet microsomal fue resuspendido en cinco volúmenes del medio A con un homogeneizador y la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. La suspensión se recentrifugó (100000g, 30 min) y el pellet fue resuspendido en el medio A para dar una concentración final de 20 mg de proteína/mL. La suspensión microsomal se guardó a -80 °C.

6.2.2.1.3 Hámsters machos gonadectomizados

Para los experimentos *in vivo* se usaron 24 machos adultos Sirian Golden (2.5 meses de edad, entre 150-200g). Después de ser gonadectomizados bajo anestesia usando isoflurano, se les permitió recuperarse durante 30 días antes de la prueba. Los hámsters permanecieron en una habitación con temperatura controlada (22 °C) y periodos de luz-obscuridad de 12 horas. La comida y agua fue suministrada *ad libitum*.

6.2.2.2 Sustancias y equipos

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

6.2.2.3 Determinación de la concentración inhibitoria 50% (CI₅₀) de la enzima 5α-reductasa tipo 1 y 2 en glándulas prostáticas humanas

Para cada uno de los compuestos se preparó una serie de tubos en los cuales se utilizaron 6 series de tubos de ensaye conteniendo concentraciones crecientes (10^{-10} – 10^{-4} M) disueltos en metanol y conteniendo T [³H] a una concentración final de 2 nM; así mismo se incluyeron tubos controles a los que sólo se adicionó T [³H] a una concentración final de 2 nM. Los tubos se colocaron en baño de agua y en atmósfera de nitrógeno hasta evaporar totalmente el disolvente; enseguida se añadió 720 µL de buffer de fosfatos (40mM), pH= 6.5, 80 µL de fracción microsomal, que contenía 360 µg/mL de proteína. Posteriormente se adicionaron 100 µL de DTT (1mM) y 100 µL de NADPH (2mM) con los que se dio inicio la reacción.

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

Para la visualización de los estándares, las placas se observaron bajo luz UV ($\lambda = 254$ 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), después, los pedazos de sílice se colocaron en viales en donde se les adicionó 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold (Packard) y finalmente se leyó la radiactividad producida por la DHT [³H] en el analizador de centelleo. La actividad de la enzima se calculó en base a los controles que se incubaron en presencia únicamente de T [³H]. Cada experimento se realizó por duplicado. En la Tabla 5.14 se muestran los resultados obtenidos.

6.2.2.4 Ensayo *in vivo*

El efecto antiandrogénico de los esteroides sobre el peso de la próstata de hámsters machos castrados de la cepa Syrian Golden, se determinó en 6 grupos de 4 animales por experimento. Diariamente por 6 días se les administró subcutáneamente:

- Grupo control 1: 200 μ L de aceite de sésamo (vehículo).
- Grupo control 2: 200 μ g de testosterona en 200 μ L de aceite de sésamo.
- Grupo control 3: 200 μ g de testosterona más 200 μ g de finasterida en 200 μ L de aceite de sésamo.
- Grupos experimentales (4-6) 200 μ g de testosterona en 200 μ L de aceite de sésamo más 400 μ g de los compuestos **14d**, **15d** y **17d**.

Después del tratamiento, los hámsters se sacrificaron con CO₂ y posteriormente se realizó la disección de las próstatas para ser pesadas.

Los **órganos flanco** son dos nódulos pigmentados localizados en la superficie de la piel dorsal del hámster. En los machos miden alrededor de 8 mm mientras que en las hembras mide solamente 2 mm. En los machos estos nódulos disminuyen después de la castración, sin embargo, las inyecciones diarias o aplicaciones tópicas de testosterona o dihidrotestosterona lo regresan a su tamaño original. Los órganos flanco son capaces de metabolizar la testosterona a dihidrotestosterona en los hámsters castrados como en los no castrados.

Las **vesículas seminales** son glándulas anexas al aparato reproductor masculino, en los hámsters castrados, su tamaño disminuye y al igual que los órganos flanco son andrógeno-dependientes. Las vesículas seminales son capaces de reducir la testosterona a dihidrotestosterona, tanto en hámsters castrados como en los no castrados.

En la Tabla 5.15 se muestran los resultados obtenidos de las tres mediciones realizadas.

7. CONCLUSIONES

El compuesto **17d** presentó una potencia 47 veces mayor que el fármaco del mercado finasterida en inhibición de la enzima 5 α -reductasa tipo 2. En pruebas *in vivo* tiene una actividad similar a este fármaco por lo que se puede concluir que tiene efectos antiandrogénicos parecidos pero el mecanismo por el que se dirige mayormente es precisamente por el de la inhibición de la enzima, así que se puede predecir por estos resultados que los efectos secundarios que produce la finasterida se verían reducidos al usar el compuesto **17d** como tratamiento contra el cáncer de próstata o la hiperplasia prostática benigna, aunque aún faltaría realizar otras pruebas biológicas para tener la certeza de este hecho.

Mediante la determinación de los Log P teóricos de los compuestos sintetizados se comprueba la hipótesis de que las funciones ésteres y carbamatos aumentan la lipofilia de estas moléculas en comparación con el compuesto pregna-4,6-dien-4,6,20-triona que fue el compuesto de referencia junto con la finasterida. A su vez los resultados obtenidos en pruebas biológicas muestran que la lipofilia no es la propiedad responsable de dar la actividad biológica *in vivo* a las moléculas.

Los compuestos **7b**, **17d** y **18d** mostraron los porcentajes de inhibición de crecimiento más altos en las tres líneas celulares probadas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.*, 65, **2015**, p. 5-29.
2. <http://consulta.mx/index.php/estudios-e-investigaciones/el-mundo/item/358-estadisticas-dia-mundial-contra-el-cancer-4-de-febrero-inegi>, página consultada el 6 de noviembre de **2015**, 11:00 a.m.
3. Devlin TM, Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. Tercera edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona **1999**.
4. Murray RK, Mayes PA, Granner DK. Bioquímica de Harper. Decimocuarta edición. Editorial Manual Moderno. México D.F. **1997**.
5. Hicks JJ. Bioquímica. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México D.F. **2000**.
6. Albarrán J. Endocrinología. Editorial Médica Panamericana. Madrid **2001**.
7. Beato M, Chavez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*, 61 (4), **1996**, p. 240–251.
8. Hammes SR. The further redefining of steroid-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100 (5), **2003**, p. 21680–21700.
9. Prieto GA, Villamar-Cruz O, Saqui-Salces M, Neri-Gómez T, Almaraz-Nieves A, Hernández-Molina VI, Valdez H, Camacho-Arroyo I. Cómo actúan las hormonas esteroides? *Educación química*, 14(4), **2003**, p. 196-201.
10. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological Actions of Androgens. *Endocr. Rev.*, 8(1), **1987**, p. 1-28.
11. Agur MR, Dalley F, Grant. Atlas de Anatomía. Onceava edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, **2007**.
12. Randall VA. Role of 5 α -reductase in health and disease. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.*, 8, **1994**, p. 405–431.
13. Baillargeon J, Rose DP. Obesity, adipokines, and prostate cancer (Review). *Int. J. Oncol.*, 28, **2006**, p. 737-745.
14. Pienta KJ, Esper PS. Risk Factors for Prostate Cancer. *Ann Intern Med*, 118, **1993**, p. 793-803.

15. Carter HB, Epstein JI, Partin AW. Influence of age and prostate-specific antigen on the chance of curable prostate cancer among men with nonpalpable disease. *Urology*, 53 (1), **1999**, p. 126-130.
16. Briganti A, Spahn M, Joniau S, Gontero P, Bianchi M, Kneitz B, Chun F, Sun M, Graefen M, Abdollah F, Marchioro G, Frohenberg D, Giona S, Frea B, Karakiewicz PI, Montorsi F, Poppel HV, Karnes RJ. Impact of Age and Comorbidities on Long-term Survival of Patients with High-risk Prostate Cancer Treated with Radical Prostatectomy: A Multi-institutional Competing-risks Analysis. *Eur. Urol.*, 63, **2013**, p. 693–701.
17. Pietzak EJ, Arsdalen KV, Patel K, Malkowicz SB, Wein AJ, Guzzo TJ. Impact of Race on Selecting Appropriate Patients for Active Surveillance With Seemingly Low-risk Prostate Cancer. *Urology*, 85 (2), **2015**, p. 436-441.
18. Vertosick EA, Poon BY, Vickers AJ. Relative Value of Race, Family History and Prostate Specific Antigen as Indications for Early Initiation of Prostate Cancer Screening. *J. Urol.*, 192, **2014**, p. 724-729.
19. Elshafei A, Moussa AS, Hatem A, Ethan V, Panumatrassamee K, Hernandez AV, Jones JS. Does Positive Family History of Prostate Cancer Increase the Risk of Prostate Cancer on Initial Prostate Biopsy? *Urology*, 81 (4), **2013**, p. 826-830.
20. Liss MA, Chen H, Hemal S, Krane S, Kane CJ, Xu J, Kader AK. Impact of Family History on Prostate Cancer Mortality in White Men Undergoing Prostate Specific Antigen Based Screening. *J. Urol.*, 193, **2015**, p. 75-79.
21. Sridhar G, Masho SW, Adera T, Ramakrishnan V, Roberts JD. Association between family history of cancers and risk of prostate cancer. *J. Men's Health*, 7(1), **2010**, p. 45–54.
22. Nelson WG, M. De Marzo A, Dewese TL, Isaacs WB. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer, *J Urol*, 172, **2004**, p. S6 –S12.
23. Swallow T, Kirby R.S. Cancer of the prostate gland. *Surg. (Med. Publish)*, 26(5), **2008**, p. 213-217.
24. Crawford ED, Deantoni EP, Etzioni R, Schaefer VC, Olson RM, Ross CA. The prostate cancer education council, serum prostate-specific antigen and digital rectal

- examination for early detection of prostate cancer in a national community-based program. *Urology*, 47 (6), **1996**, p. 863-869.
25. Programa de Acción: Cáncer de próstata, Secretaría de Salud, **2001**, bibliotecas.salud.gob.mx
26. Qaseem A, Barry MJ, Denberg TD, Owens DK, Shekelle P. Screening for Prostate Cancer: A Guidance Statement From the Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. *Ann. Intern. Med.*, 158, **2013**, p. 761-769.
27. Loeb S, Berglund A, Stattin P. Population Based Study of Use and Determinants of Active Surveillance and Watchful Waiting for Low and Intermediate Risk Prostate Cancer. *J. Urol.*, 190, **2013**, p. 1742-1749.
28. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick AA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A. Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer, *JAMA*. 280(11), **1998**, p. 969-974.
29. Gilligan T, Kantoff PW. Chemotherapy for prostate cancer. *Urol* 60, **2002**, p. 94–100.
30. Musé DI, Sabini G. Hormonoterapia del cáncer de próstata. Proyecciones clínico terapéuticas. *Rev. Med. Urug.*, 17, **2001**, p. 5-9.
31. Dipaola RS, Zhang H, Lambert GH, Meeker R, Licitra E, Rafi MM, Zhu BT, Spaulding h, Goodin S, Toledano MB, Hait WN, Gallo MA. Clinical and biologic activity of an estrogenic herbal combination (pc-spes) in prostate cancer. *The New Engl. J. Med.*, 339(12), **1998**, p. 785-791.
32. Tomera K, Gleason D, Gittelman M, Moseley W, Zinner N, Murdoch M, Menon M, Champion M, Garnick MB. The gonadotropin-releasing hormone antagonist abarelix depot versus luteinizing hormone releasing hormone agonists leuprolide or goserelin: initial results of endocrinological and biochemical efficacies in patients with prostate cancer. *J. Urol.*, 165(5), **2001**, p. 1585-1589.
33. Harris KA, Weinberg V, Bok RA, Kakefuda M, Small EJ. Low dose ketoconazole with replacement doses of hydrocortisone in patients with progressive androgen independent prostate cancer. *J. Urol.*, 168, **2002**, p. 542–545.

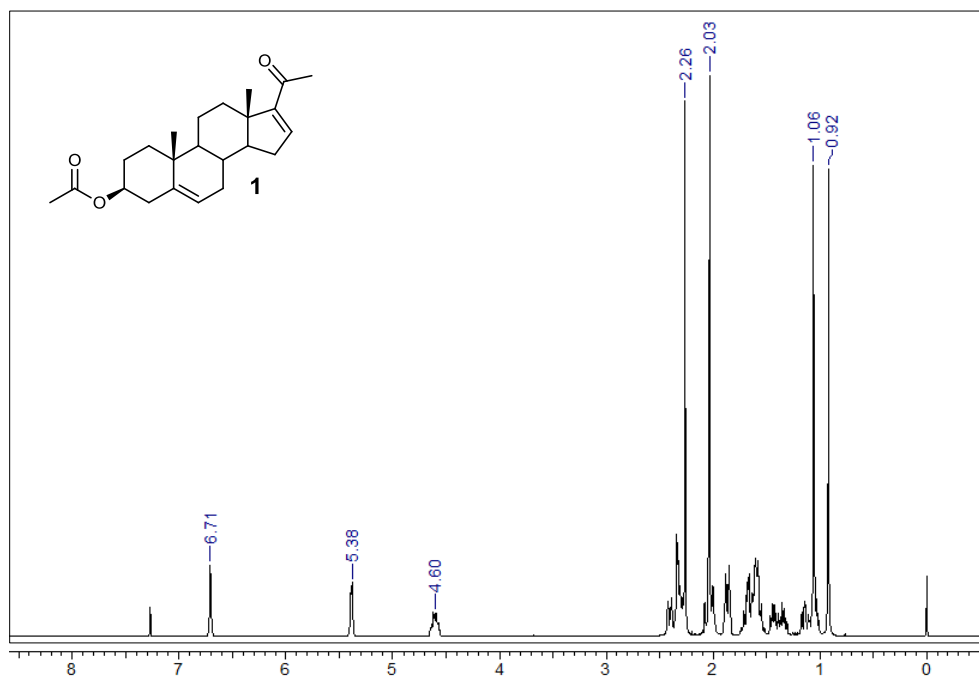
34. Attard G, Reid AHM, Yap TA, Raynaud F, Dowsett M, Settatree S, Barret M, Parker C, Martins V, Folkerd E, Clark J, Cooper CS, Kaye SB, Dearnaley D, Lee G, De Bono JS. Phase I Clinical Trial of a Selective Inhibitor of CYP17, Abiraterone Acetate, Confirms That Castration-Resistant Prostate Cancer Commonly Remains Hormone Driven. *J. Clin. Oncol.*, 26, **2008**, p. 4563-4571.
35. Wirth MP, Hakenberg OW, Froehner M. Antiandrogens in the Treatment of Prostate Cancer. *Eur. Urol.*, 51, **2007**, p.306–314.
36. Zalles M, Carvajal E. Hipertrofia prostática, *Rev. Paceaña Med. Fam.*, 3(4), **2006**, p. 74-77.
37. Bechis SK, Otsetov AG, Ge R, Wang Z, Vangel MG, Wu CL, Tabatabaei S, Olumi AF. Age and Obesity Promote Methylation and Suppression of 5 α -Reductase 2: Implications for Personalized Therapy of Benign Prostatic Hyperplasia. *J. Urol.*, 194, **2015**, p. 1031-1037.
38. Sitteri PK, Wilson JD, Mayfield JA, Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy I. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic prostate of man. *J. Clin. Inv.*, 49, **1970**, p. 1737-1745.
39. Lowe FC. Role of the Newer Alpha-Adrenergic-Receptor Antagonists in the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia-Related Lower Urinary Tract Symptoms. *Clin. Ther.*, 26(11), **2004**, p. 1701-1713.
40. MacNaughton M, Barry MJ. Diagnosis and Treatment of Benign Prostatic. *J. Gen. Intern. Med.*, 12, **1997**, p. 224-229.
41. Lepor H. Medical therapy for benign prostatic hyperplasia, *Urology*, 42(5), **1993**, p. 483-501.
42. Debruyne F, Koch G, Boyle P, Da Silva FC, Gillenwater JG, Hamdy FC, Perrin P, Teillac P, Vela-Navarrete R, Raynaud JP. Comparison of a Phytotherapeutic Agent (Permixon) with an α -Blocker (Tamsulosin) in the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia: A 1-Year Randomized International Study. *Eur. Urol.*, 41(5), **2002**, p. 497–507.
43. Mc Connel J, Wilson JD. Finasteride an inhibitor of 5-alpha reductase, suppresses prostatic dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74, **1992**, p. 505-509.

44. Jenkins EP, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson JW, Russell DW. Genetic and Pharmacological Evidence for More Than One Human Steroid 5 α -Reductase. *J. Clin. Invest.*, 89, **1992**, p. 293-300.
45. Russell WD, Wilson JD. Steroid 5- α reductase: two genes/two enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 63, **1994**, p. 25-61.
46. Xun Li, Cailin Chen, Shankar M. Singh, and Fernand Labire. The enzyme and inhibitors of 4-ene-3-oxosteroid 5 α -oxidoreductase. *Steroids*, 60, **1995**, p. 430-441.
47. Gormley GJ, Stoner E, Bruskeewis RC. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. *N. Engl. J. Med.*, 372, **1992**, p. 1185-1191.
48. Li X, Shankar M, Cote J, Laplante S, Verlleux R, Labrie F. Synthesis and in vitro evaluation substituted N-(1,1-dimethyl)-3-oxo-4-androstene-17 β -carboxamides as reductase inhibitors and antiandrogens. *J. Med. Chem.*, 38, **1995**, p. 1456-1461.
49. Ajdukovic JJ, Djurendic EA, Petri ET, Klisuric OR, C'elic AS, Sakac MN, Jakimov DS, Penov Gaši KM. 17 (E)-Picolinylidene androstane derivatives as potential inhibitors of prostate cancer cell growth: Antiproliferative activity and molecular docking studies. *Bioorg. Med. Chem.*, 21, **2013**, p. 7257-7266.
50. Rojas A. Síntesis de ésteres halogenados de pregnadieno con un grupo metilo en C-16, Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM, **2006**.
51. Ramírez E. Síntesis de 17 α -Aciloloxi derivados del pregnano con un sustituyente en C-16 β como antiandrógenos, Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM **2002**.
52. Cabeza M, Gutiérrez E, Miranda R, Heuze I, Bratoeff E, Flores G, Ramírez E. Androgenic and antiandrogenic effects of progesterone derivatives with different halogen as substituent of the C-6 position. *Steroids*, 64, **1999**, p. 413-421.
53. Shapiro E, Legatt T, Weber L, Steinberg M, Watnick A, Eisler M. 16-Alkylated progesterones. *J. Med. Chem.*, 5, **1962**, p. 975-988.
54. Ramírez E, Cabeza M, Heuze I, Gutiérrez E, Bratoeff E. Synthesis and pharmacological evaluation of new 16-methyl pregnane derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, 50, **2002**, p. 15-20.
55. Chávez A. Síntesis y evaluación biológica de nuevos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa basados en la estructura del pregnano con un grupo éster en C-3, Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM **2012**.

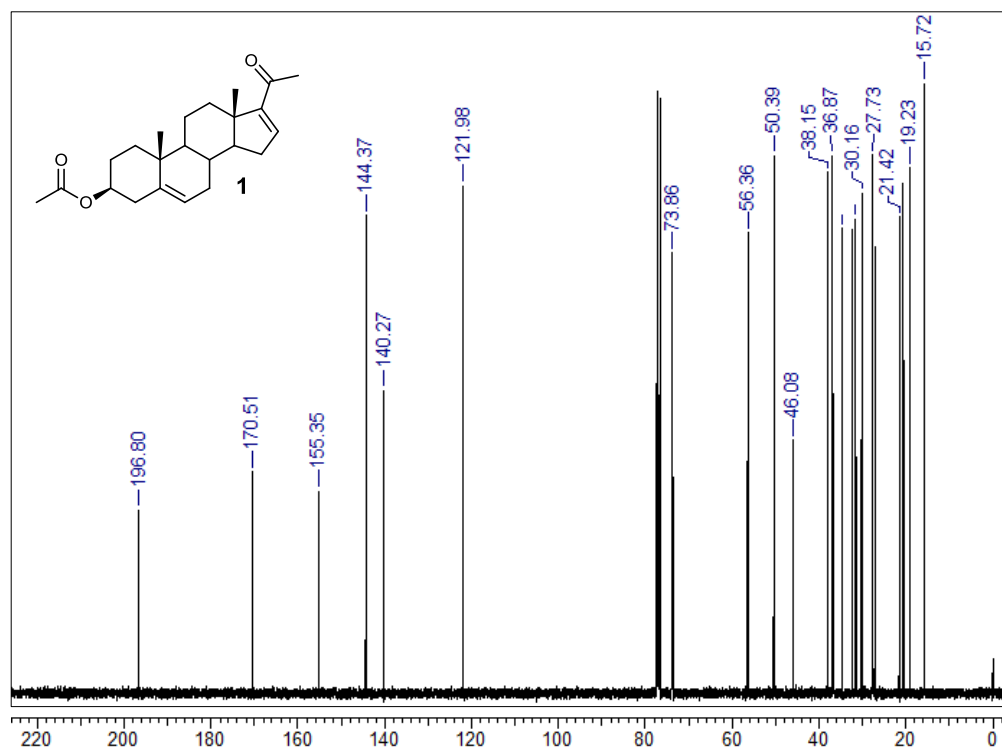
56. Mendoza ME. Síntesis y evaluación biológica de derivados de deshidroepiandrosterona con un grupo azol en C-17 y ésteres de cinamoilo en C-3, Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM **2015**.
57. Sanabria EE. Síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados del pregnano con una función éster en C-3 como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM **2014**.
58. Rojas CA. Síntesis de nuevos derivados esteroidales basados en el esqueleto del pregnano con un grupo éster de ácido nicotínico en C-3 y su actividad citotóxica. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM **2014**.
59. Arellano GY. Nuevos derivados de la deshidroepiandrosterona como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa y/o antagonistas del receptor androgénico. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM **2013**.
60. Nieves GJ. Síntesis de derivados de la deshidroepiandrosterona con un grupo metoxilo en la posición C-17 y un grupo éster en 3 β - como posibles inhibidores de la enzima 5 α -reductasa y/o antagonistas del receptor androgénico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM **2012**.
61. Cruz AA. Síntesis de derivados de la progesterona con un grupo éster en C-3 como antiandrógenos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM **2006**.
62. Pérez V, Cabeza M, Bratoeff E, Heuze I, Sánchez M, Ramírez E, Naranjo E. New 5 α -reductasa inhibitors: In vitro and in vivo effects. *Steroids*, 70, **2005**, p. 217-224.
63. Fieser LF, Fieser M. *Steroids*. Reinhold Publishing Corporation. Nueva York **1959**.
64. Rosado A. Síntesis de análogos de brasinoesteroides portadores de la agrupación 5 α -hidroxi-6-oxo. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM **2013**.
65. Neises B, Steglich W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 17, **1978**, p. 522-524.
66. Kamernitzky A, Turuta A, Fadeeva T, Istomina Z. Use of diacetoxyphenyliodine for α -hidroxilación of 20-oxosteroids fused with heterocycles in position 16 α ,17 β . *Synthesis*, 3, 1985, p. 326-328.
67. Corey EJ, A. Venkateswarlu. Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 94(17), **1972**, p. 6190-6191.

68. Patschinski P, Zhang C, and Zipse H. The Lewis Base-Catalyzed Silylation of Alcohols-A Mechanistic Analysis. *J. Org. Chem.*, 79, **2014**, p. 8348-8357.
69. Zhdankin V. Hypervalent iodine (III) reagents in organic Synthesis. *ARKIVOC*, I, **2009**, p. 1-6.
70. Acevedo LI. Síntesis de nuevos derivados del pregnano con un grupo éster en el C-21 y evaluación antiproliferativa. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM **2015**.
71. Cole W, Julian P. Reductions of epoxy ketones by chromous salts. *J. Org. Chem.*, 19, **1954**, p.131-138.
72. Kochi JK, Singleton DM, Andrews LJ, Alkenes from halides and epoxides by reductive eliminations with Cr^{II} complexes. *Tetrahedron*, 24, **1968**, 3503-3515.
73. Encinas S. Estudio de reacciones radicalarias entre epóxidos y sulfonas promovidas por Titanoceno. Síntesis de un fragmento molecular de Azadiradiona. Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Salamanca. **2014**
74. Reyes A. Síntesis y evaluación antiproliferativa de compuestos híbridos del pregnano con AINES en C-21. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM **2015**.
75. Djerassi C. Oppenauer oxidation. *Org. React.*, 6, **1951**, p. 207-272.
76. Purser S, Moore PR, Swallowb S, Gouverneur V. Fluorine in medicinal chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, 37, **2008**, p. 320–330.
77. Olsen JA, Banner DW, Seiler P, Wagner B, Tschopp T, Obst-Sander U, Kansy M, Müller K, Diederich F. Fluorine interactions at the thrombin active site: protein backbone fragments H-C(alpha)-C=O comprise a favorable C-F environment and interactions of C-F with electrophiles. *Chembiochem*, 5(5), **2004**, p. 666-675.
78. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72, **1976**, p. 248–254.
79. Levy MA, Brandt M, Greway AT. Mechanistic studies with solubilized rat liver steroid 5.alpha.-reductase: elucidation of the kinetic mechanism. *Biochemistry*, 29, **1990**, p. 2808–2815.

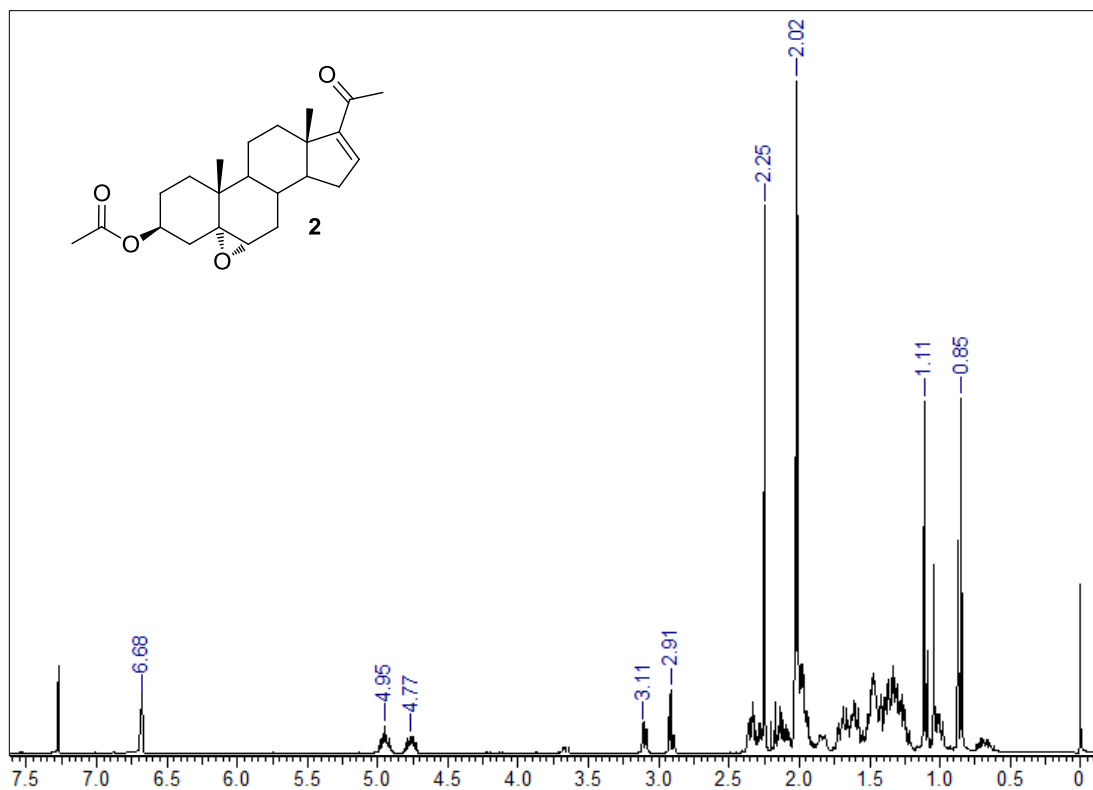
9. ANEXOS



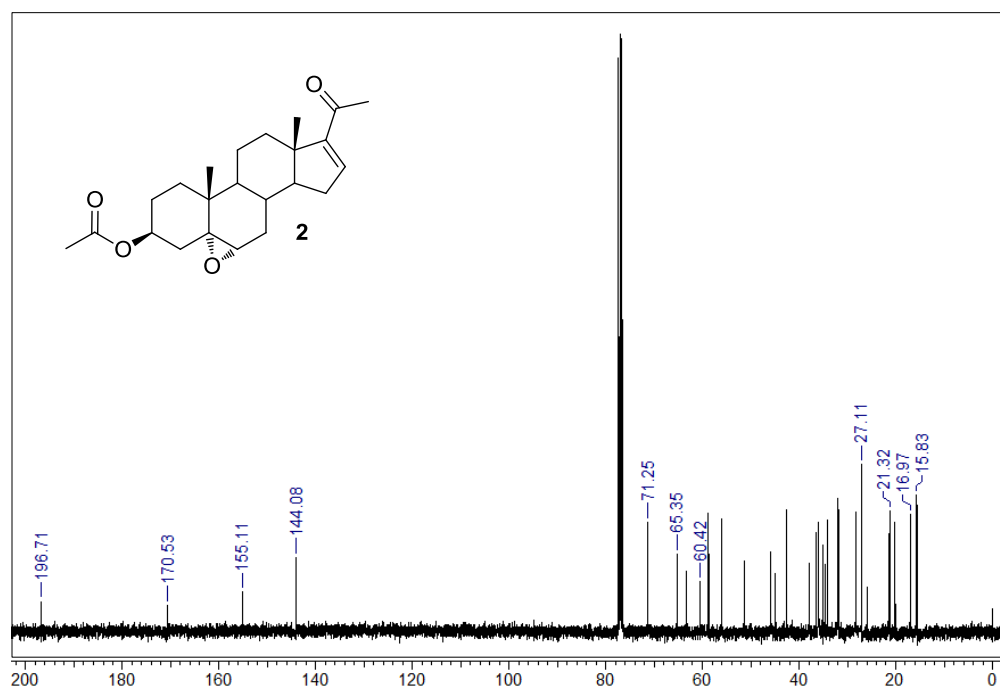
Espectro A.1 RMN de ^1H de la 3β-acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (**1**)



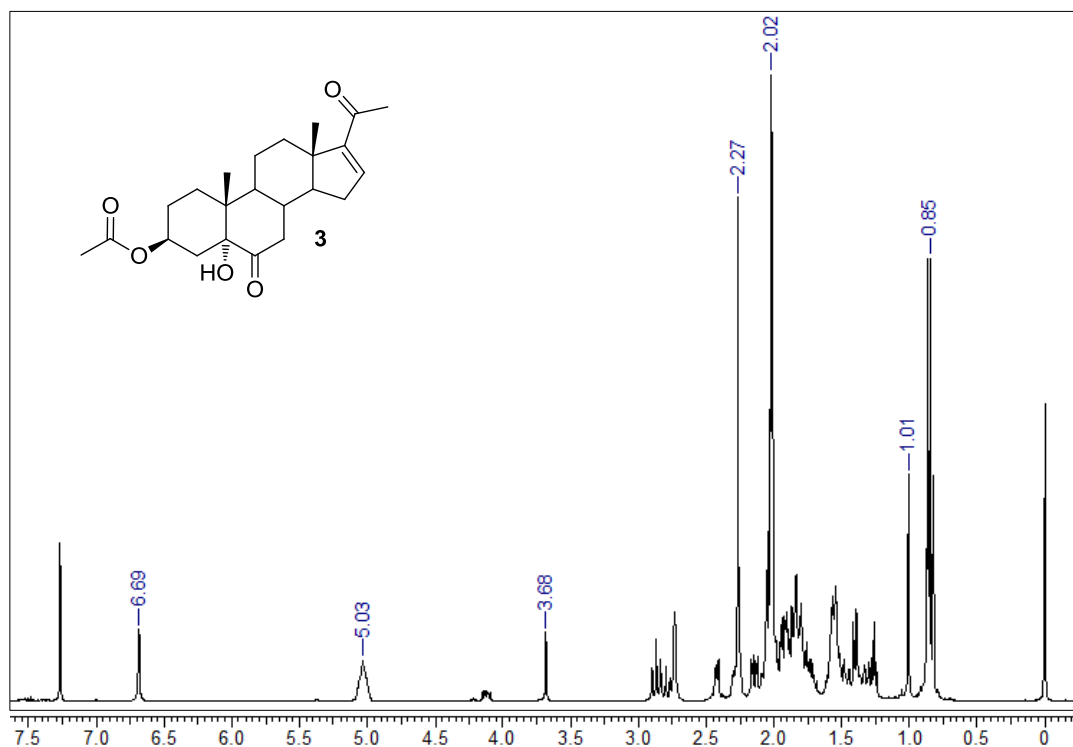
Espectro A.2 RMN de ^{13}C de la 3β-acetoxipregna-5,16-dien-20-ona (**1**)



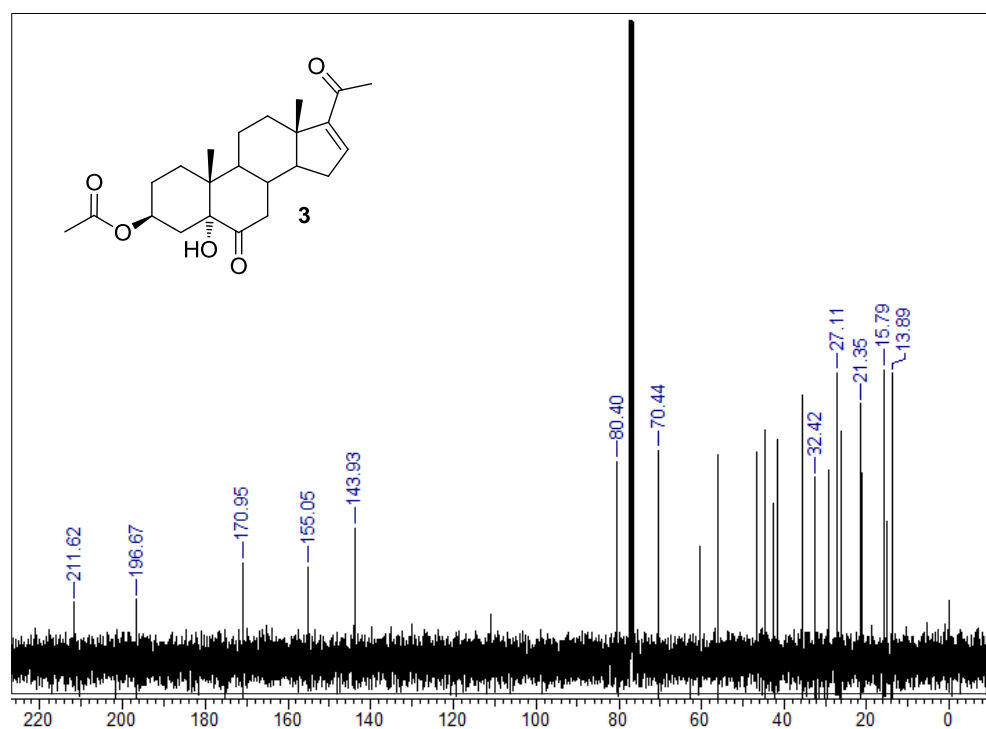
Espectro A.3 RMN de ^1H de la 3 β -acetoxi-5,6 α -epoxi-5 α -pregn-16-en-20-ona (2)



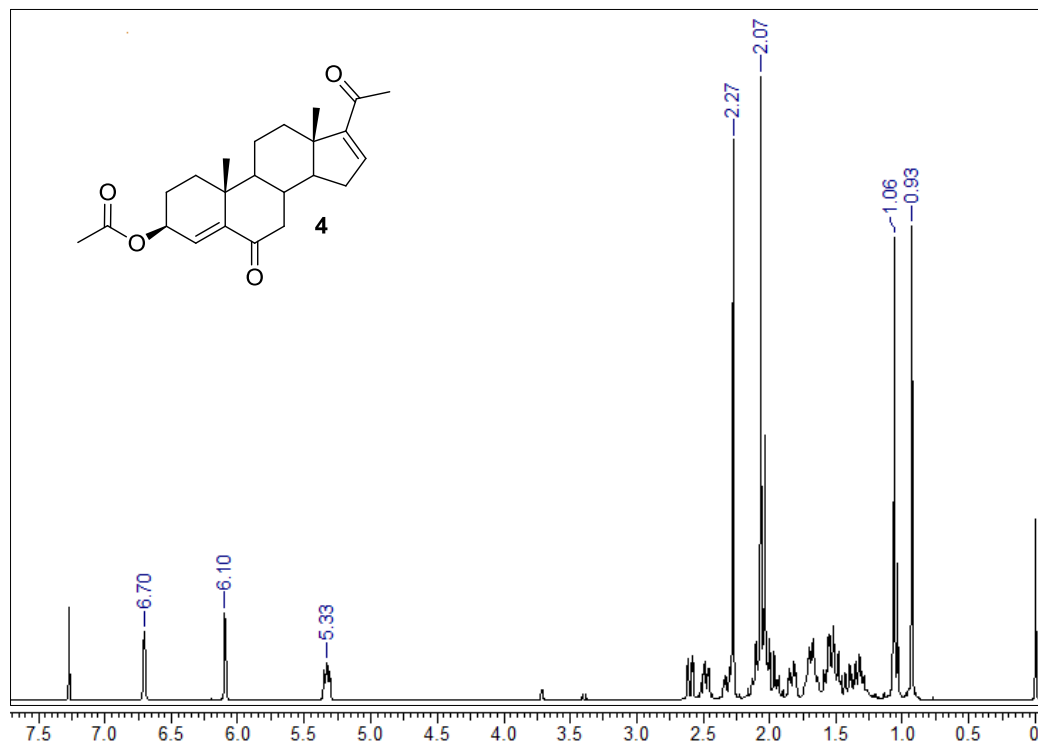
Espectro A.4 RMN de ^{13}C de la 3 β -acetoxi-5,6 α -epoxi-5 α -pregn-16-en-20-ona (2)



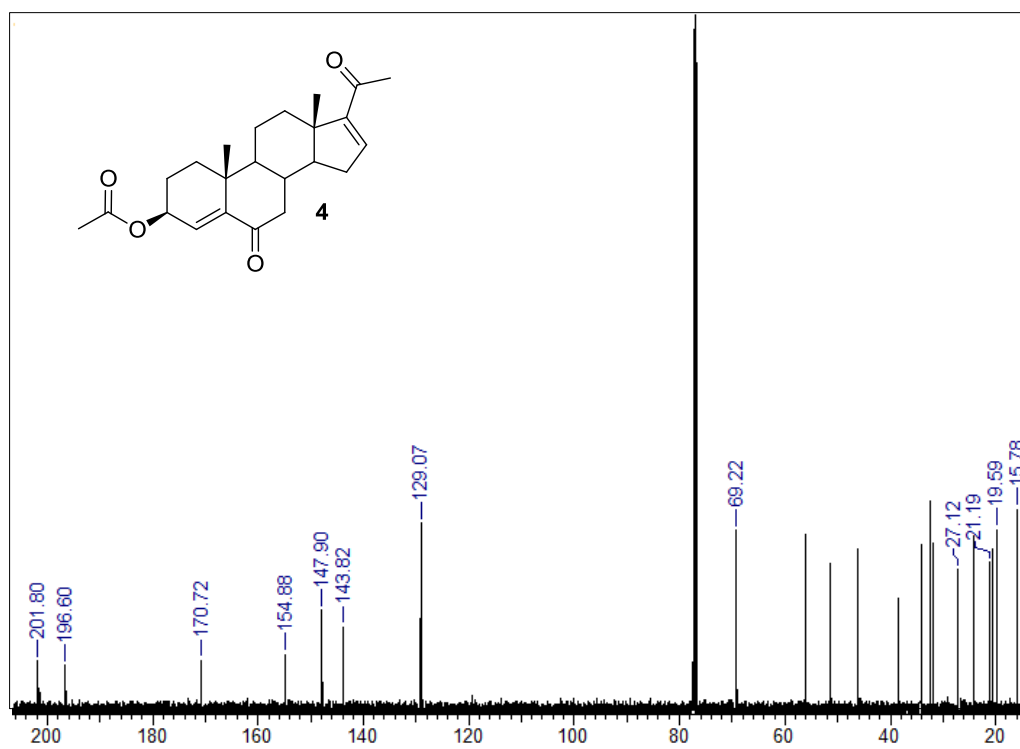
Espectro A.5 RMN de ¹H de la 3β-acetoxi-5-hidroxi-5α-pregn-16-en-6,20-diona (**3**)



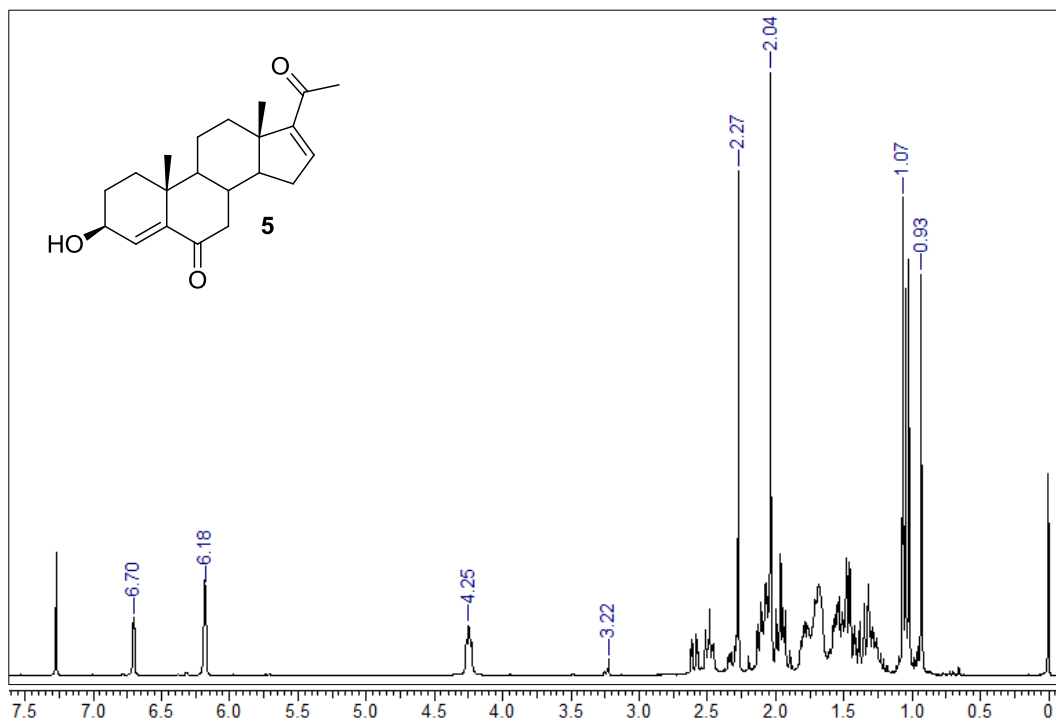
Espectro A.6 RMN de ¹³C de la 3β-acetoxi-5-hidroxi-5α-pregn-16-en-6,20-diona (**3**)



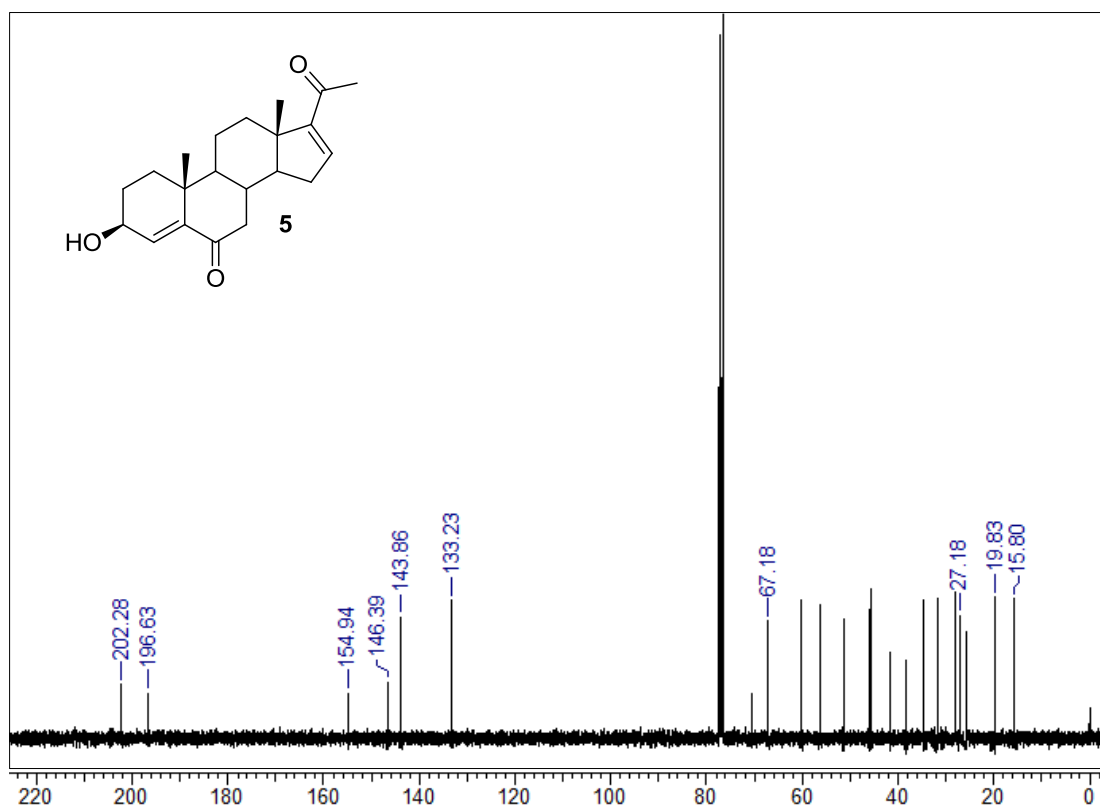
Espectro A.7 RMN de ^1H de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**4** y **6a**)



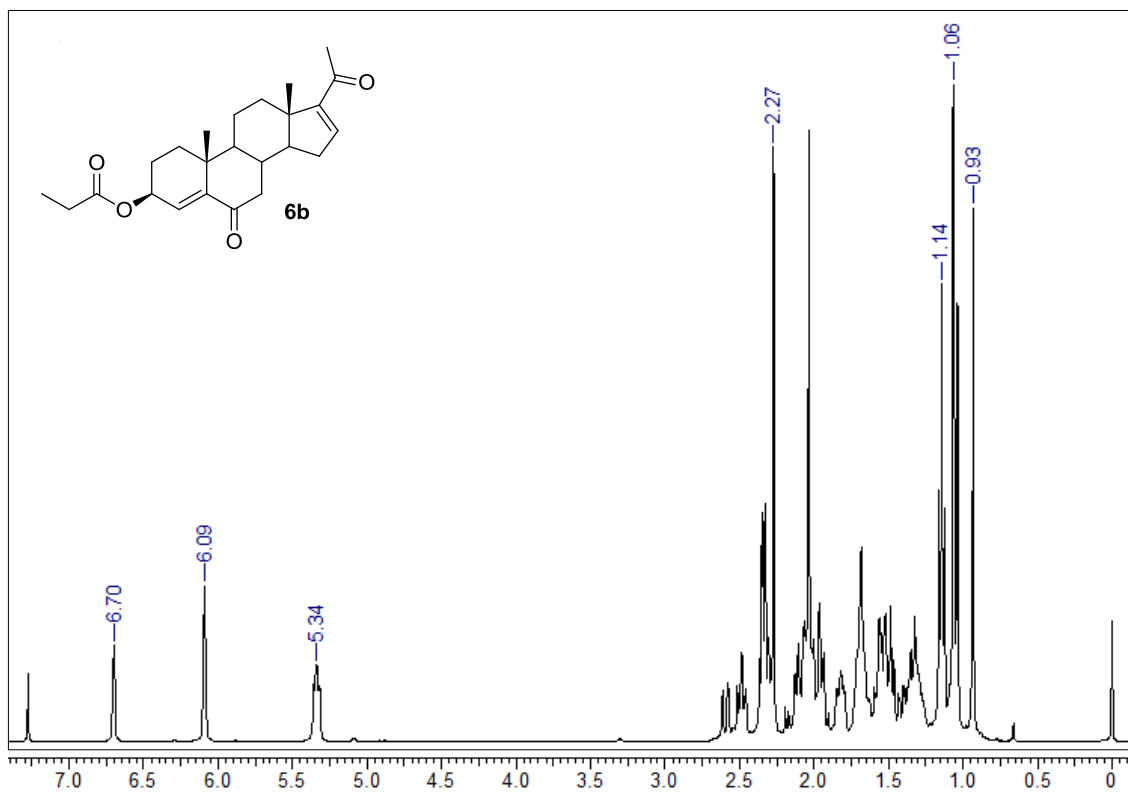
Espectro A.8 RMN de ^{13}C de la 3 β -acetoxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**4** y **6a**)



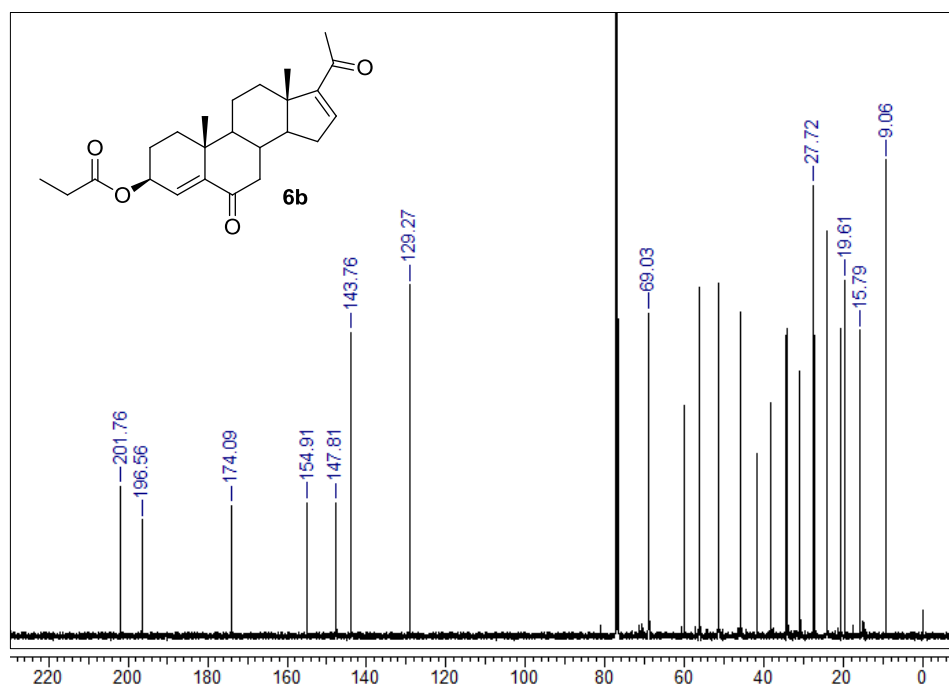
Espectro A.9 RMN de ^1H de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**5**)



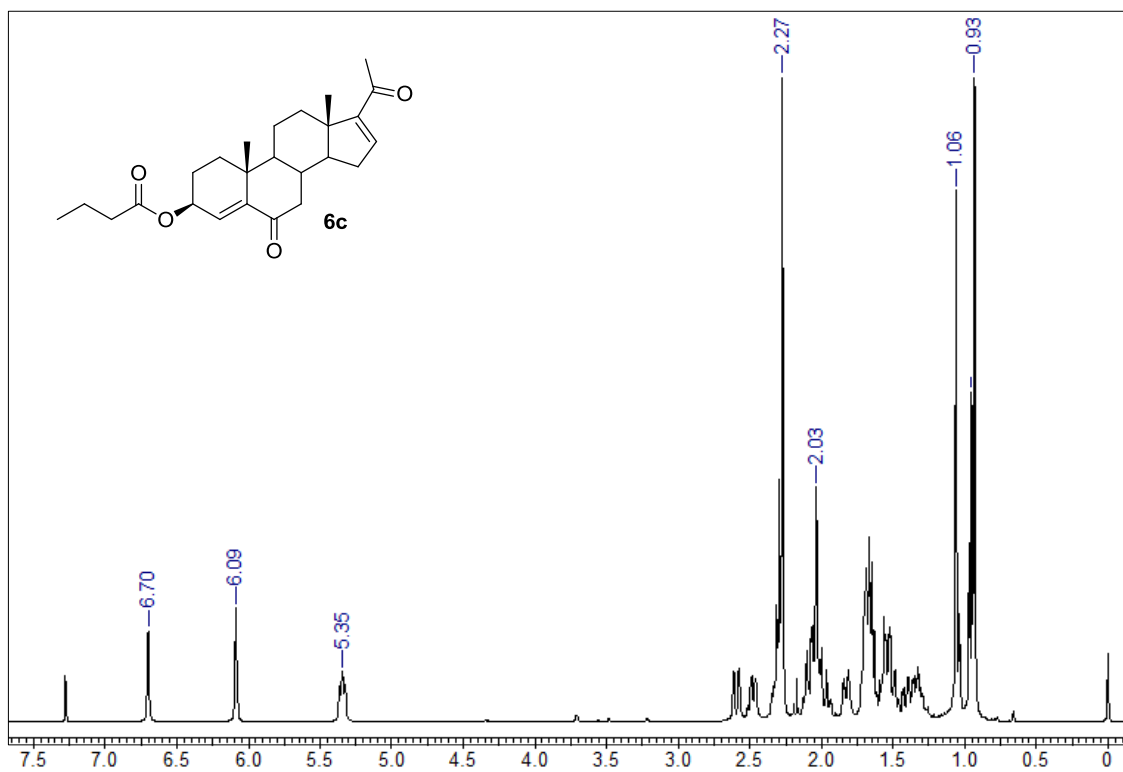
Espectro A.10 RMN de ^{13}C de la 3 β -hidroxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**5**)



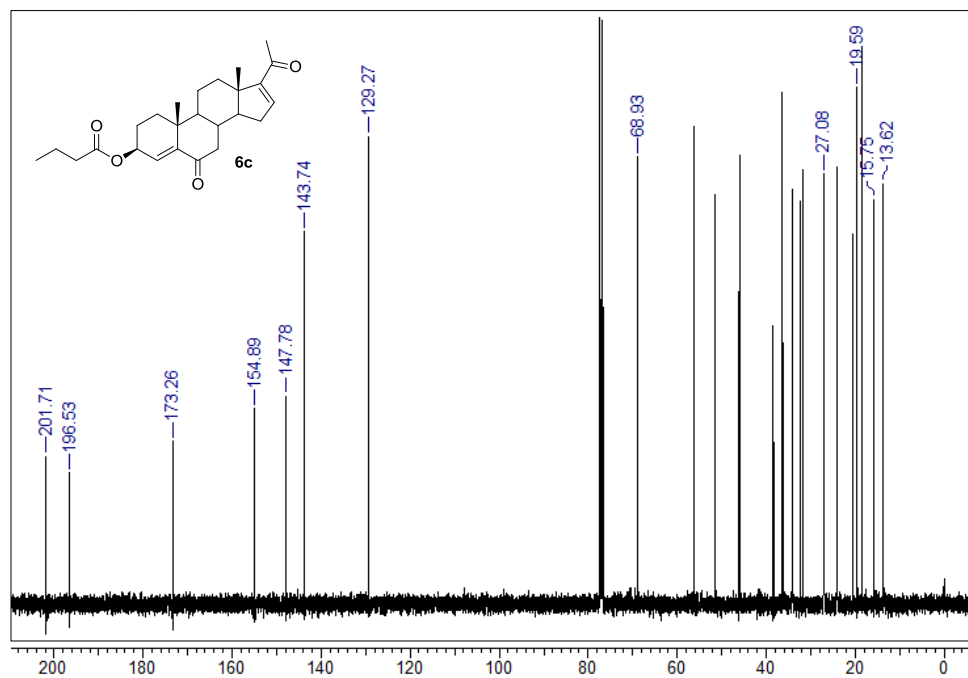
Espectro A.11 RMN de ^1H de la 3 β -propioniloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6b**)



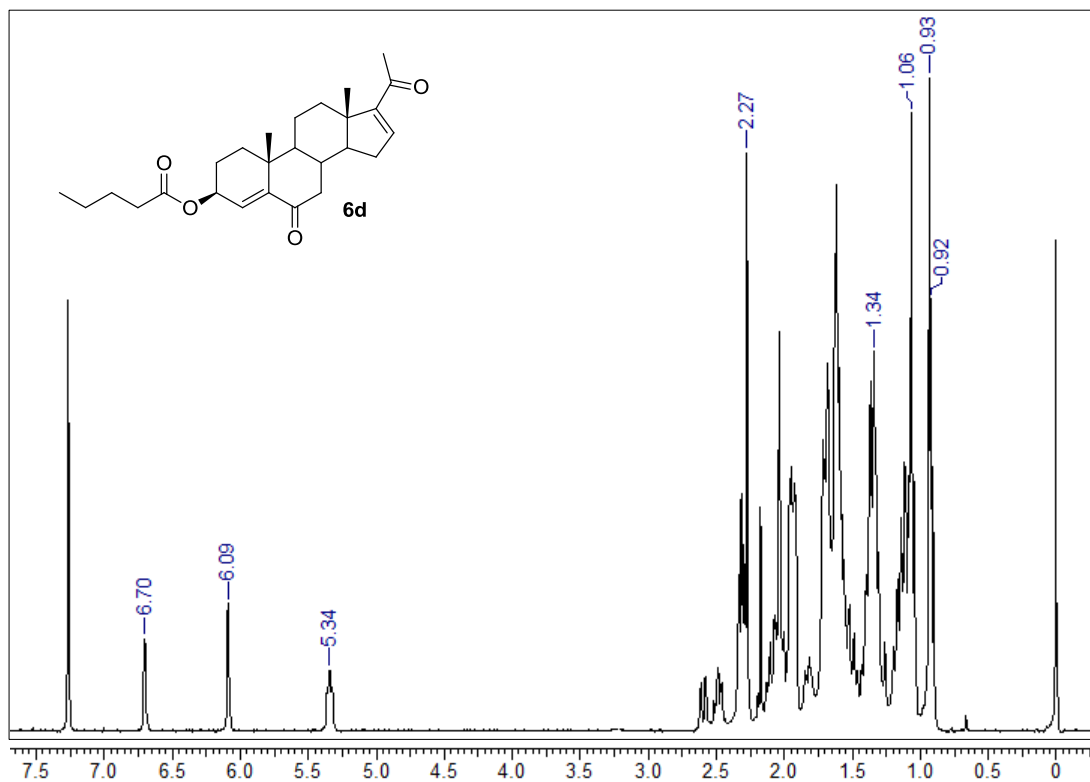
Espectro A.12 RMN de ^{13}C de la 3 β -propioniloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6b**)



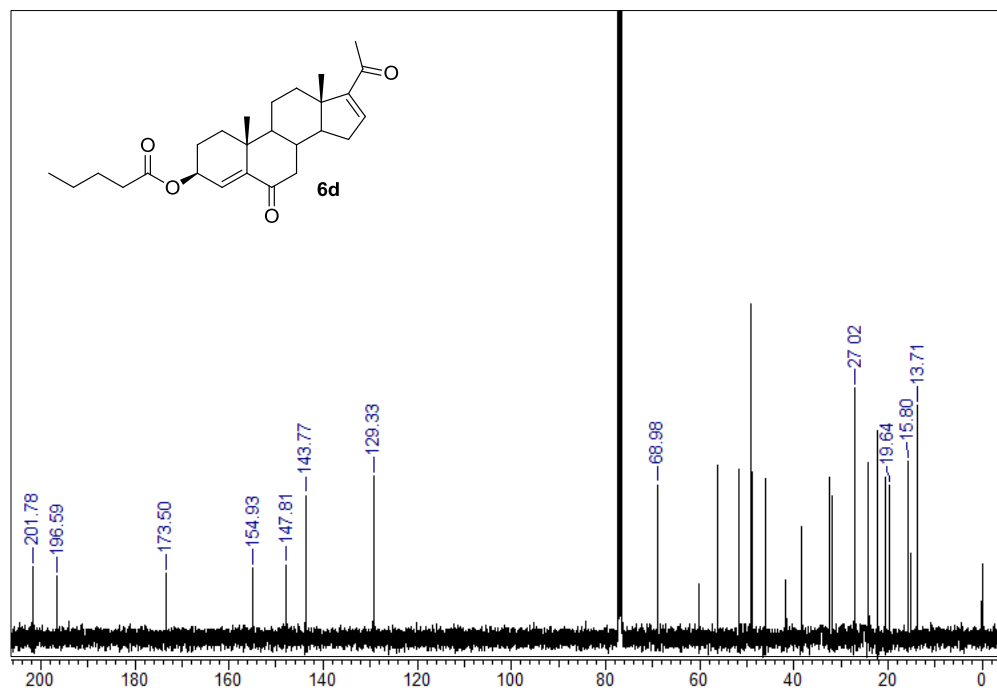
Espectro A.13 RMN de ¹H de la 3β-butiriloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6c)



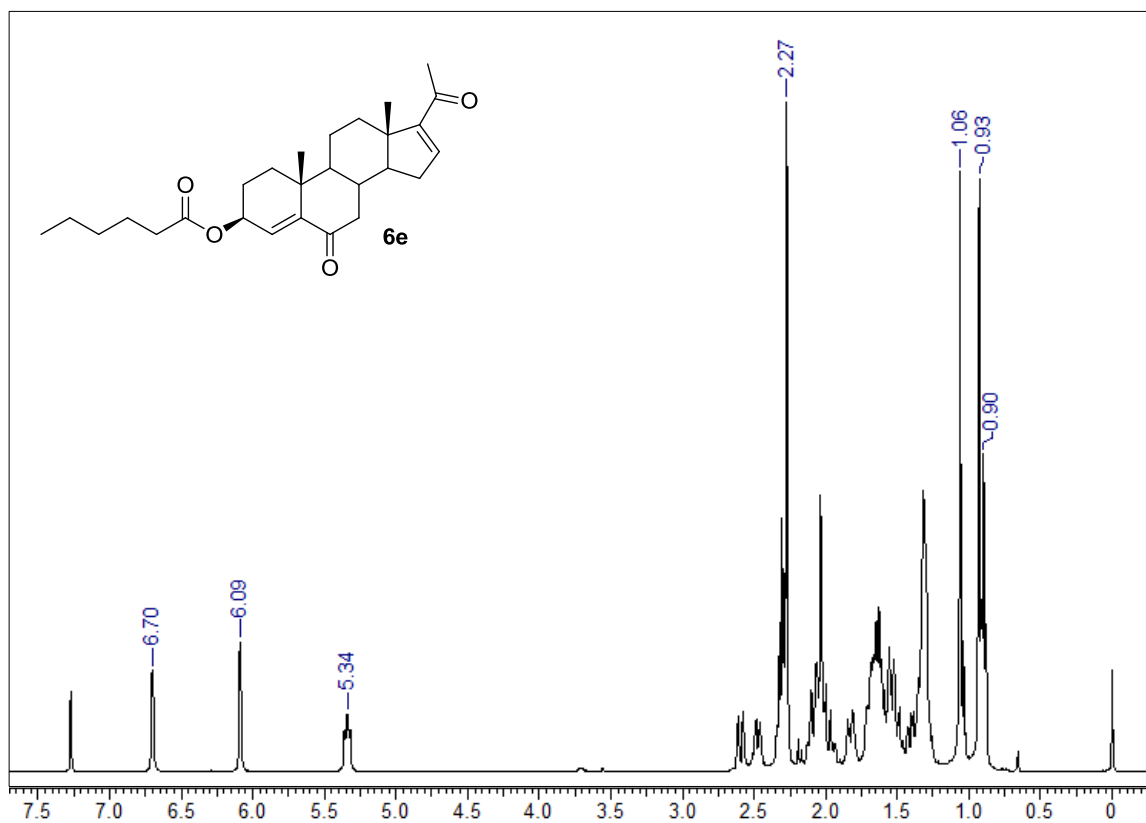
Espectro A.14 RMN de ¹³C de la 3β-butiriloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (6c)



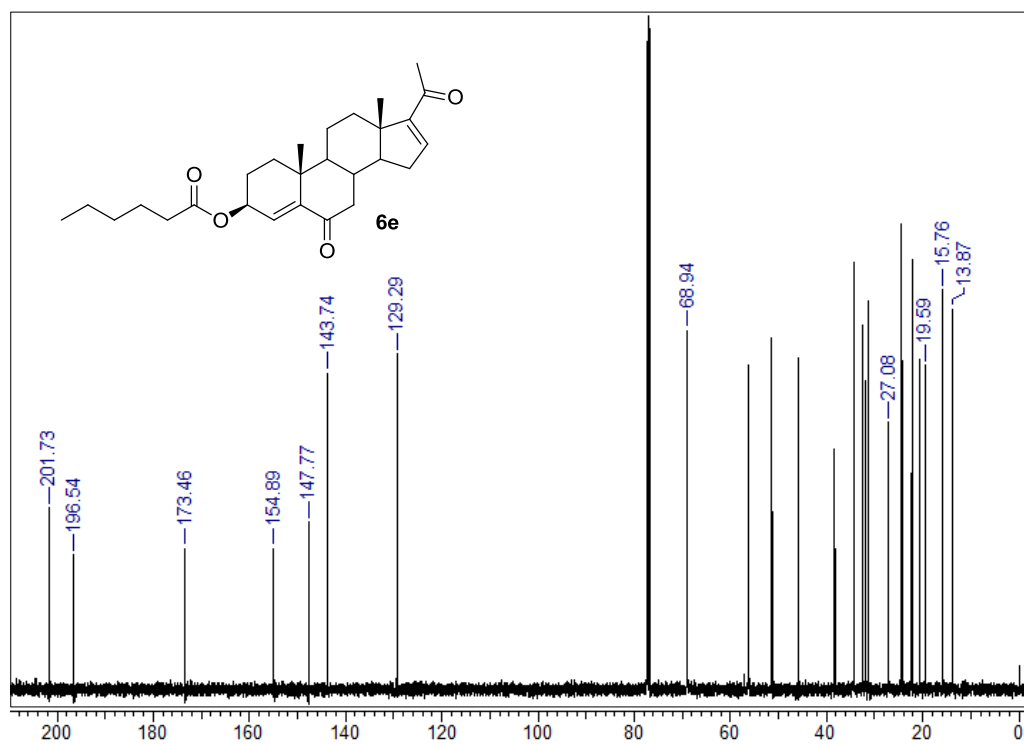
Espectro A.15 RMN de ¹H de la 3β-pentanoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6d**)



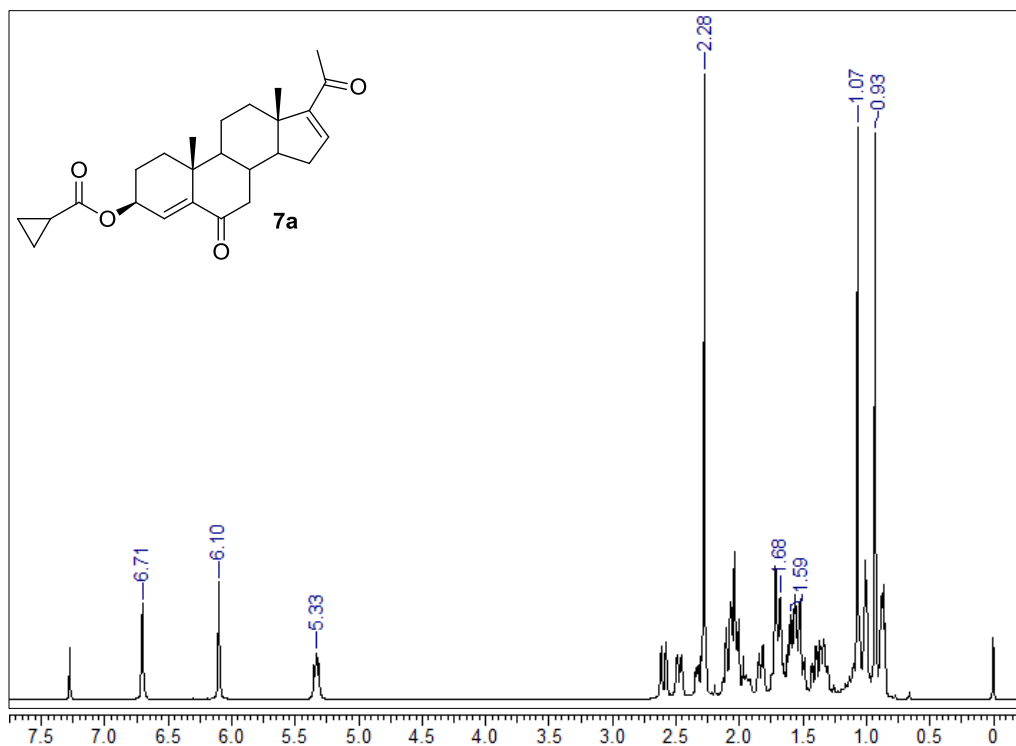
Espectro A.16 RMN de ¹³C de la 3β-pentanoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6d**)



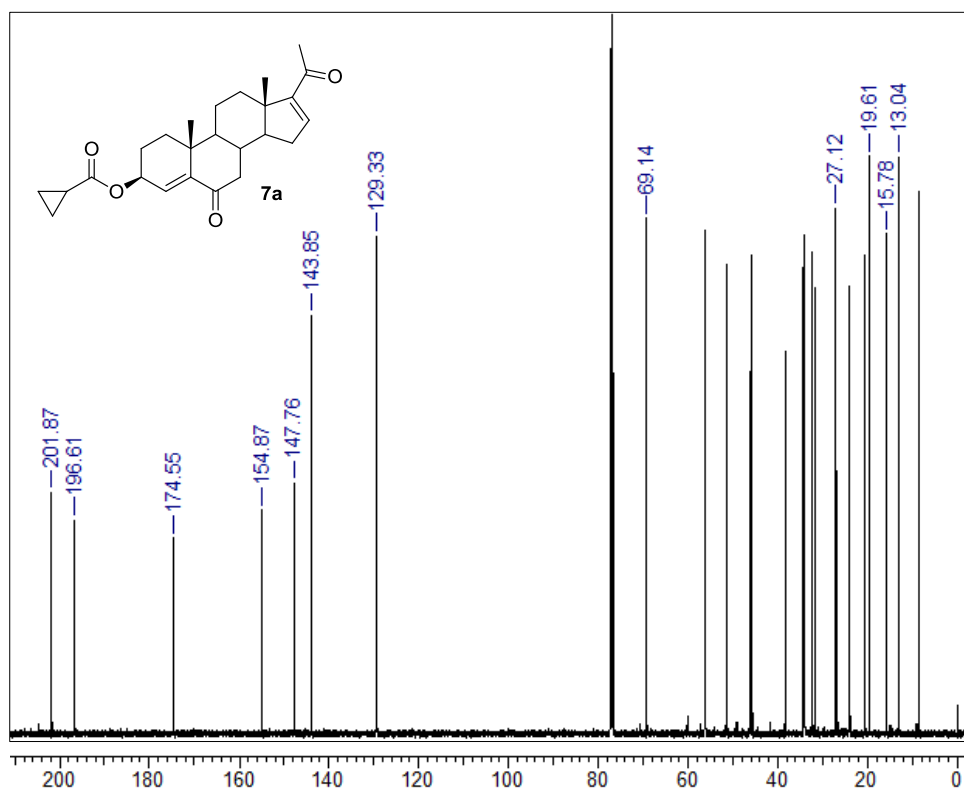
Espectro A.17 RMN de ¹H de la 3β-hexanoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6e**)



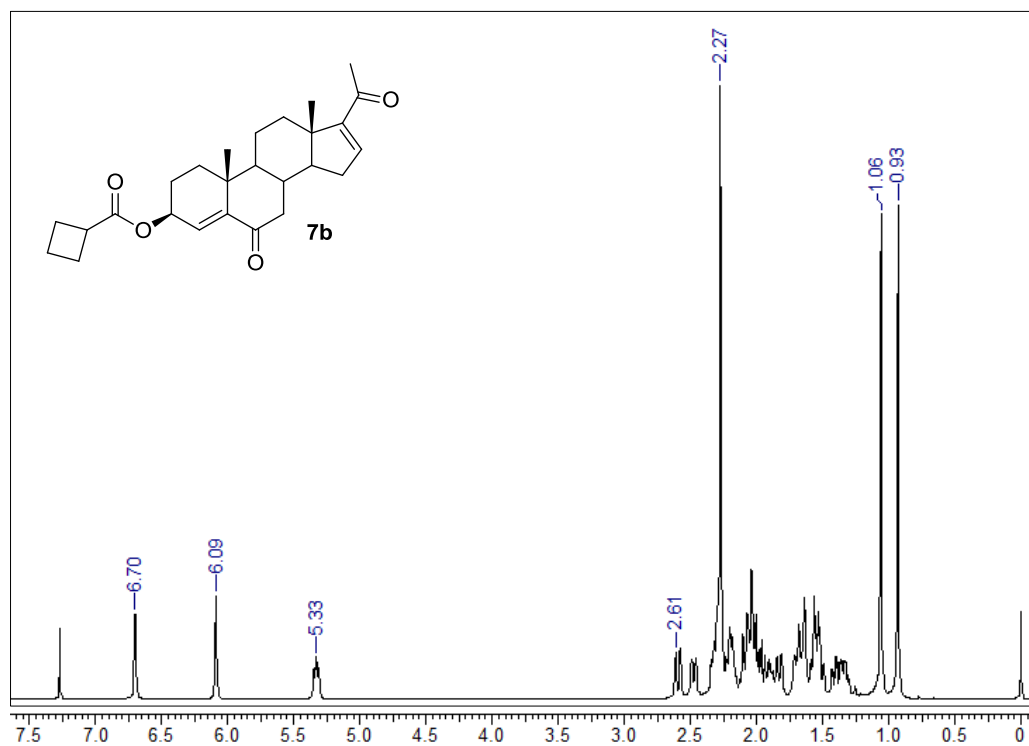
Espectro A.18 RMN de ¹³C de la 3β-hexanoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**6e**)



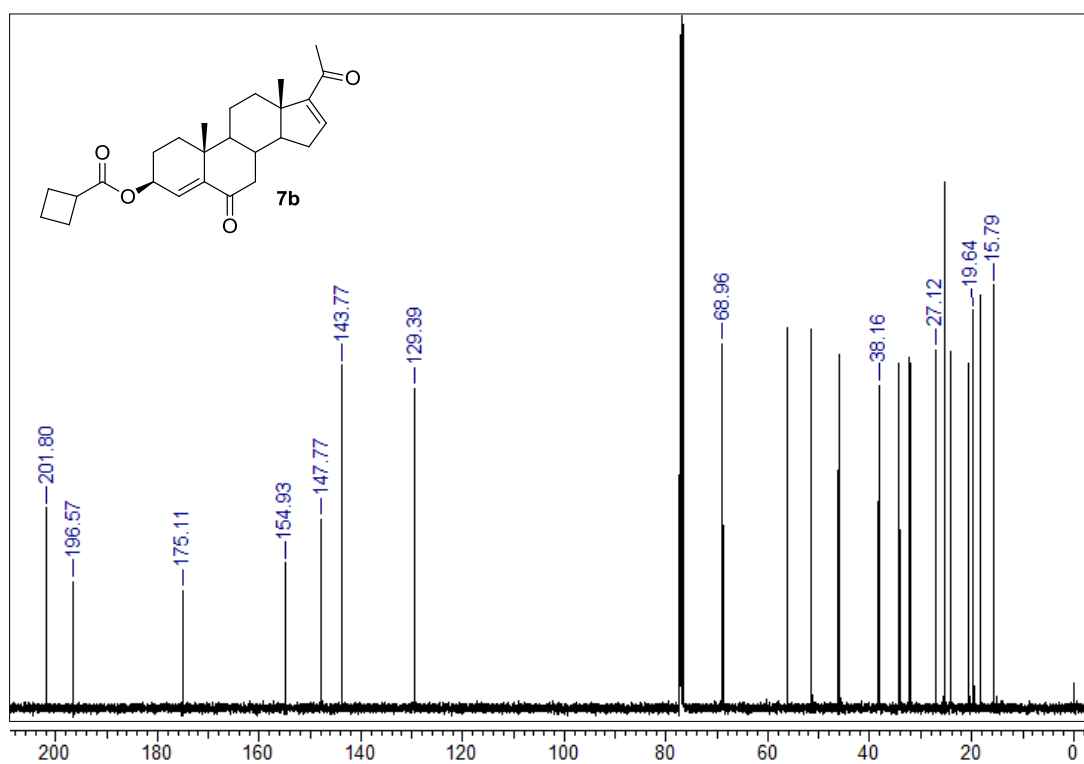
Espectro A.19 RMN de ¹H de la 3β-ciclopropilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**7a**).



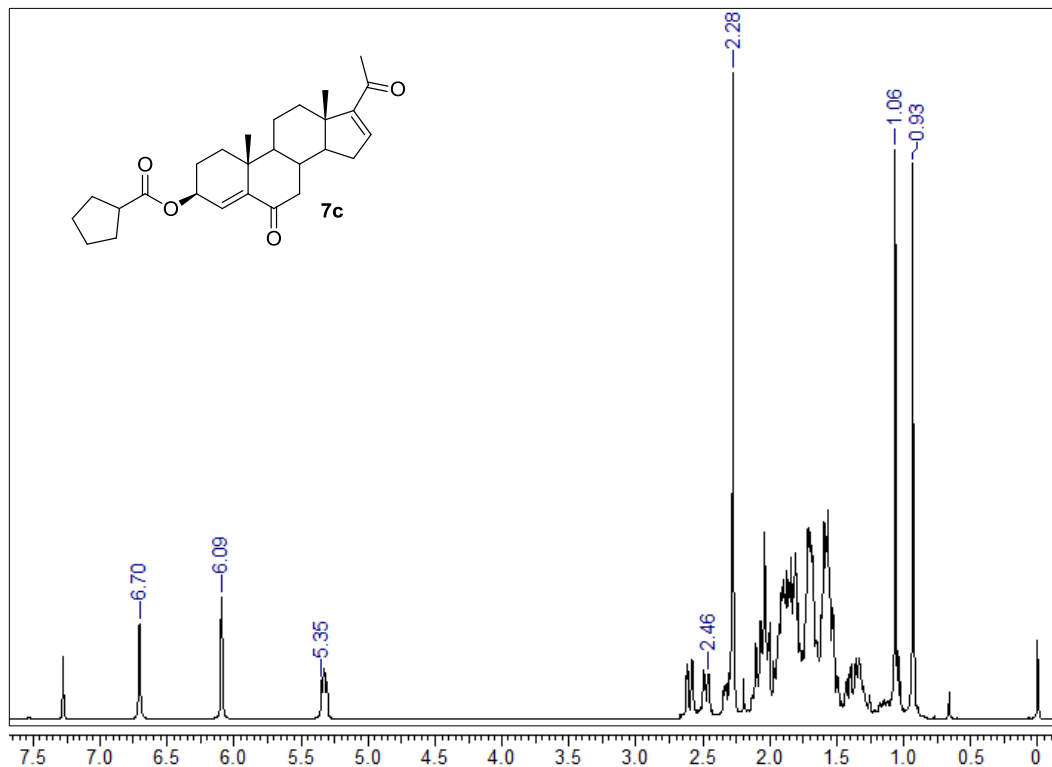
Espectro A.20 RMN de ¹³C de la 3β-ciclopropilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**7a**).



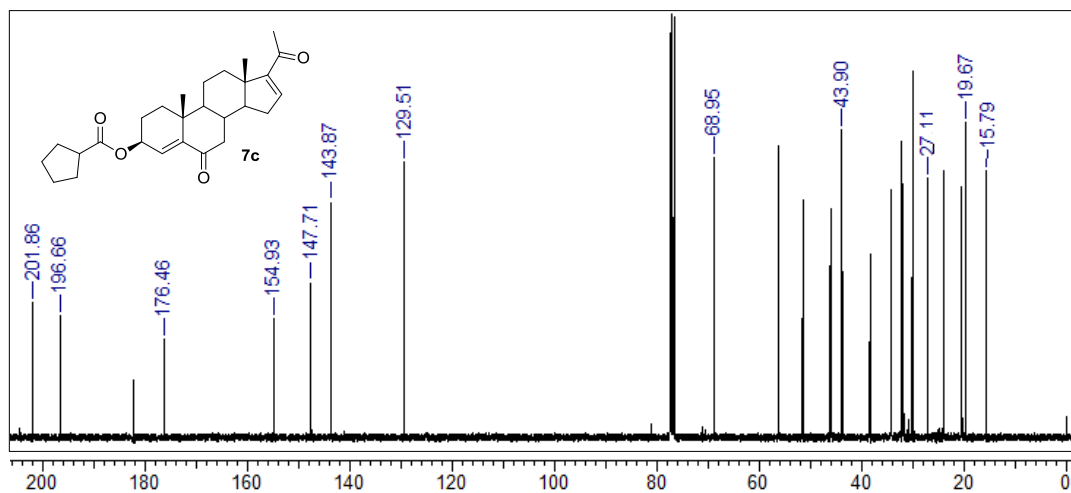
Espectro A.21 RMN de ^1H de la 3 β -ciclobutilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**7b**).



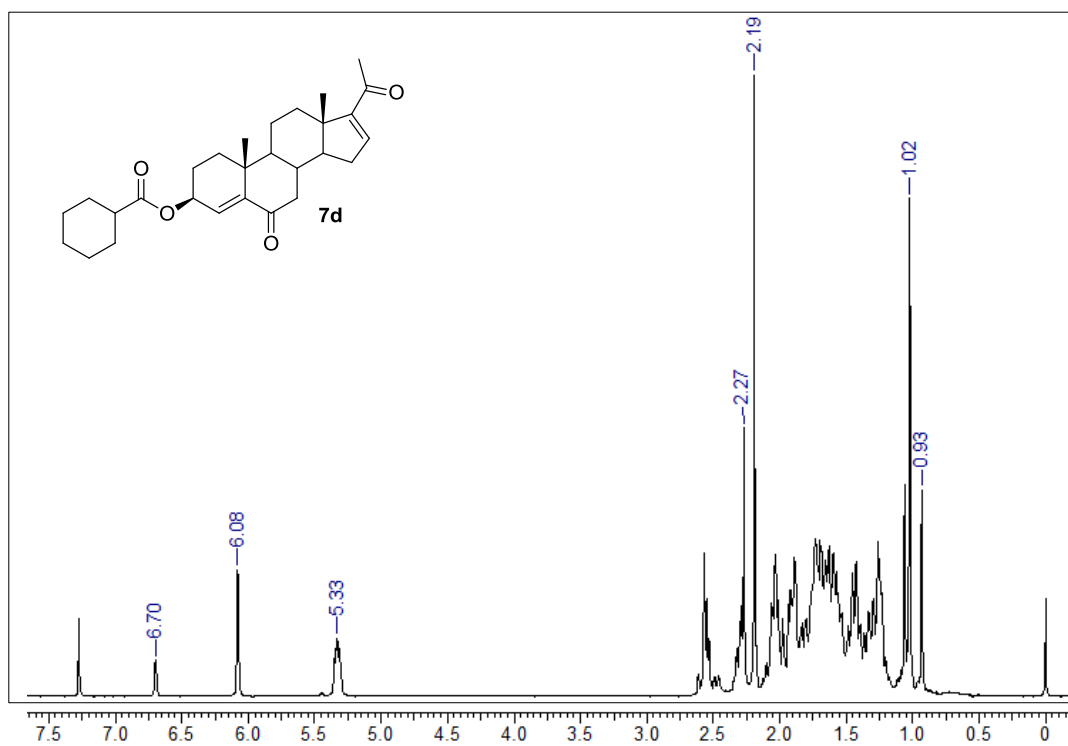
Espectro A.22 RMN de ^{13}C de la 3 β -ciclobutilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**7b**).



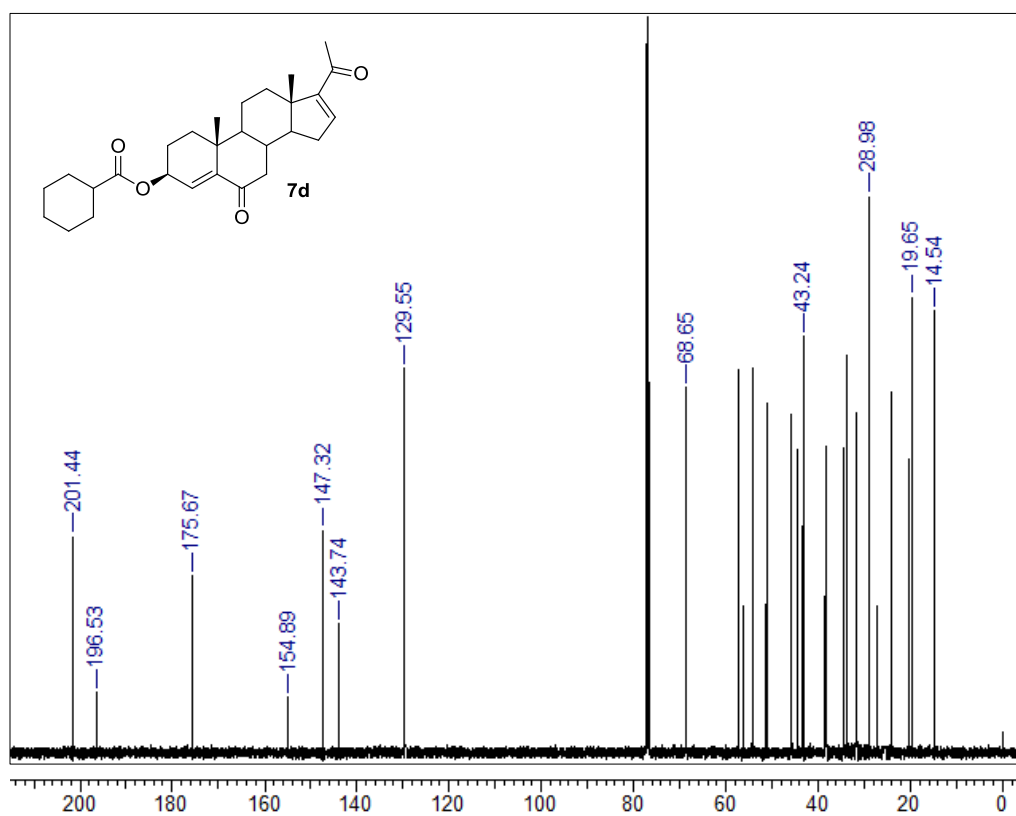
Espectro A.23 RMN de ^1H de la 3 β -ciclopentilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**7c**).



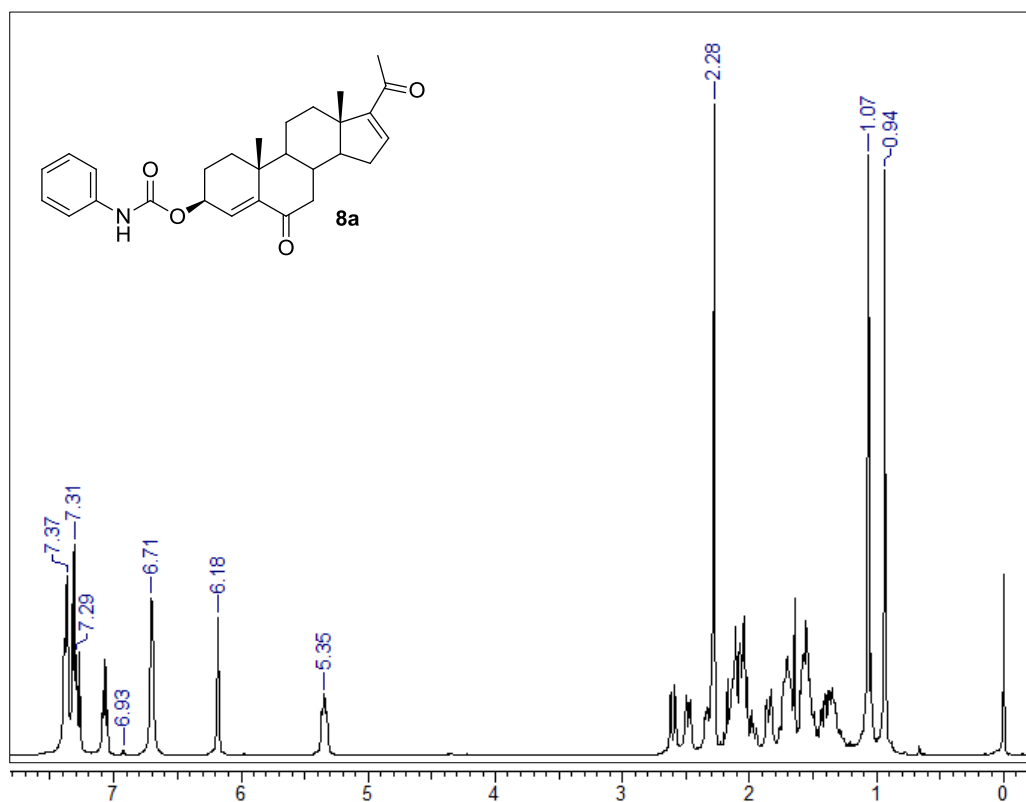
Espectro A.24 RMN de ^{13}C de la 3 β -ciclopentilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**7c**).



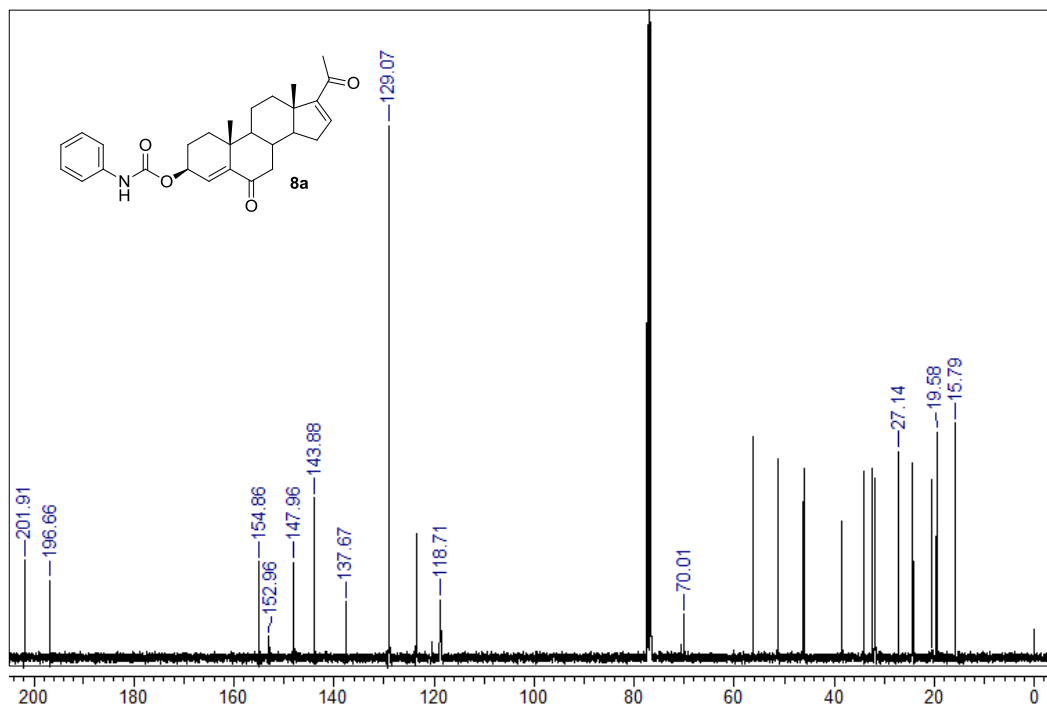
Espectro A.25 RMN de ^1H de la 3 β -ciclohexilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**7d**).



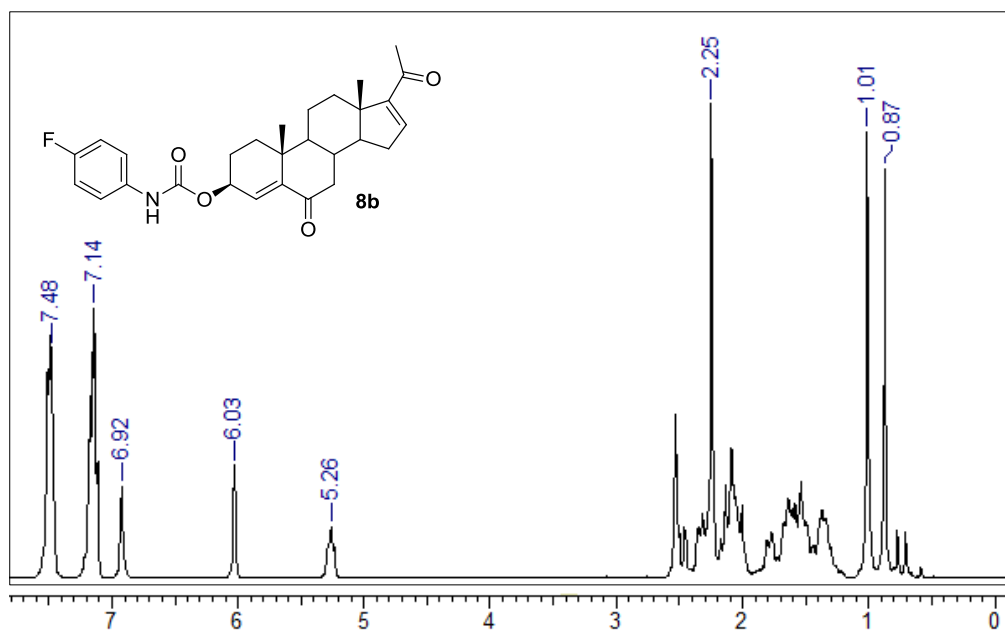
Espectro A.26 RMN de ^{13}C de la 3 β -ciclohexilcarboxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**7d**).



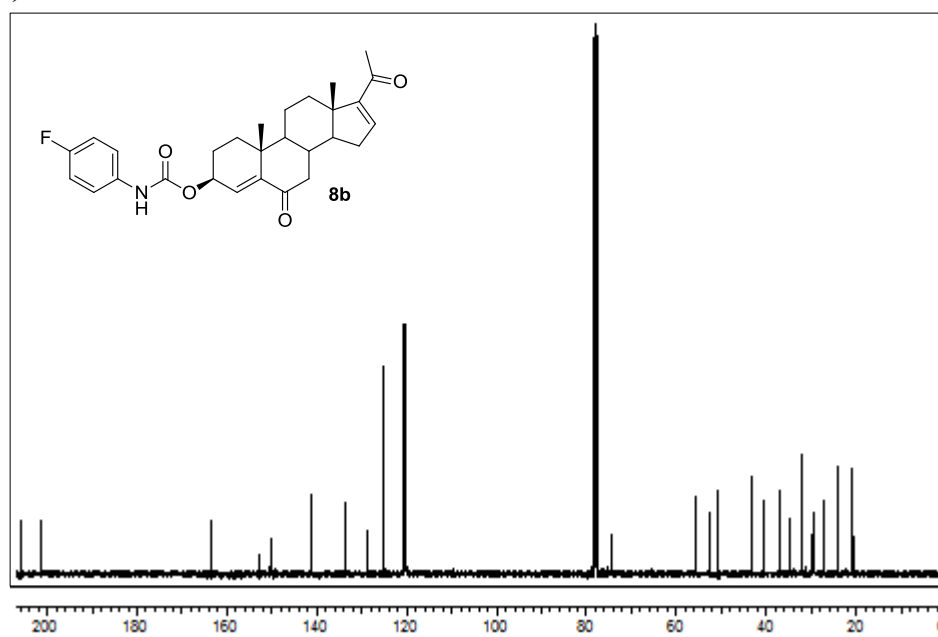
Espectro A.27 RMN de ^1H de la 3 β -fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**8a**)



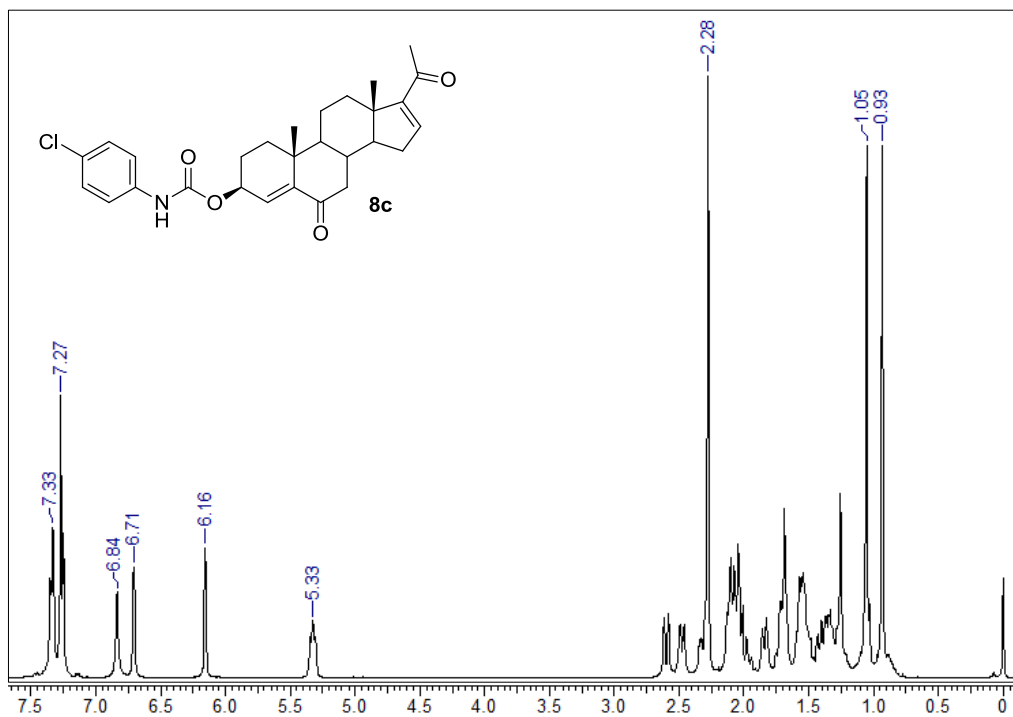
Espectro A.28 RMN de ^{13}C de la 3 β -fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**8a**)



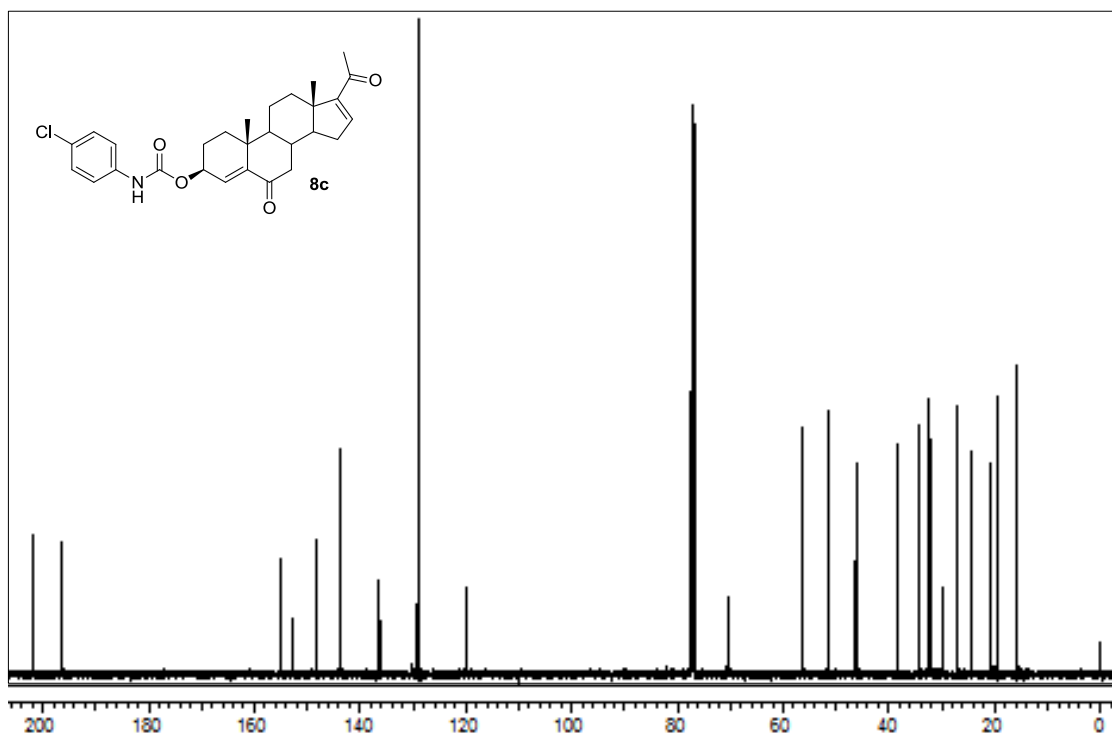
Espectro A.29 RMN de ¹H de la 3β-(*p*-fluoro)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**8b**).



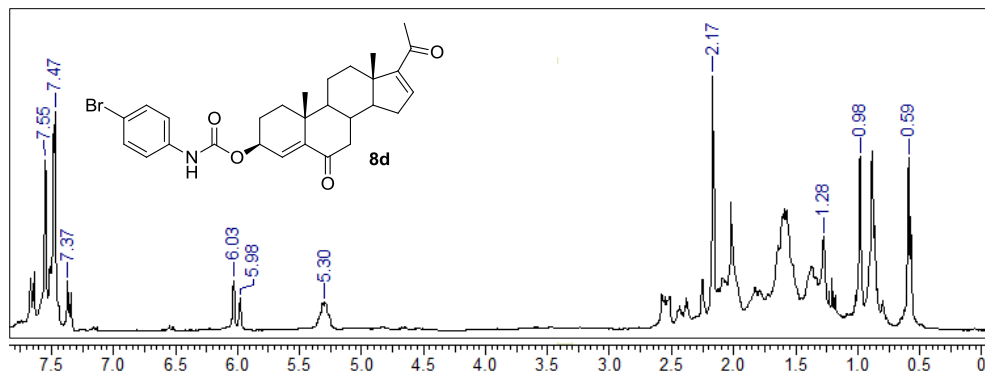
Espectro A.30 RMN de ¹³C de la 3β-(*p*-fluoro)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**8b**).



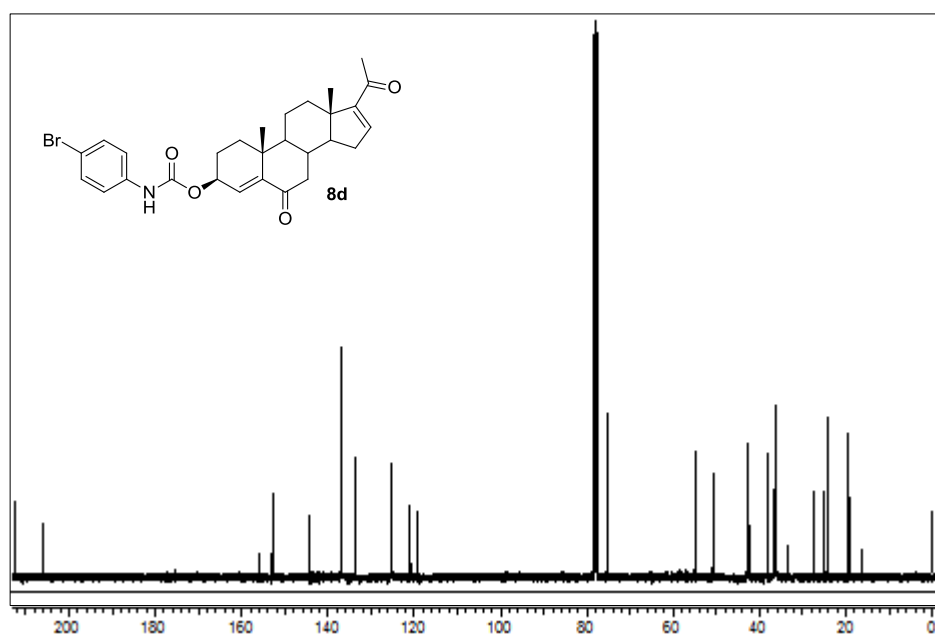
Espectro A.31 RMN de ¹H de la 3β-(*p*-cloro)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**8c**).



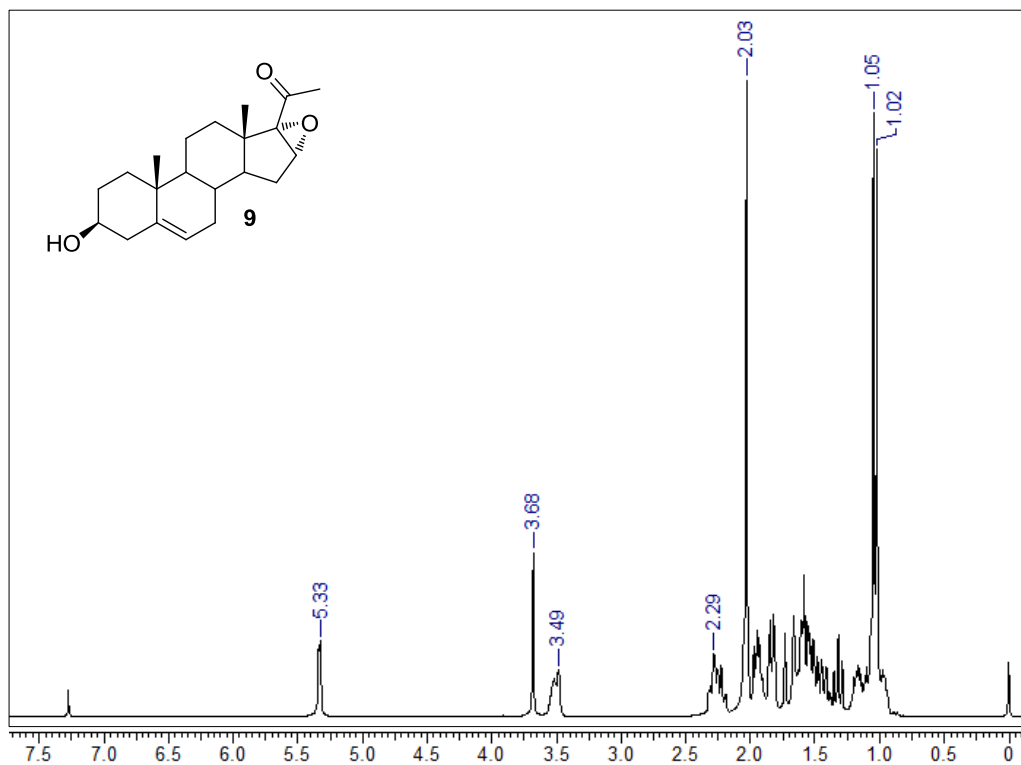
Espectro A.32 RMN de ¹³C de la 3β-(*p*-cloro)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**8c**).



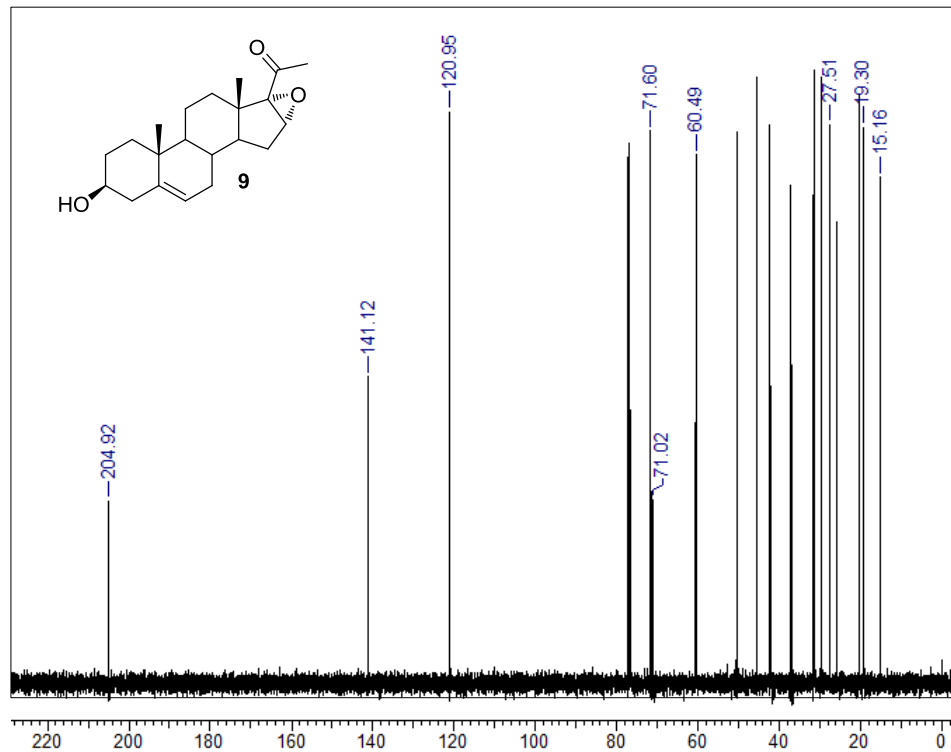
Espectro A.33 RMN de ¹H de la 3β-(*p*-bromo)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**8d**).



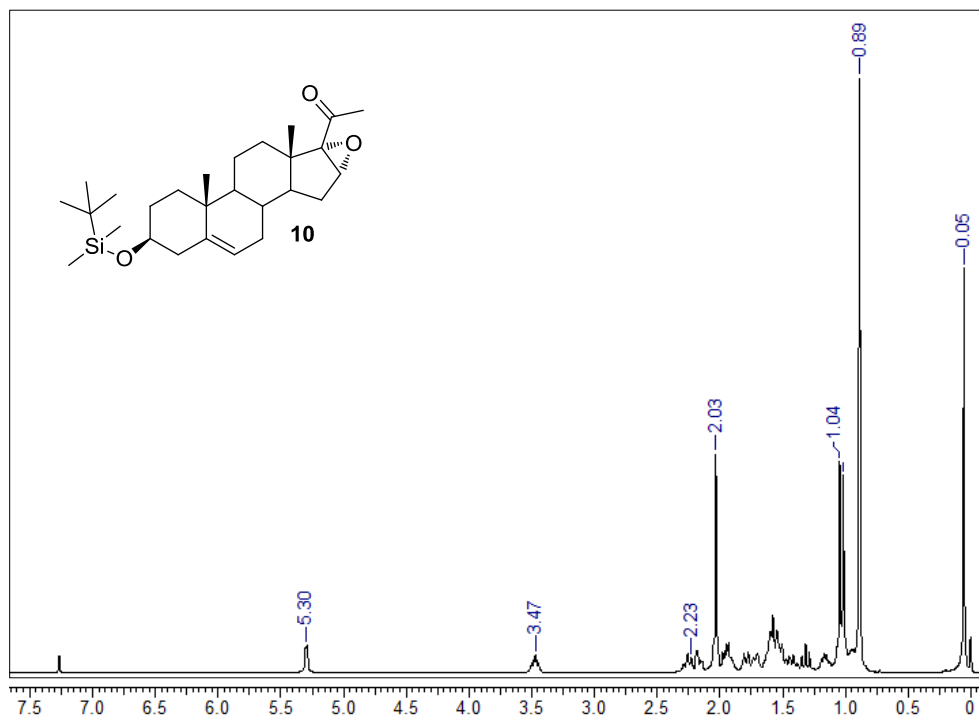
Espectro A.34 RMN de ¹³C de la 3β-(*p*-bromo)fenilcarbamoiloxipregna-4,16-dien-6,20-diona (**8d**).



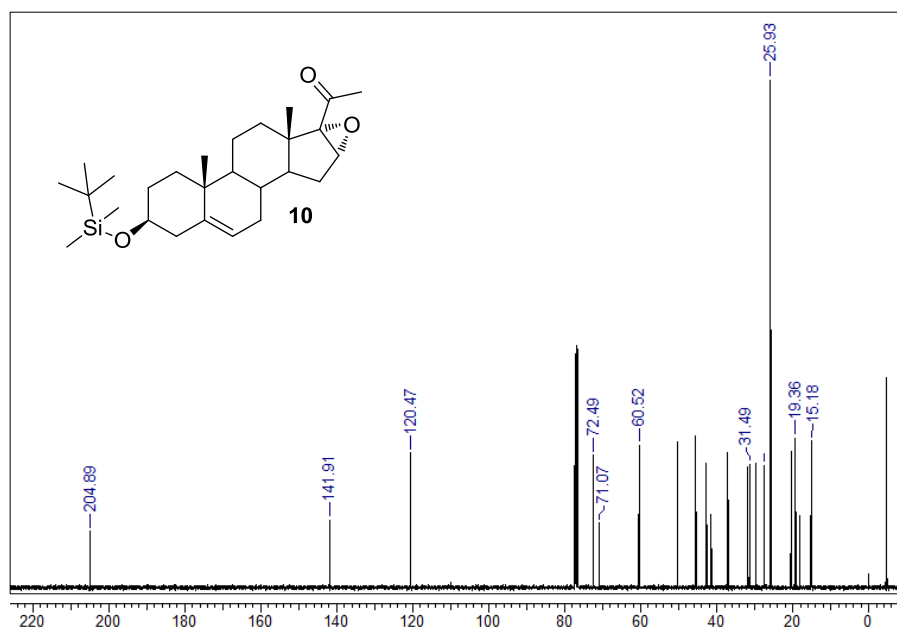
Espectro A.35 RMN de ¹H de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**9**)



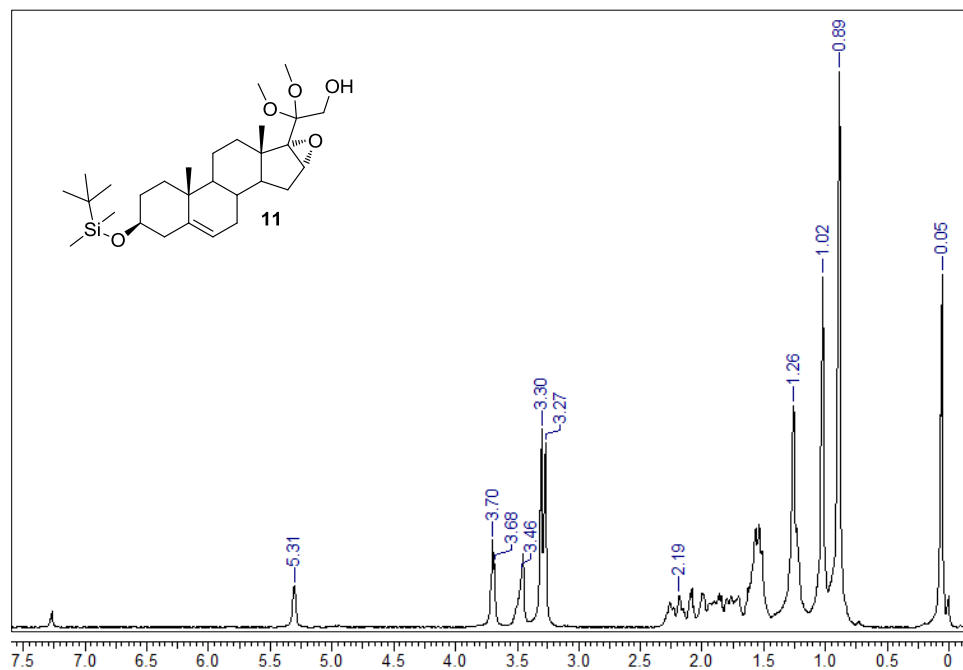
Espectro A.36 RMN de ¹³C de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**9**)



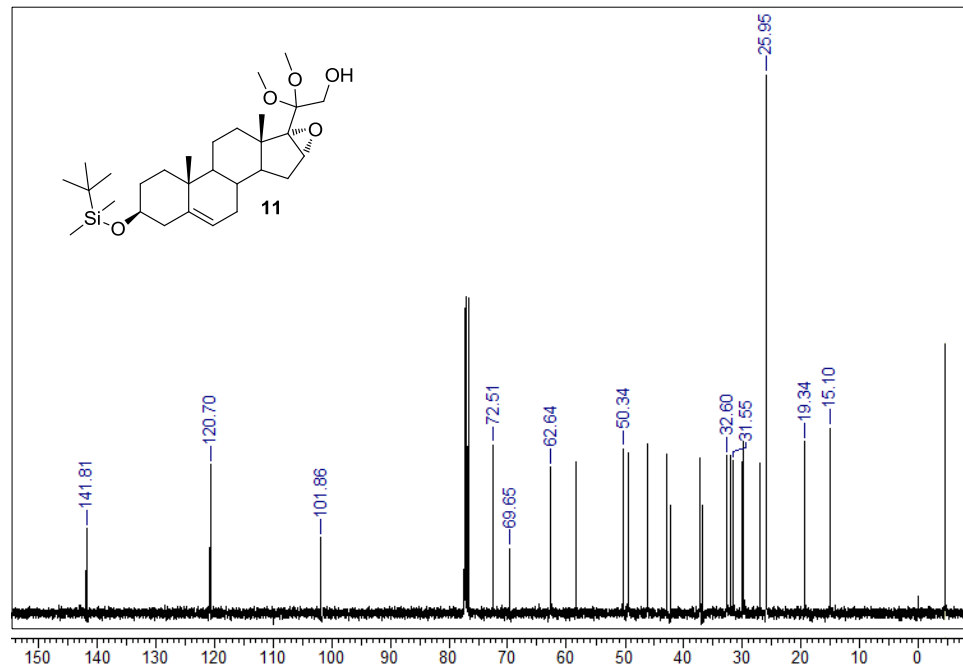
Espectro A.37 RMN de ¹H de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-en-20-ona (**10**)



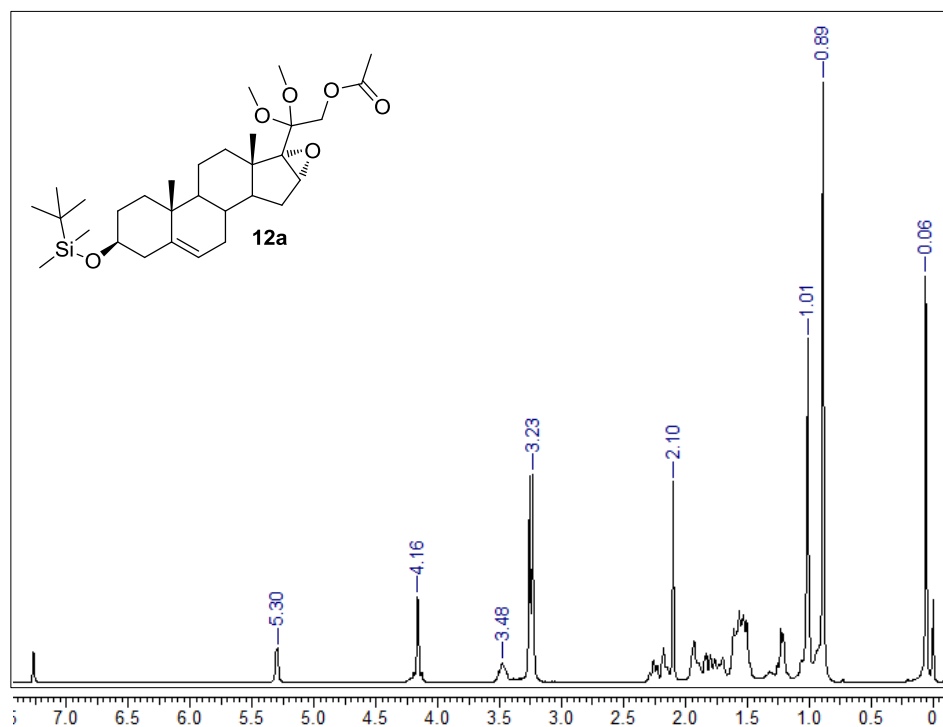
Espectro A.38 RMN de ¹³C de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-en-20-ona (**10**)



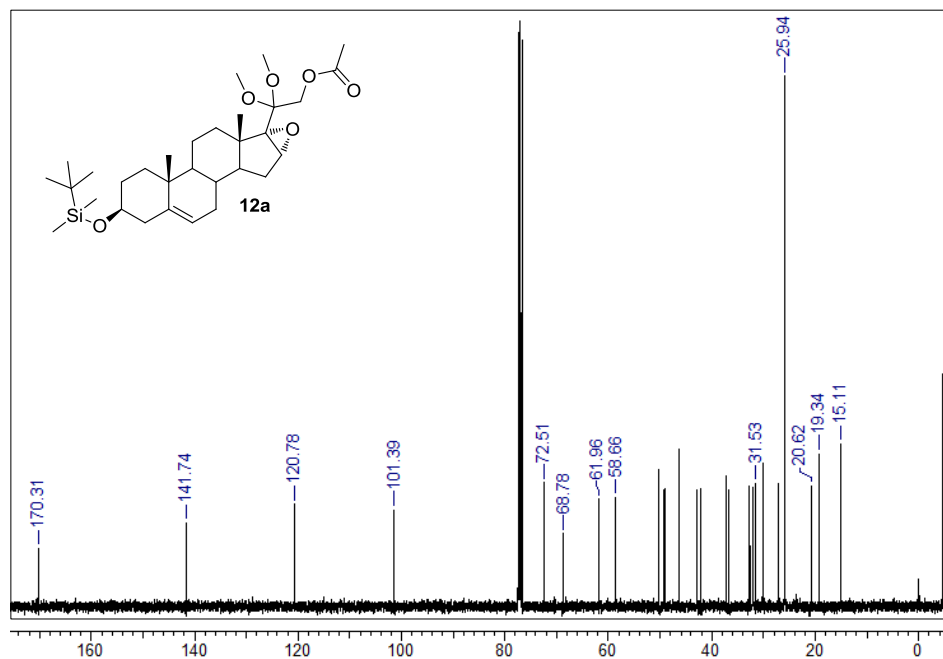
Espectro A.39 RMN de ^1H de la 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20-dimetoxi-3 β -tert-butildimetilsiloxipregn-5-eno (**11**)



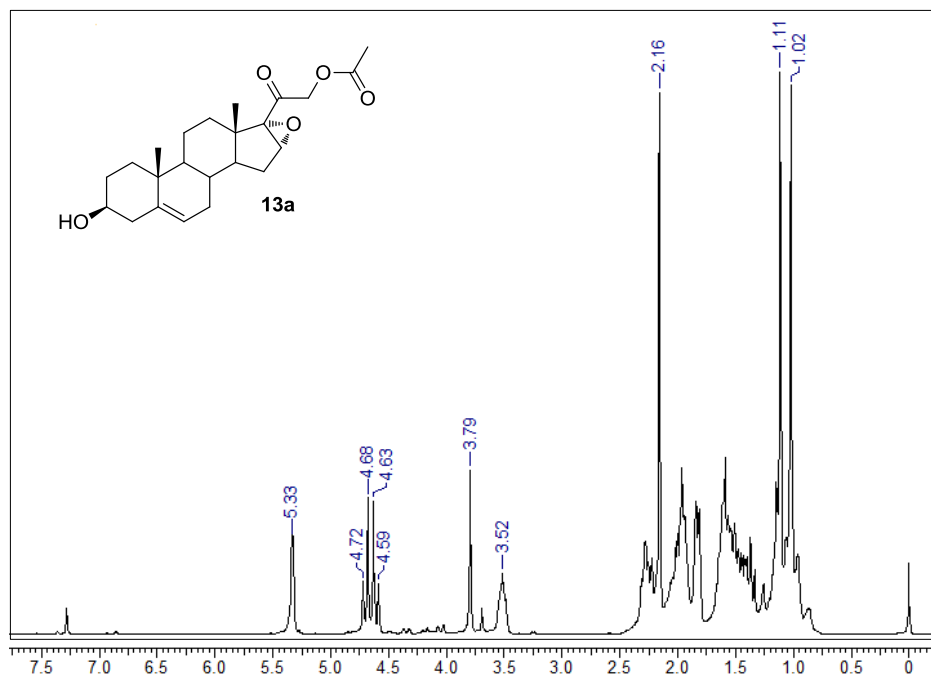
Espectro A.40 RMN de ^{13}C de la 16 α ,17 α -epoxi-21-hidroxi-20-dimetoxi-3 β -tert-butildimetilsiloxipregn-5-eno (**11**)



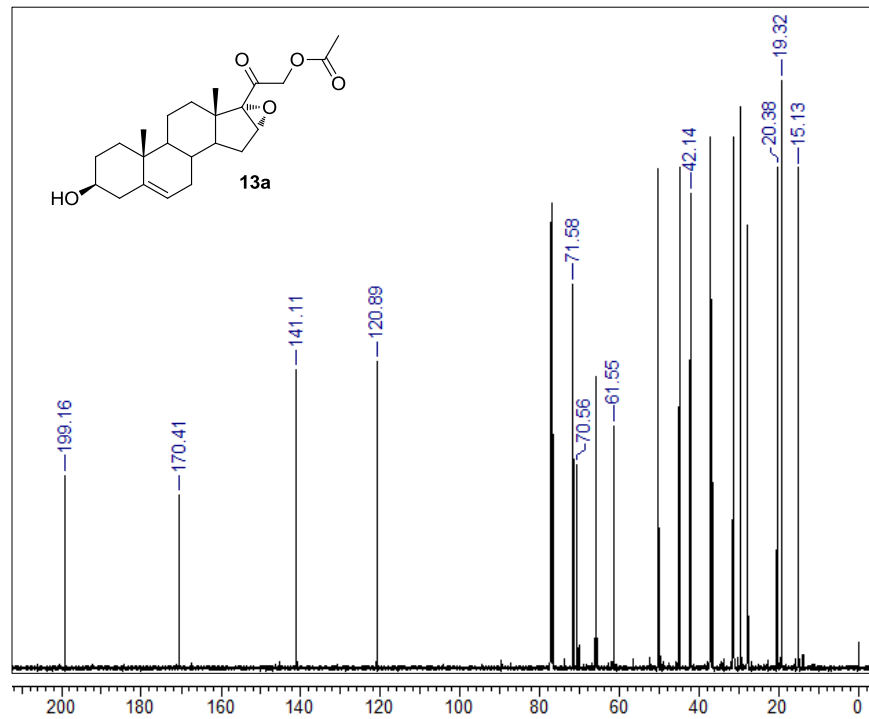
Espectro A.41 RMN de ¹H de la 21-acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-dimetoxi-3 β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-eno (12a)



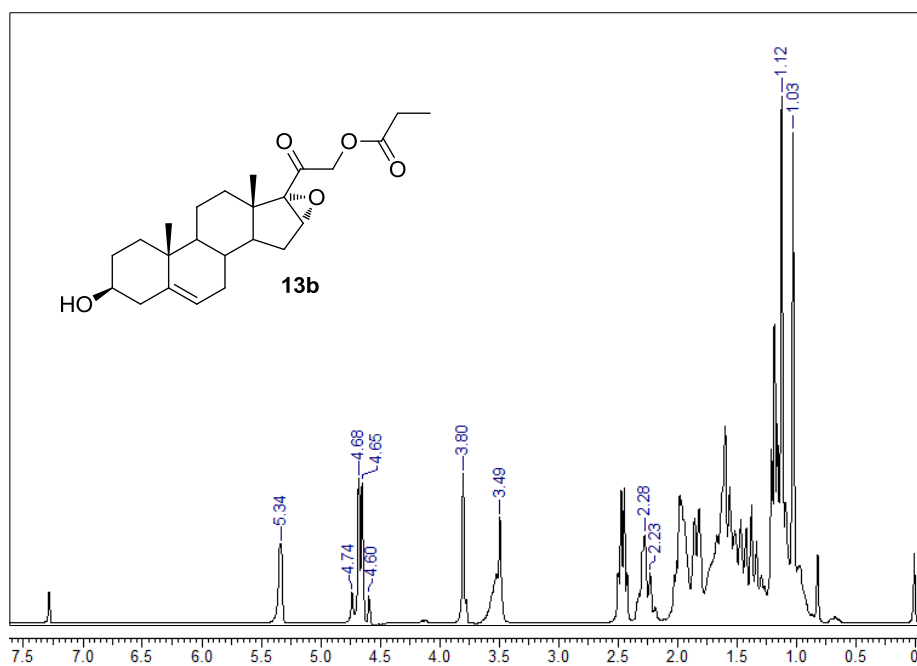
Espectro A.42 RMN de ¹³C de la 21-acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-dimetoxi-3 β -tert-butildimetilsililoxipregn-5-eno (12a)



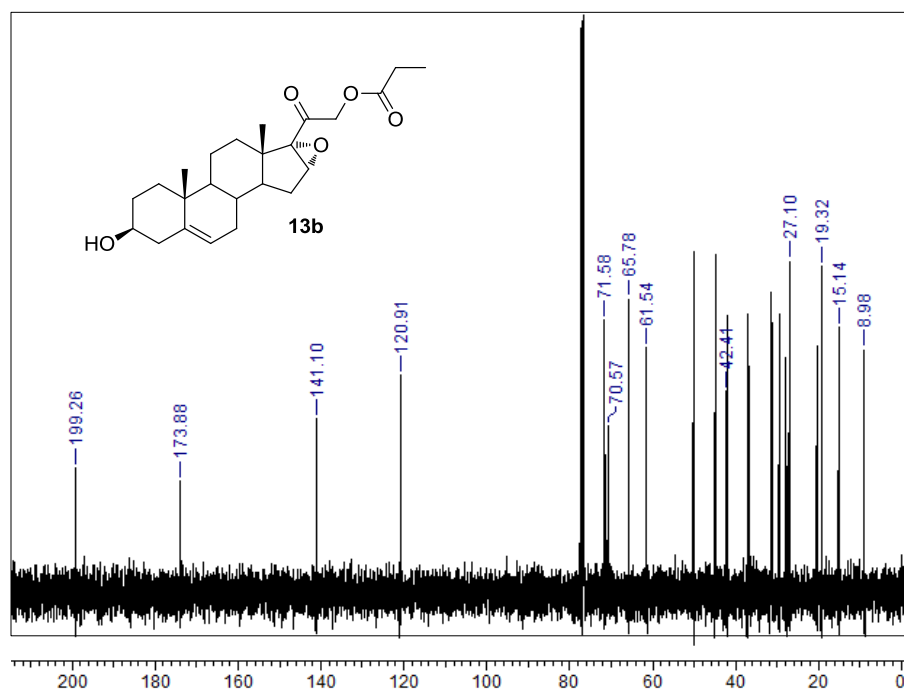
Espectro A.43 RMN de ^1H de la 21-acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13a).



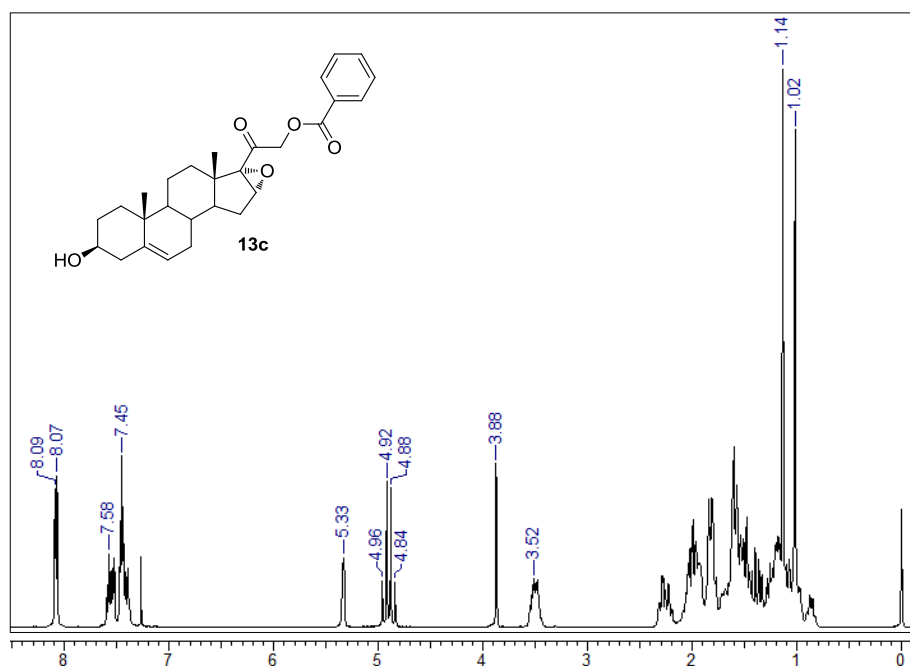
Espectro A.44 RMN de ^{13}C de la 21-acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (13a).



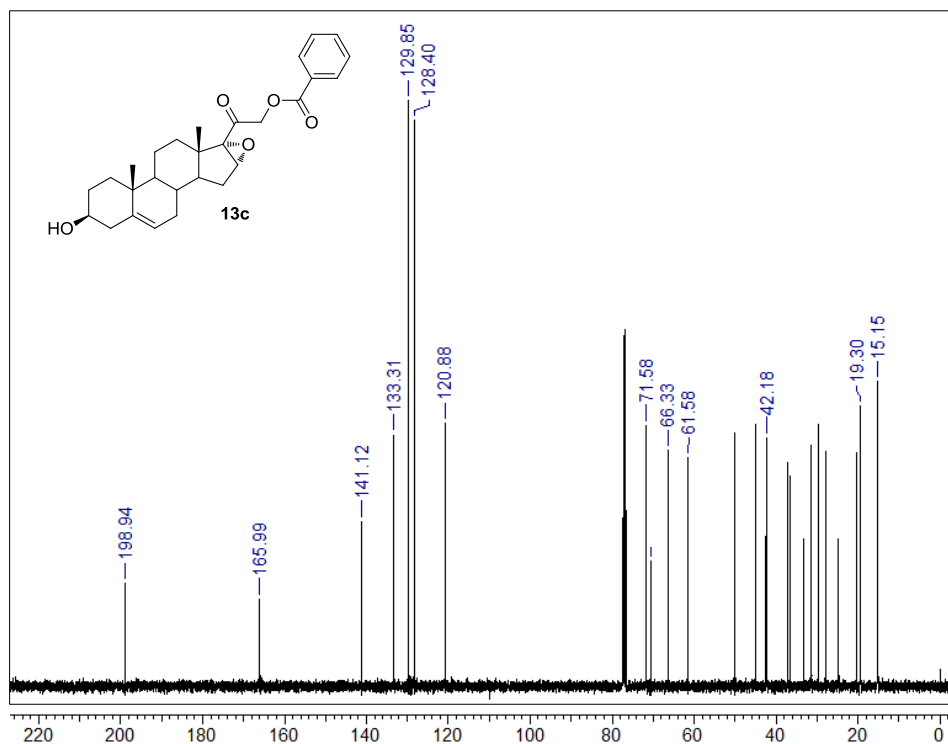
Espectro A.45 RMN de ¹H de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-propionoxipregn-5-en-20-ona (**13b**).



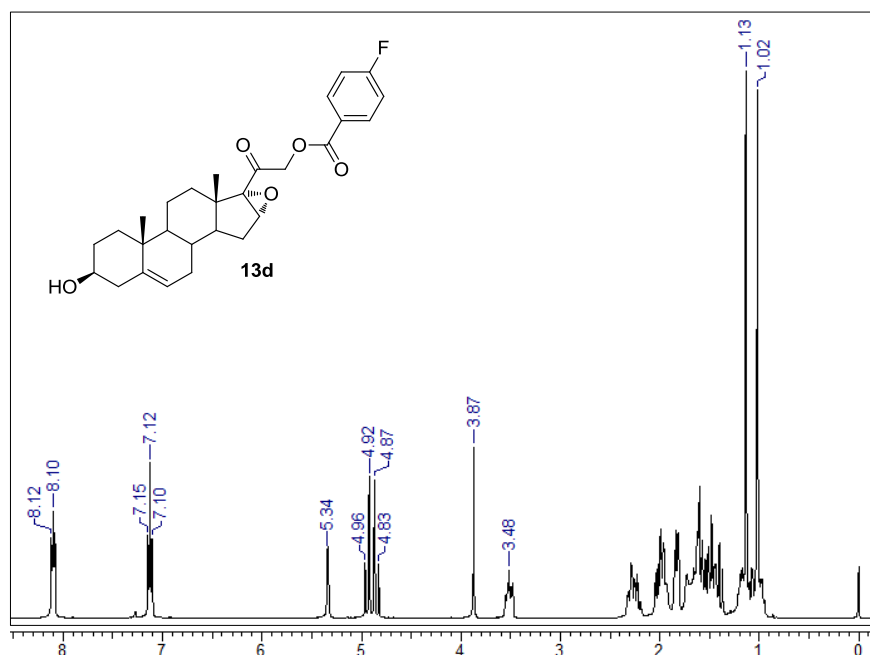
Espectro A.46 RMN de ¹³C de la 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-propionoxipregn-5-en-20-ona (**13b**).



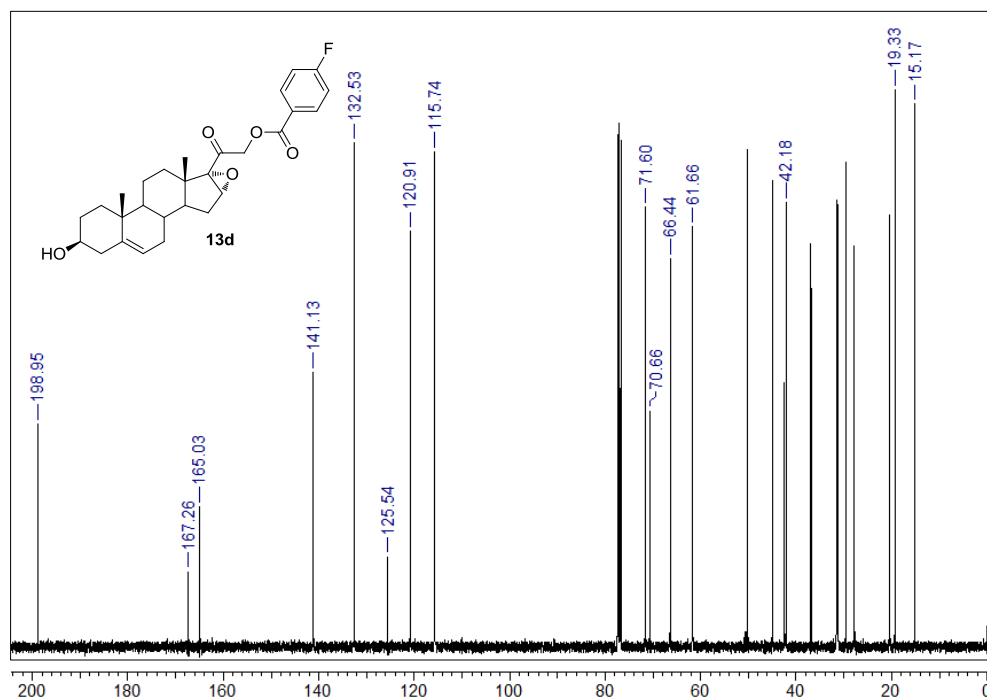
Espectro A.47 RMN de ¹H de la 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**13c**).



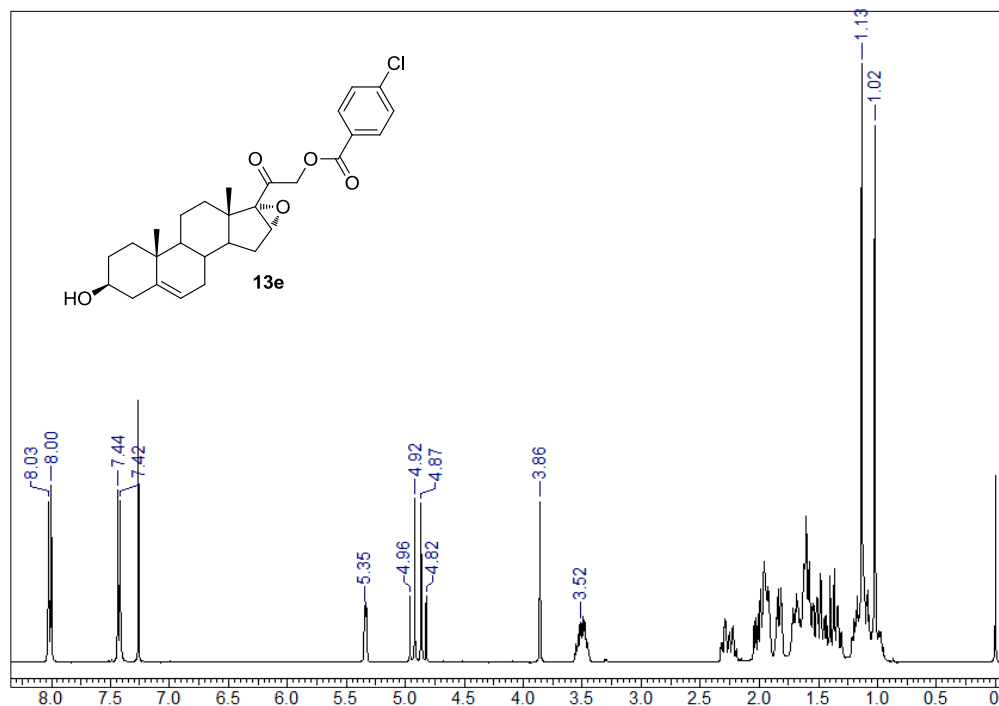
Espectro A.48 RMN de ¹³C de la 21-benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**13c**).



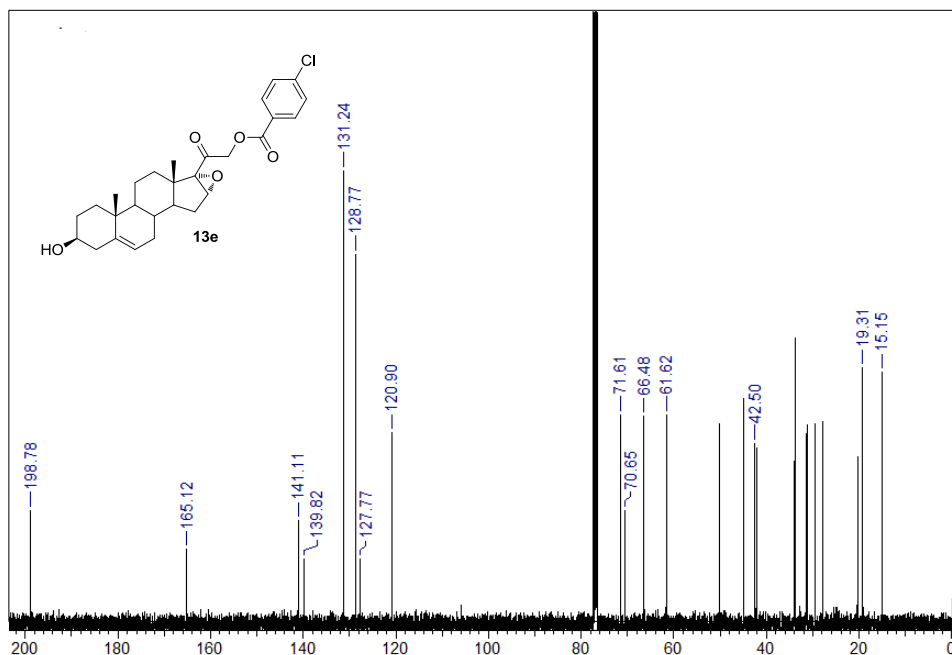
Espectro A.49 RMN de ¹H de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**13d**).



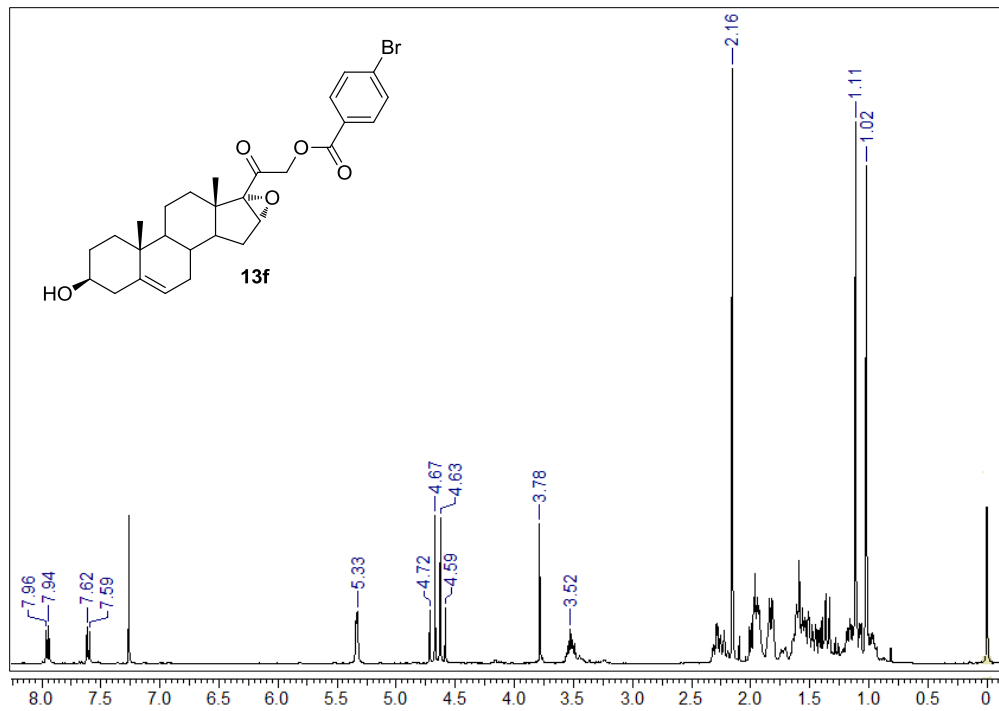
Espectro A.50 RMN de ¹³C de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**13d**).



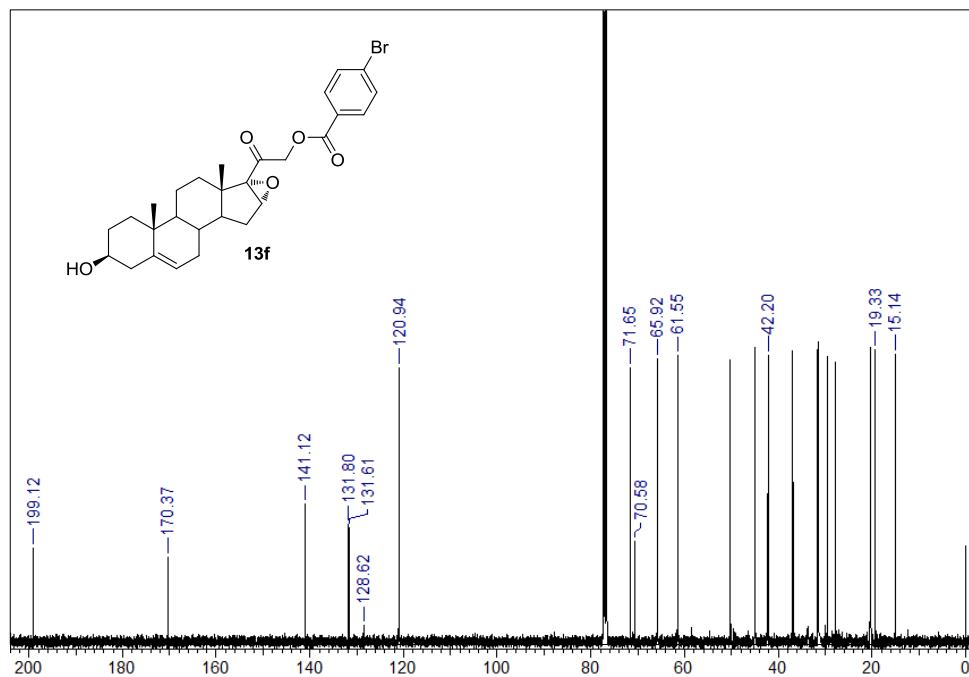
Espectro A.51 RMN de ^1H de la 21-(*p*-cloro)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**13e**)



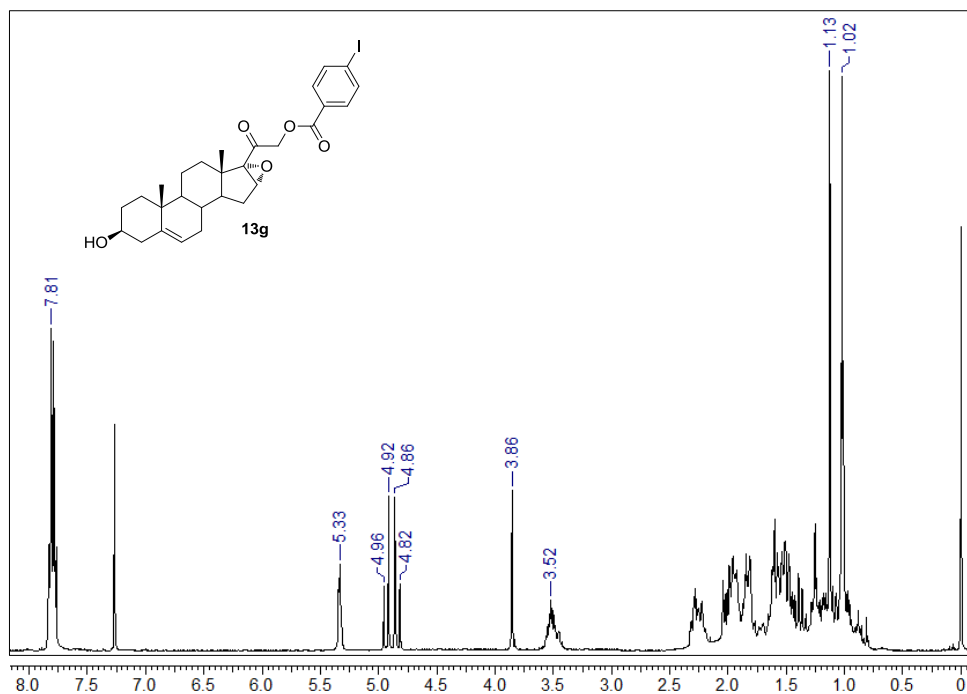
Espectro A.52 RMN de ^{13}C de la 21-(*p*-cloro)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**13e**)



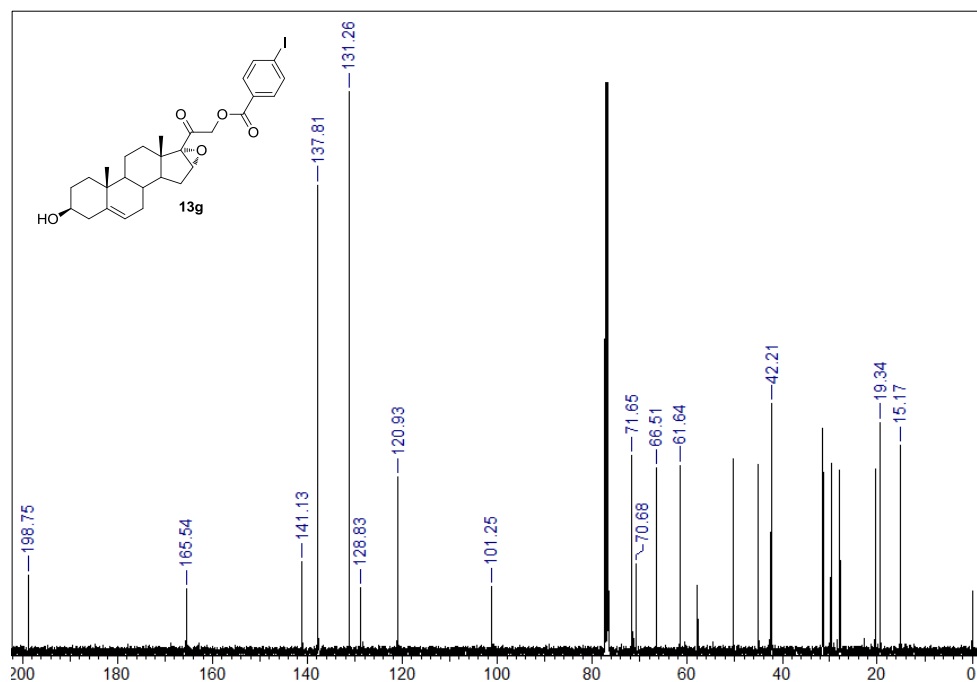
Espectro A.53 RMN de ¹H de la 21-(*p*-bromo)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**13f**).



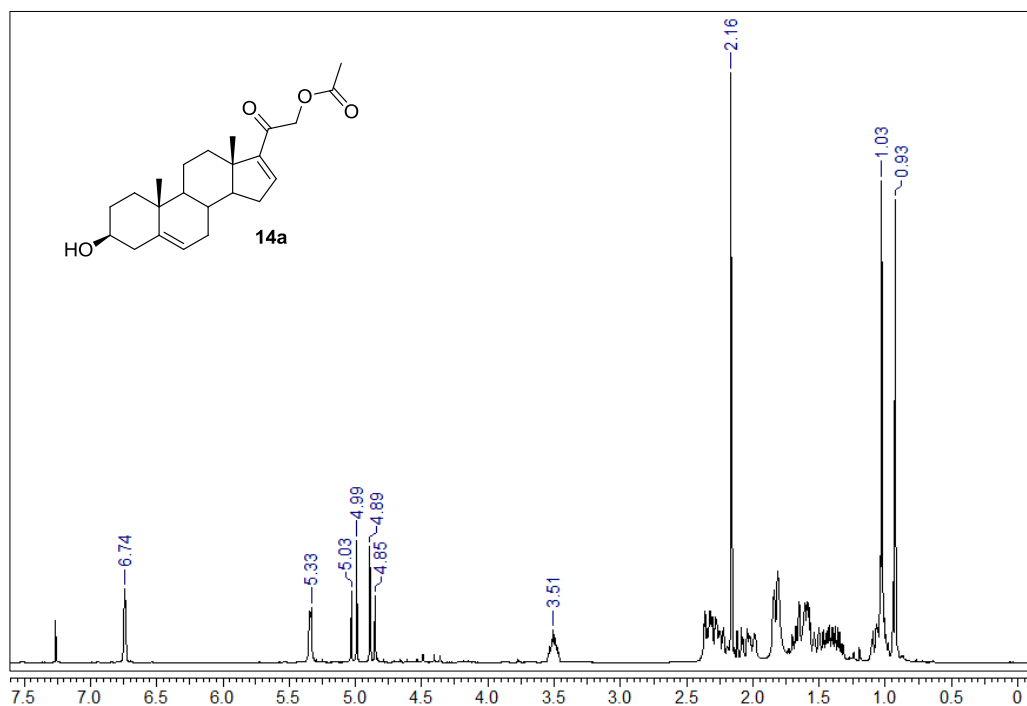
Espectro A.54 RMN de ¹³C de la 21-(*p*-bromo)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**13f**).



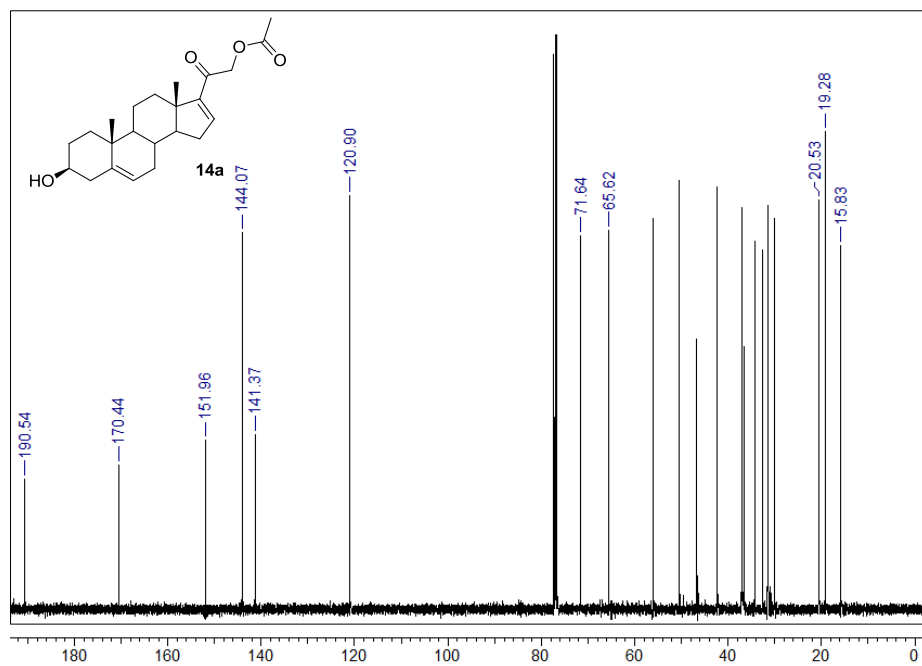
Espectro A.55 RMN de ¹H de la 21-(*p*-yodo)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**13g**)



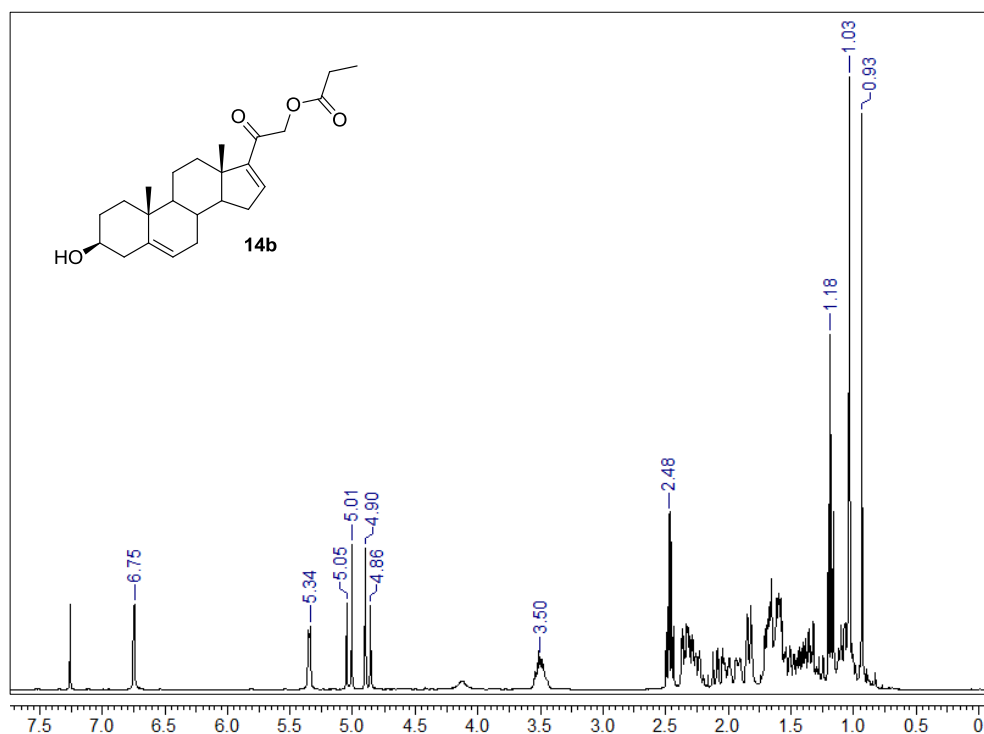
Espectro A.56 RMN de ¹³C de la 21-(*p*-yodo)benzoiloxi-16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (**13g**)



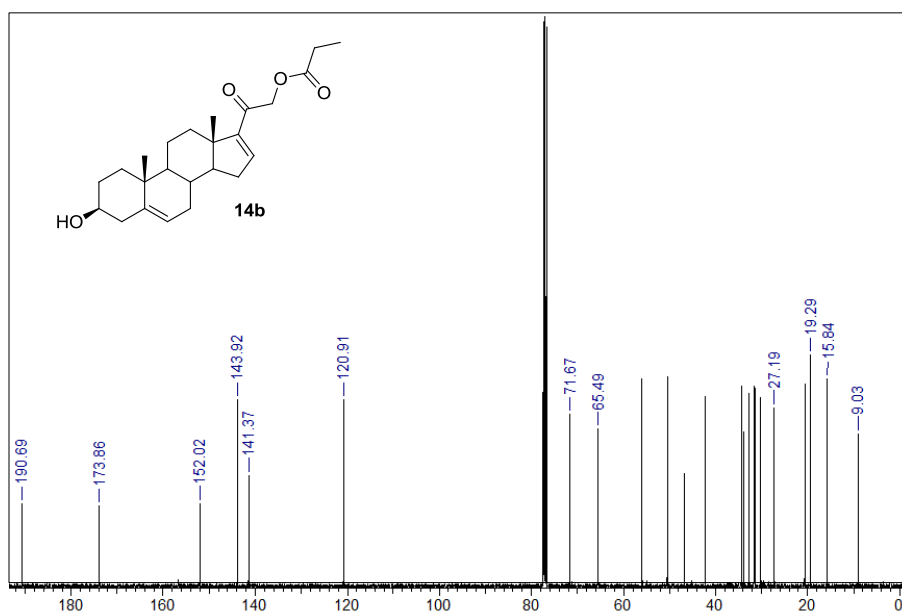
Espectro A.57 RMN de ¹H de la 21-acetoxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (**14a**)



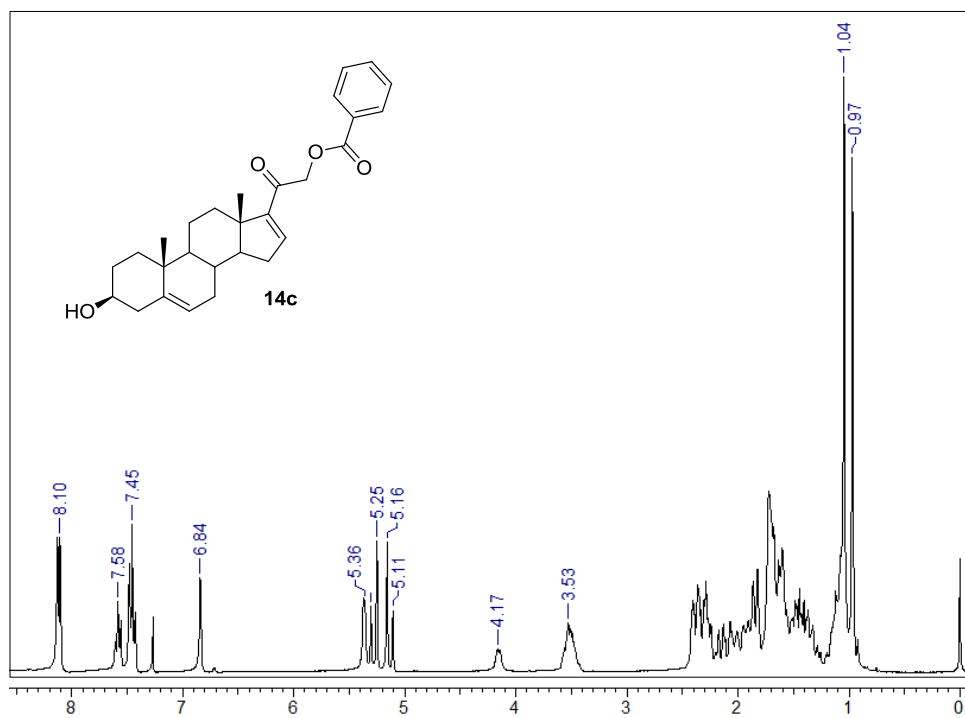
Espectro A.58 RMN de ¹³C de la 21-acetoxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (**14a**)



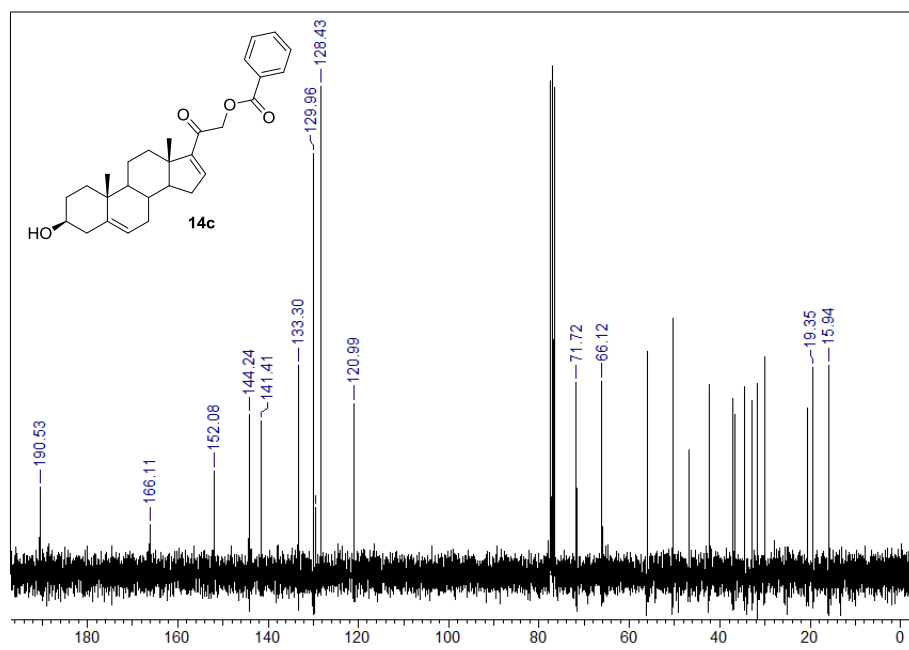
Espectro A.59 RMN de ¹H de la 3β-hidroxi-21-propionoxipregna-5,16-dien-20-ona (**14b**)



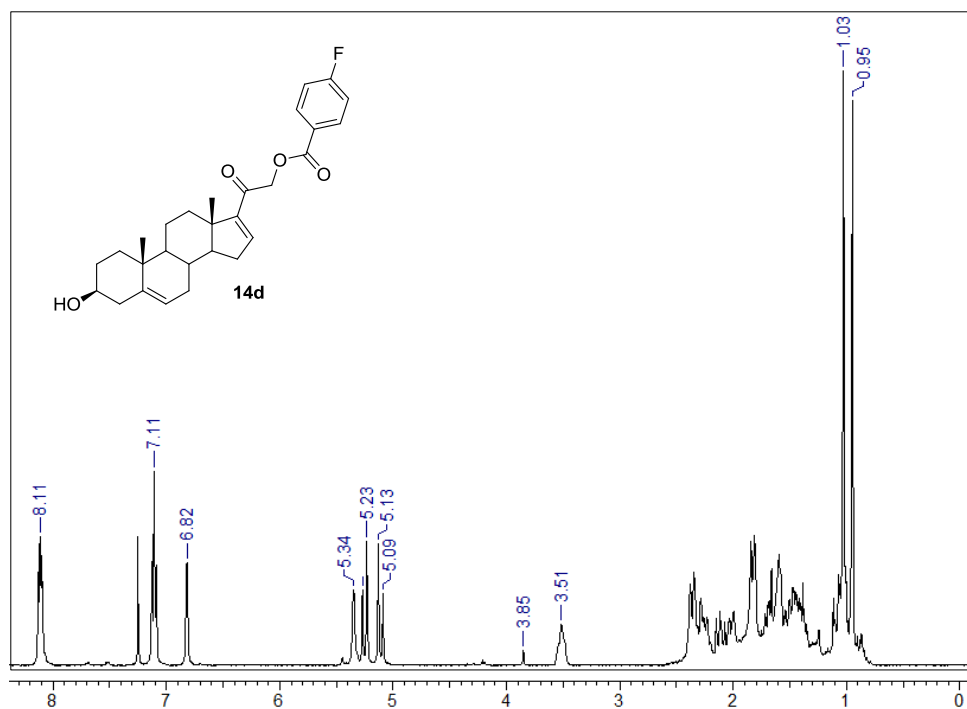
Espectro A.60 RMN de ¹³C de la 3β-hidroxi-21-propionoxipregna-5,16-dien-20-ona (**14b**)



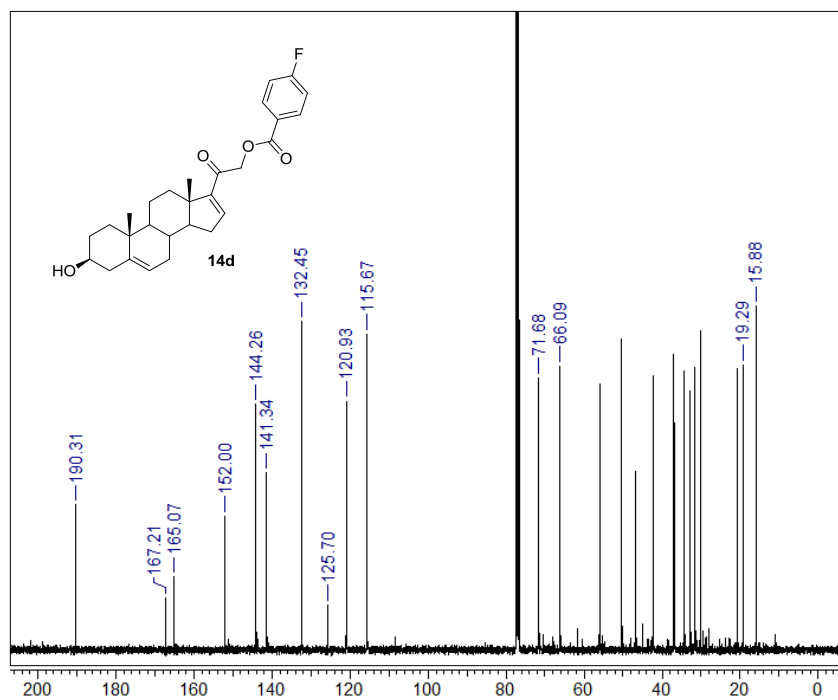
Espectro A.61 RMN de ¹H de la 21-benzoiloxi-3β-hidroxi-pregna-5,16-dien-20-ona (**14c**)



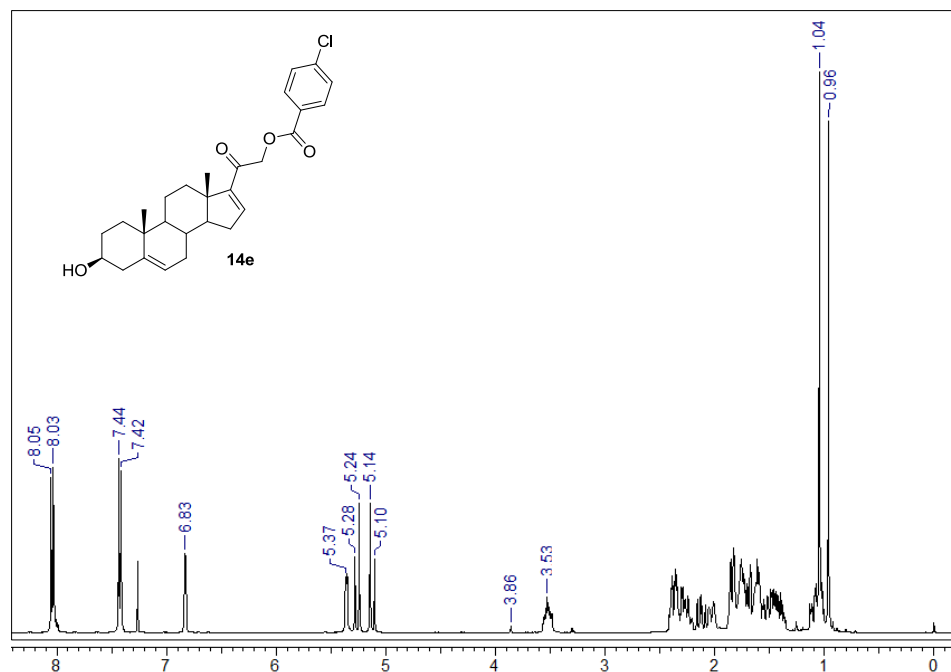
Espectro A.62 RMN de ¹³C de la 21-benzoiloxi-3β-hidroxi-pregna-5,16-dien-20-ona (**14c**)



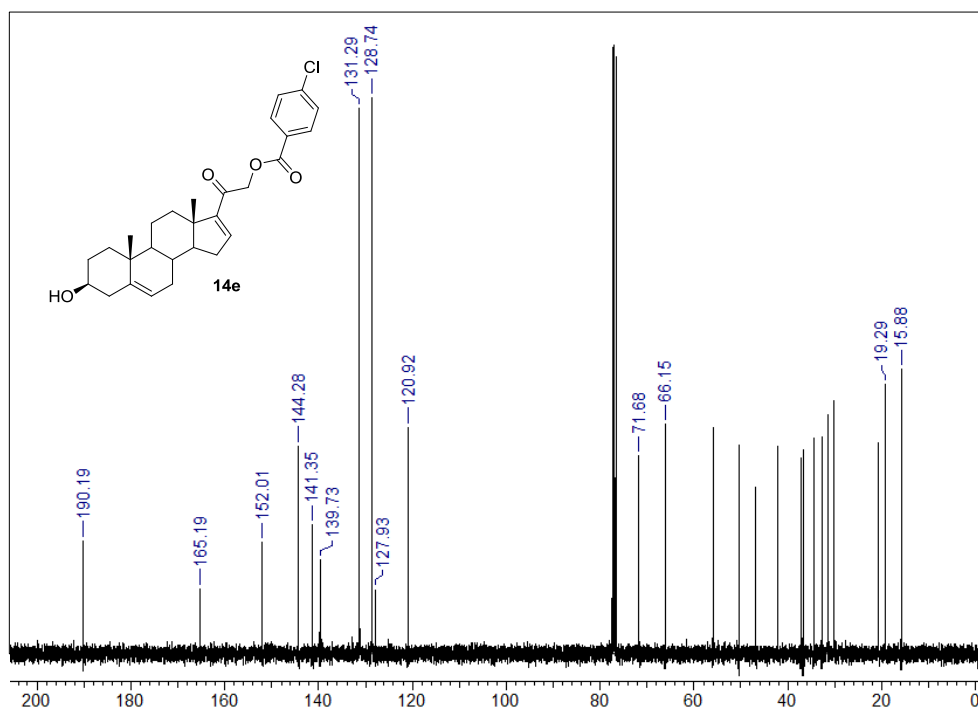
Espectro A.63 RMN de ¹H de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (**14d**)



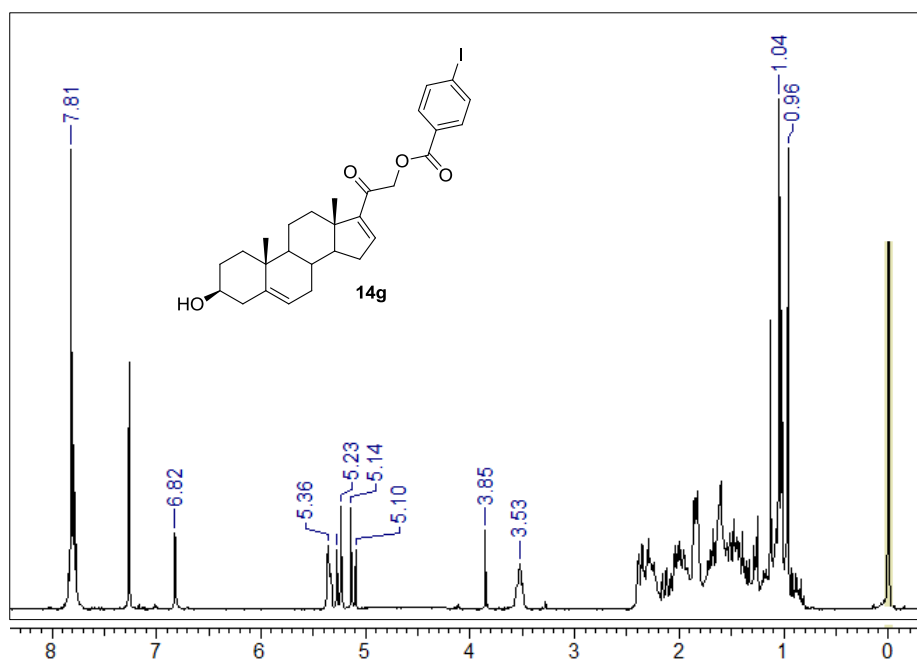
Espectro A.64 RMN de ¹³C de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (**14d**)



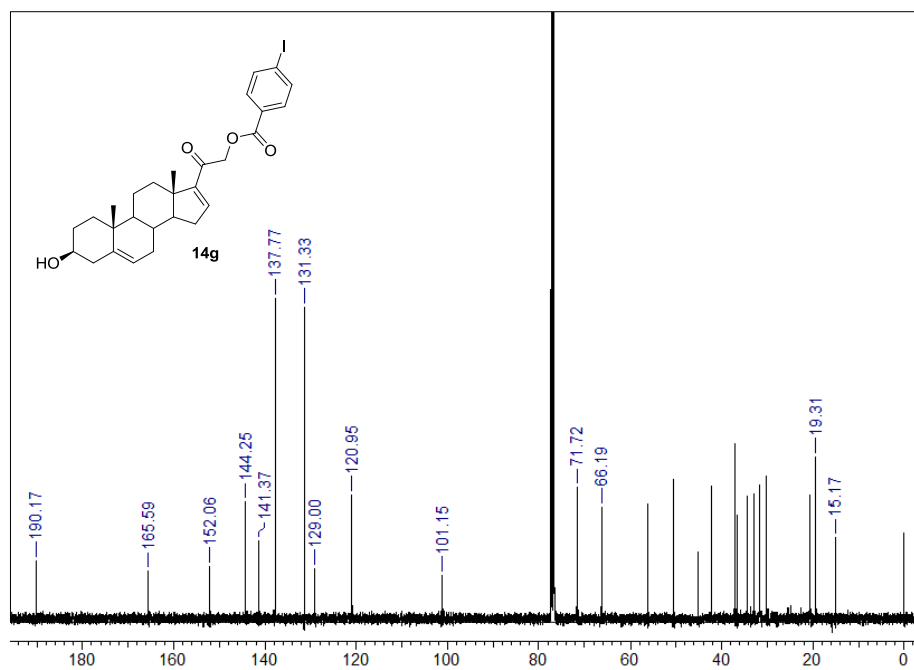
Espectro A.65 RMN de ^1H de la 21-(*p*-cloro)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (**14e**)



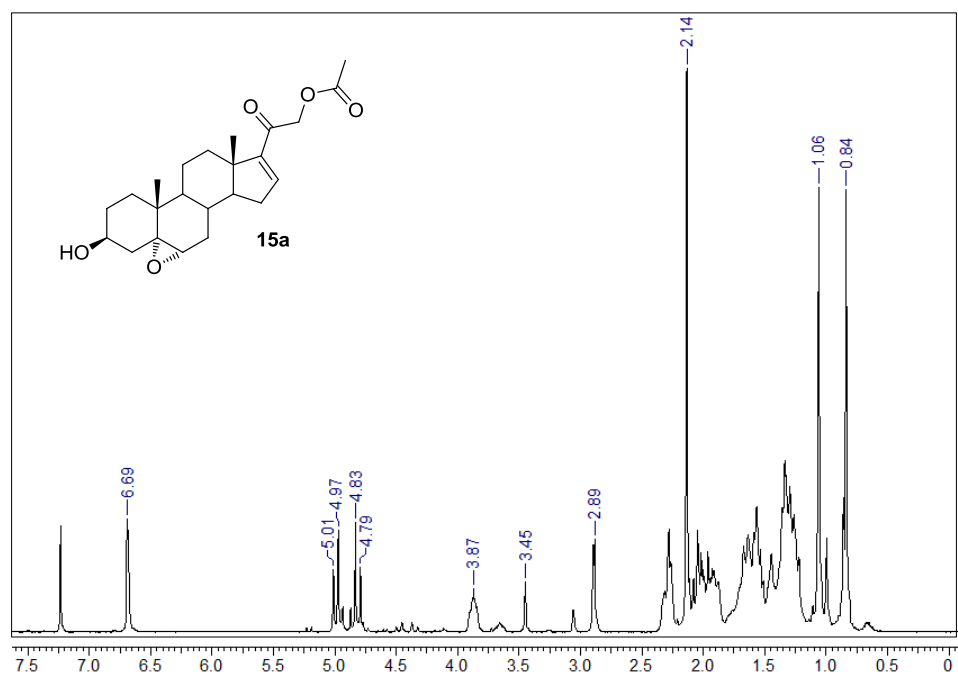
Espectro A.66 RMN de ^{13}C de la 21-(*p*-cloro)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (**14e**)



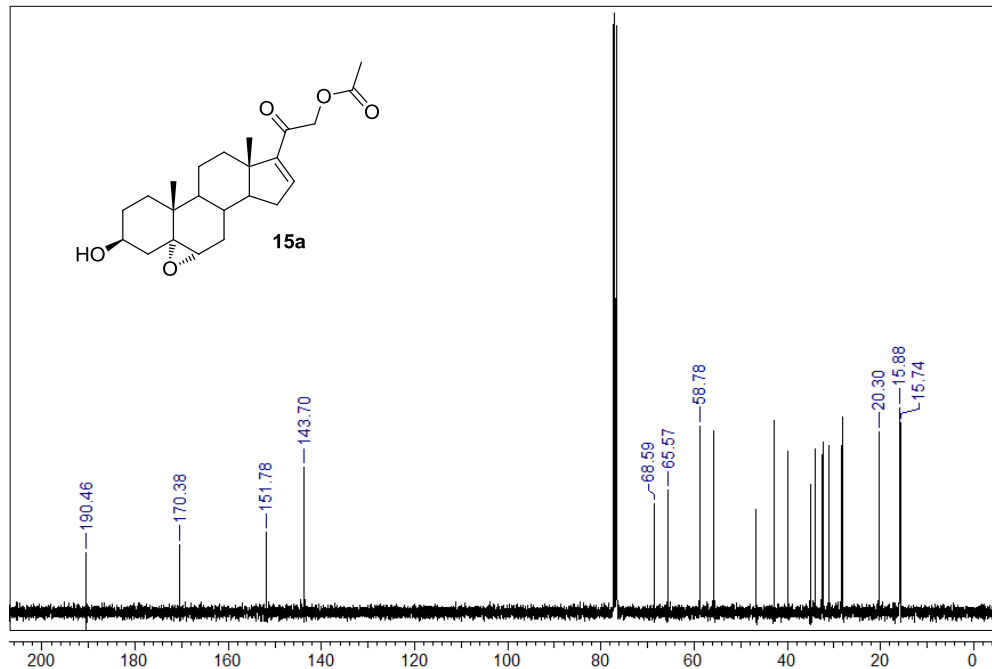
Espectro A.67 RMN de ^1H de la 21-(*p*-yodo)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (**14g**)



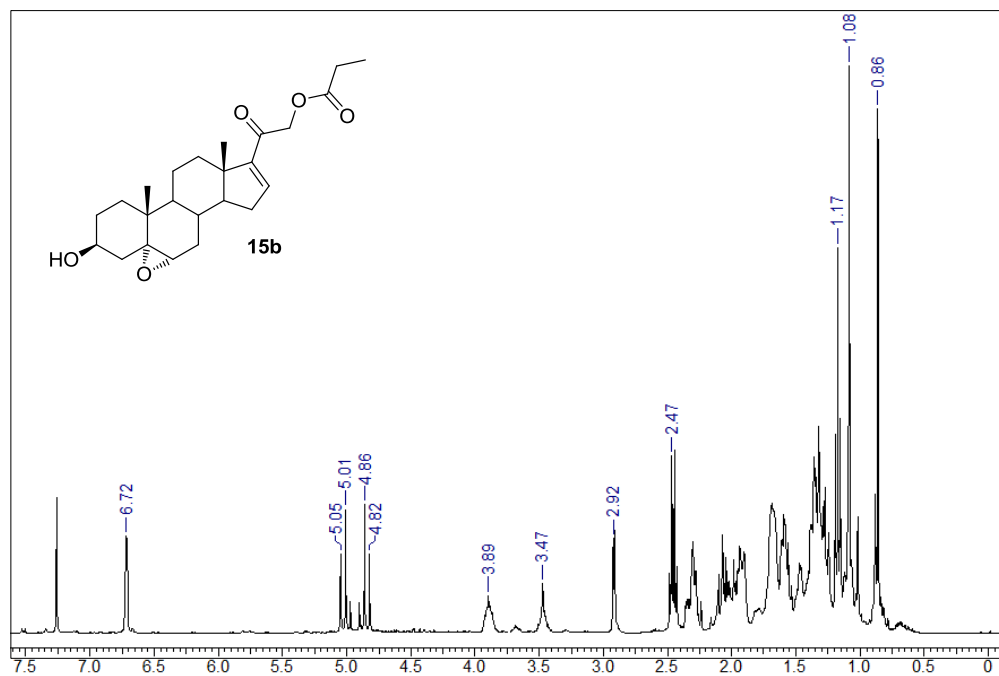
Espectro A.68 RMN de ^{13}C de la 21-(*p*-yodo)benzoiloxi-3 β -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (**14g**)



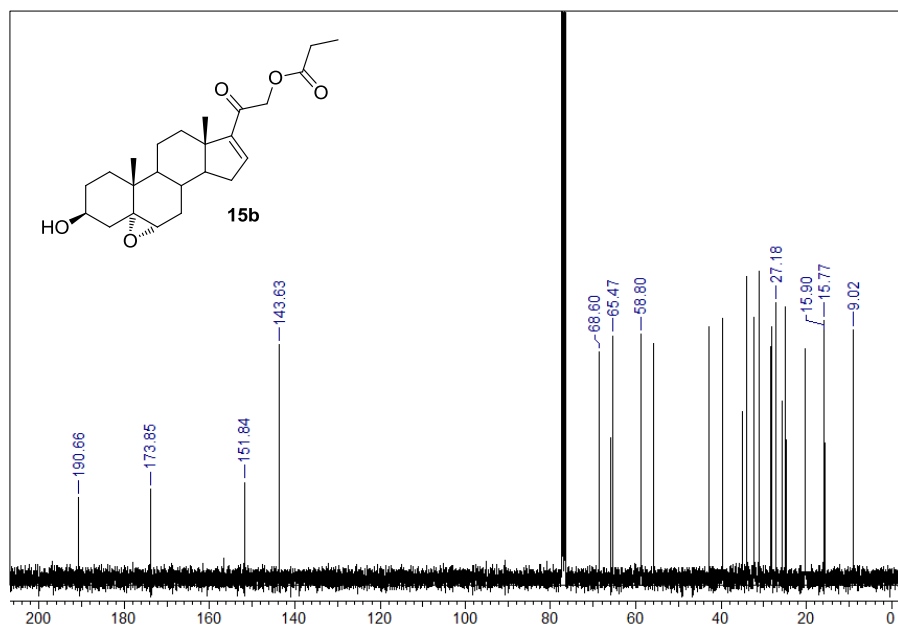
Espectro A.69 RMN de ¹H de la 21-acetoxi-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-16-en-20-ona (15a).



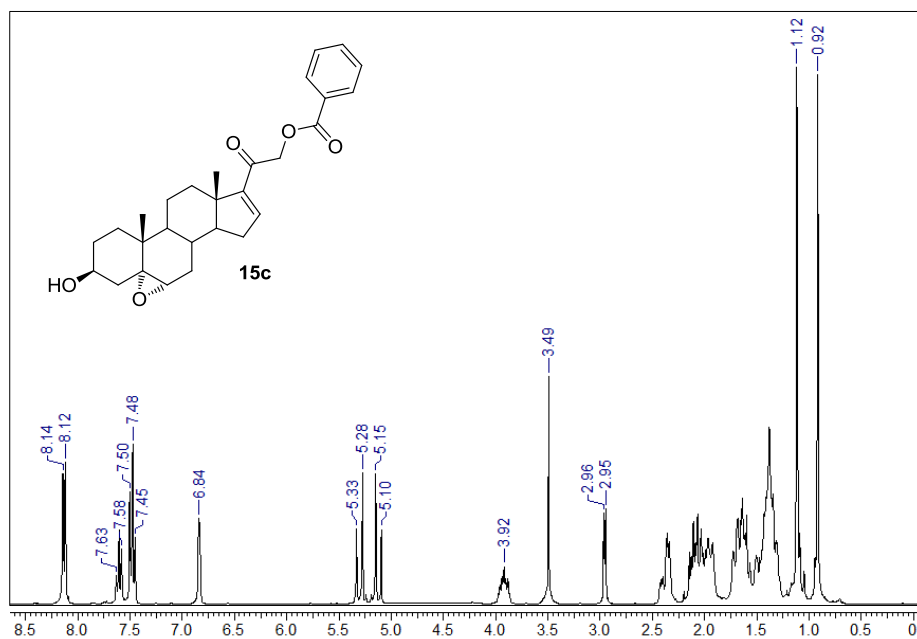
Espectro A.70 RMN de ¹³C de la 21-acetoxi-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-16-en-20-ona (15a).



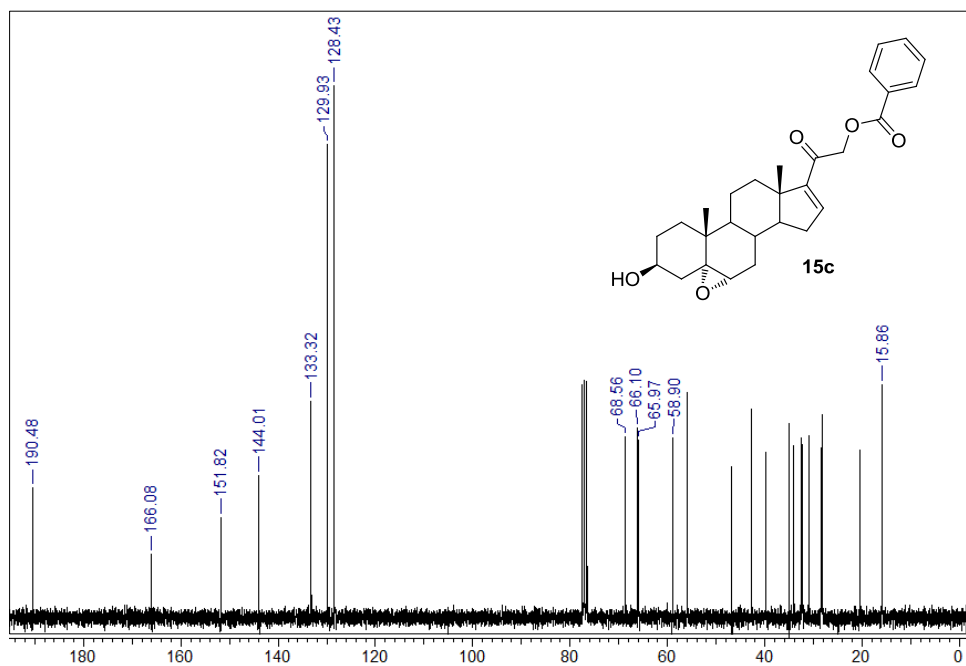
Espectro A.71 RMN de ¹H de la 5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-propionoxipregn-16-en-20-ona (**15b**).



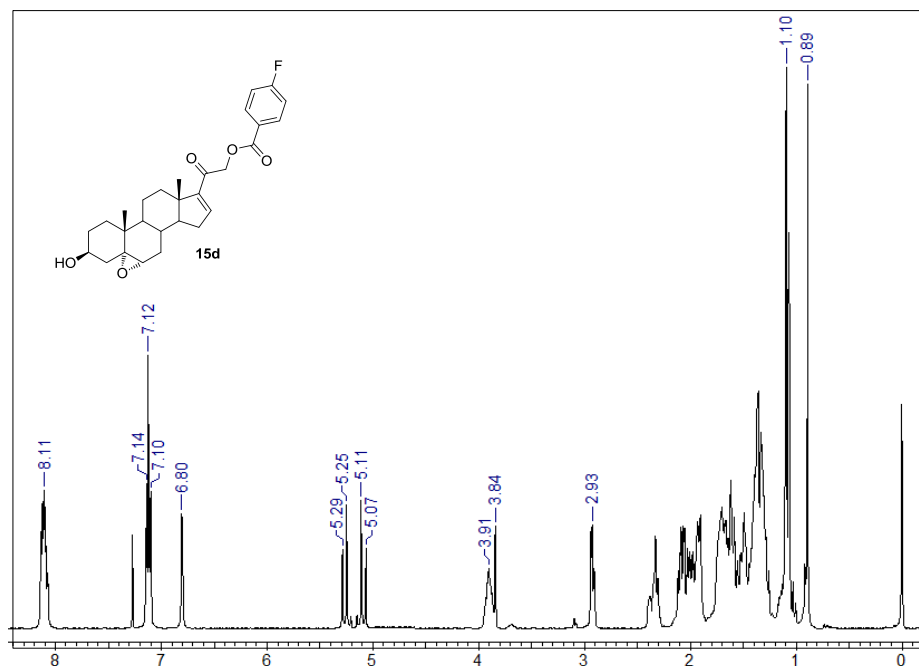
Espectro A.72 RMN de ¹³C de la 5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxi-21-propionoxipregn-16-en-20-ona (**15b**).



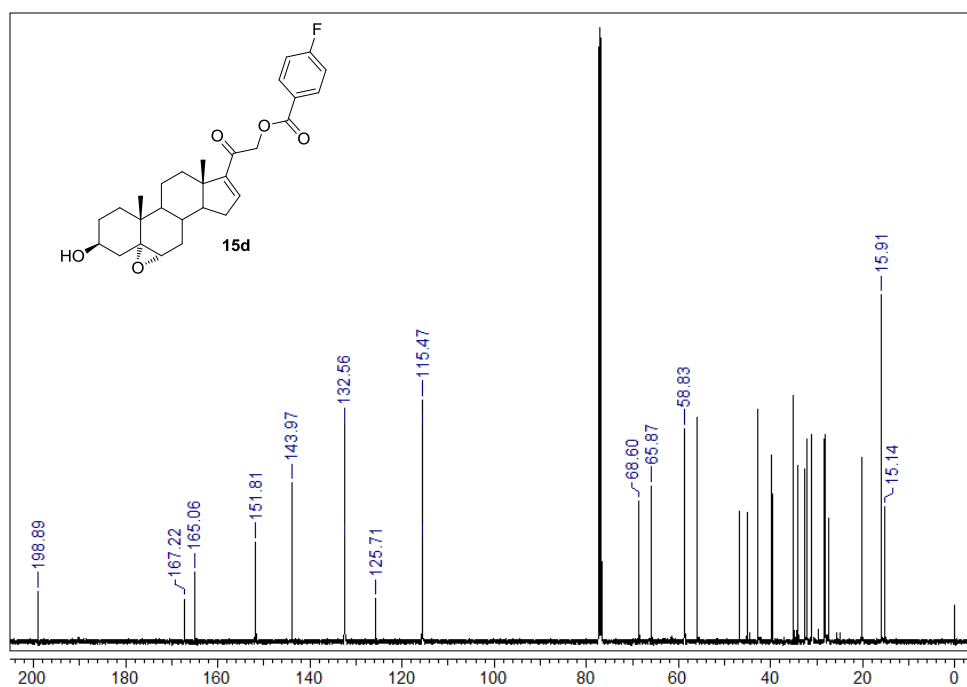
Espectro A.73 RMN de ¹H de la 21-benzoiloxi-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-16-en-20-ona (15c).



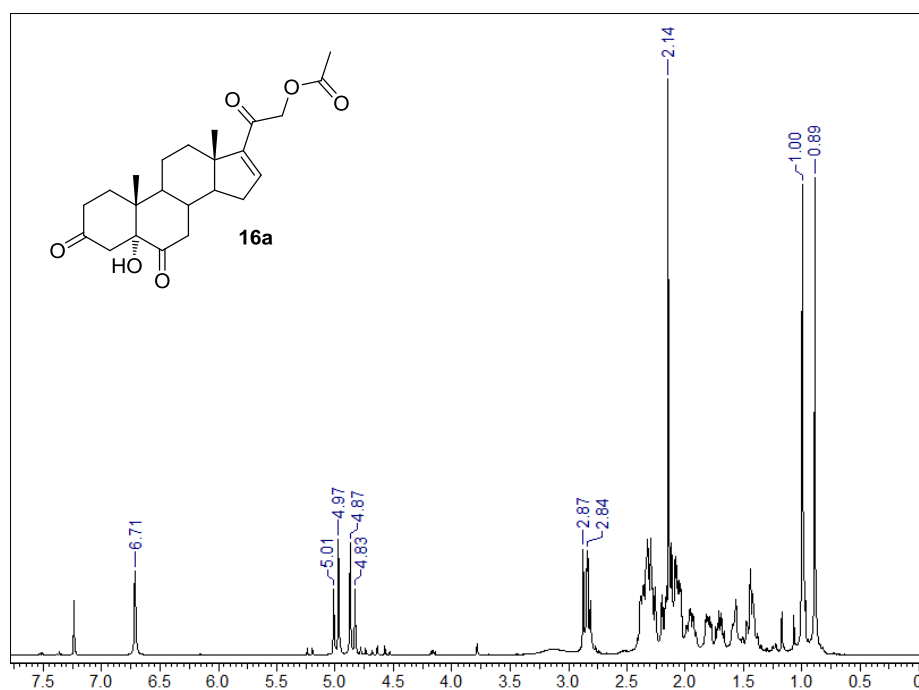
Espectro A.74 RMN de ¹³C de la 21-benzoiloxi-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-16-en-20-ona (15c).



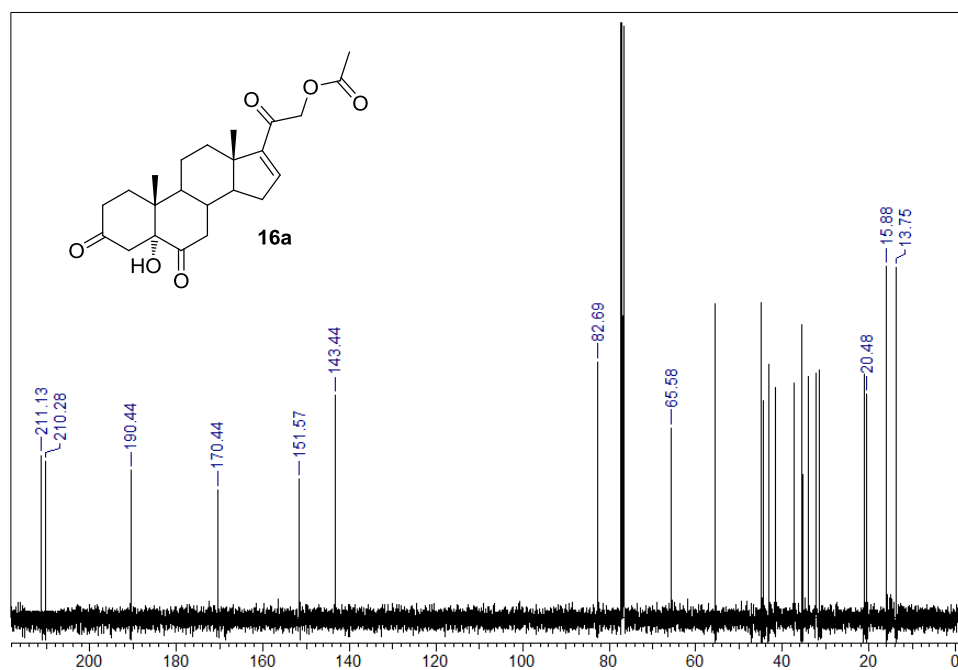
Espectro A.75 RMN de ¹H de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxi-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-16-en-20-ona (**15d**).



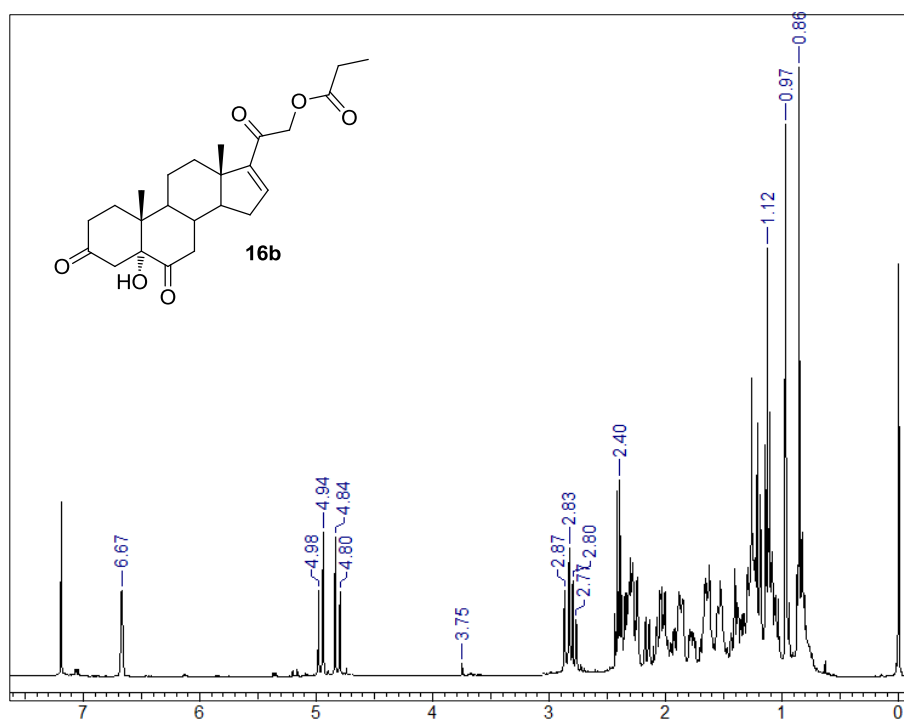
Espectro A.76 RMN de ¹³C de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxi-5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-16-en-20-ona (**15d**).



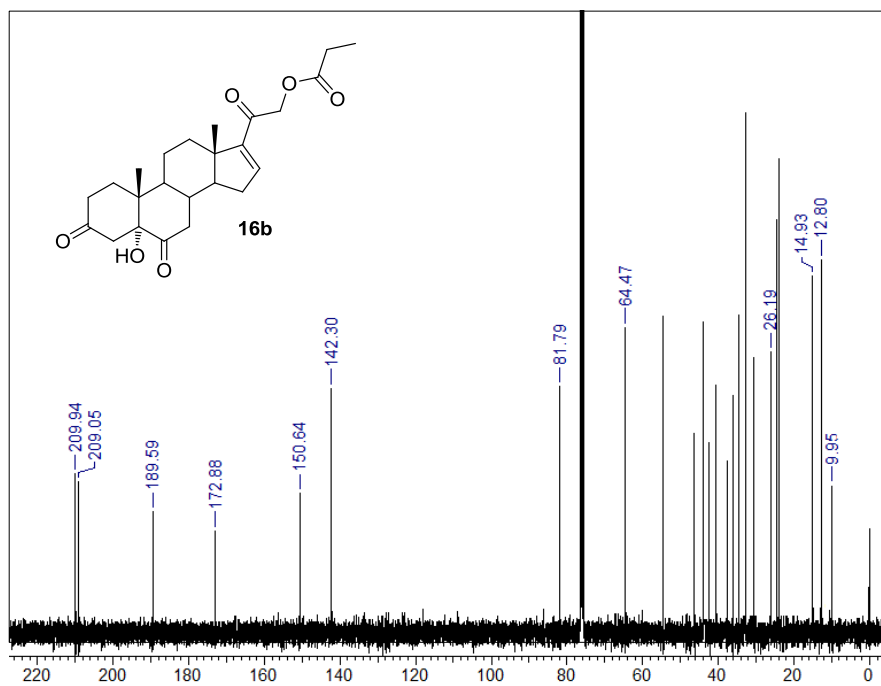
Espectro A.77 RMN de ¹H de la 21-acetoxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16a).



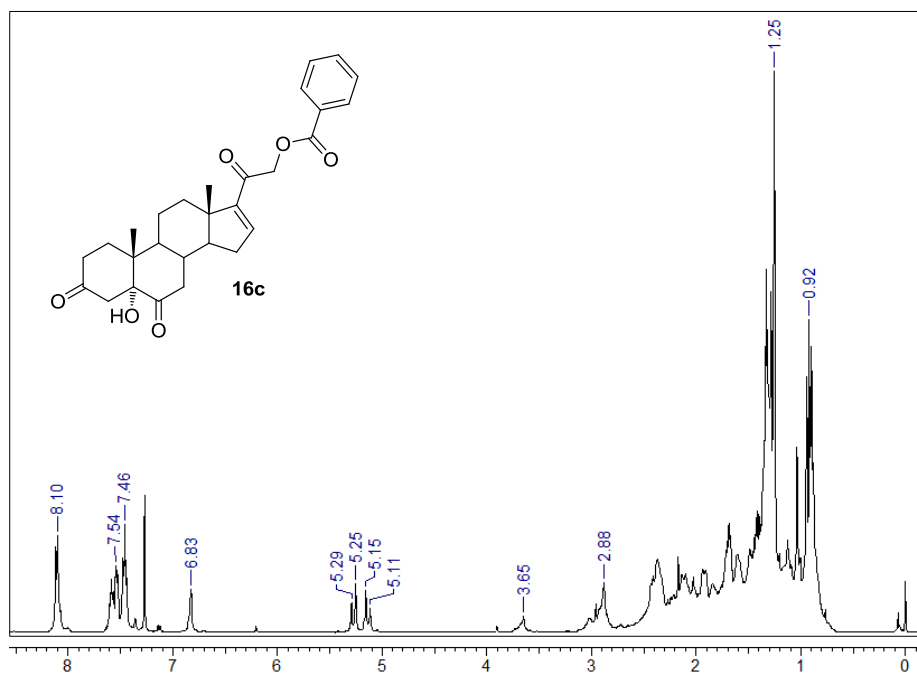
Espectro A.78 RMN de ¹³C de la 21-acetoxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16a).



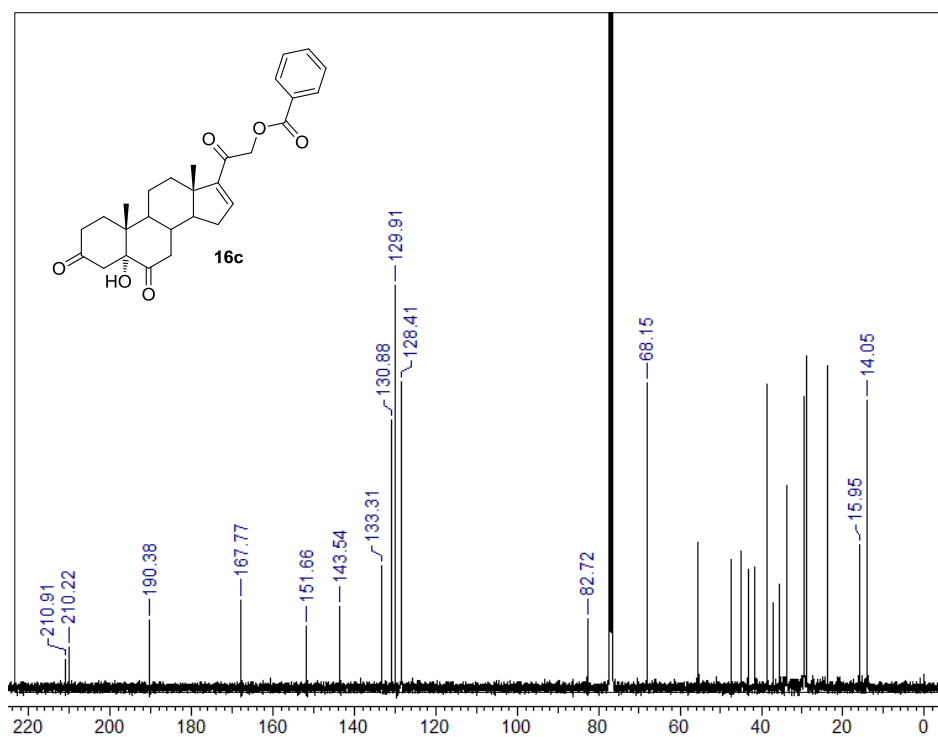
Espectro A.79 RMN de ^1H de la 5-hidroxi-21-propionoxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16b).



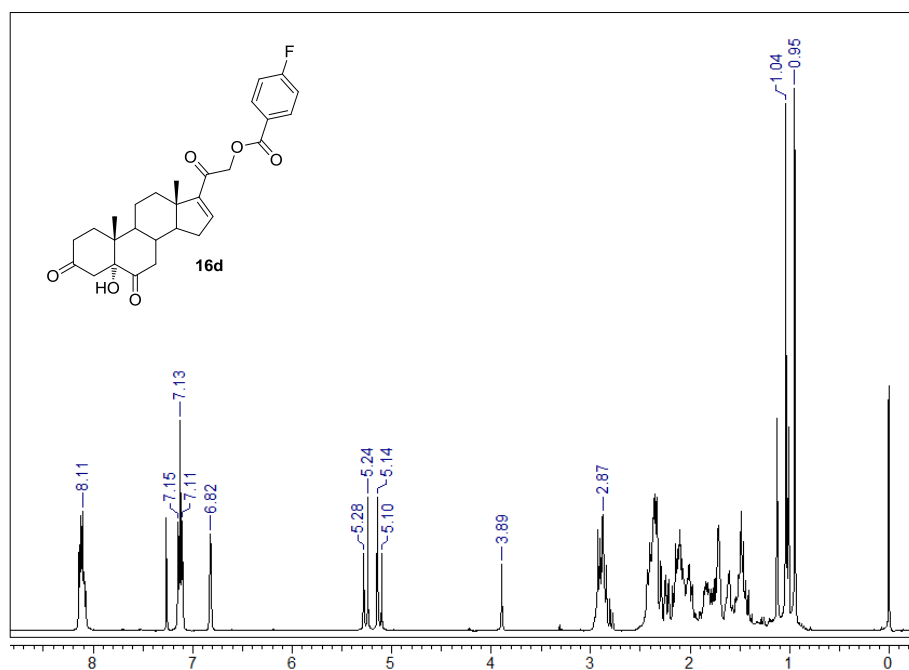
Espectro A.80 RMN de ^{13}C de la 5-hidroxi-21-propionoxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (16b).



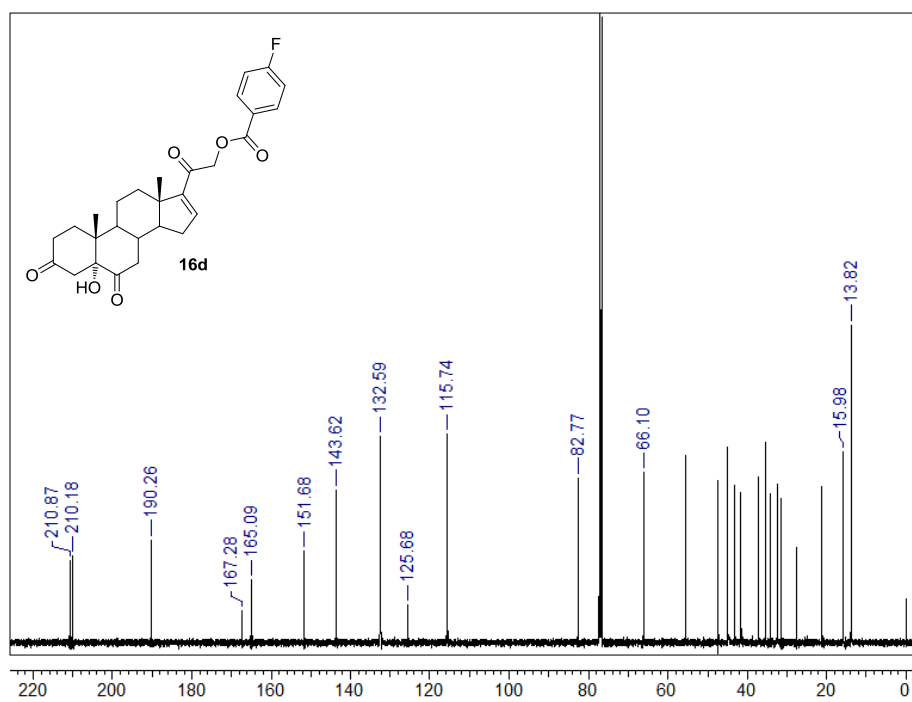
Espectro A.81 RMN de ¹H de la 21-benzoiloxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (**16c**).



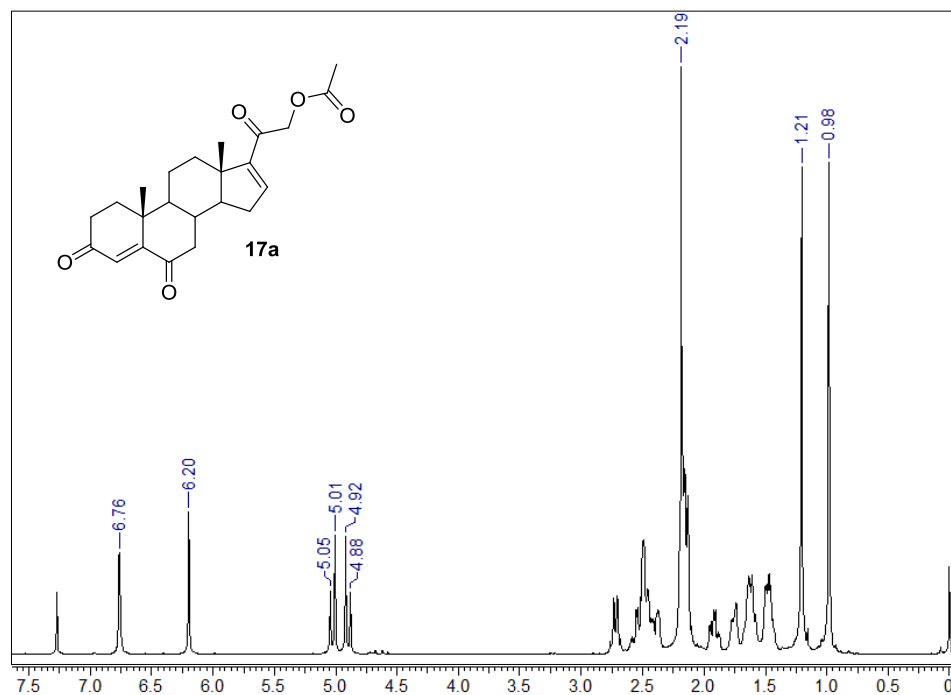
Espectro A.82 RMN de ¹³C de la 21-benzoiloxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (**16c**).



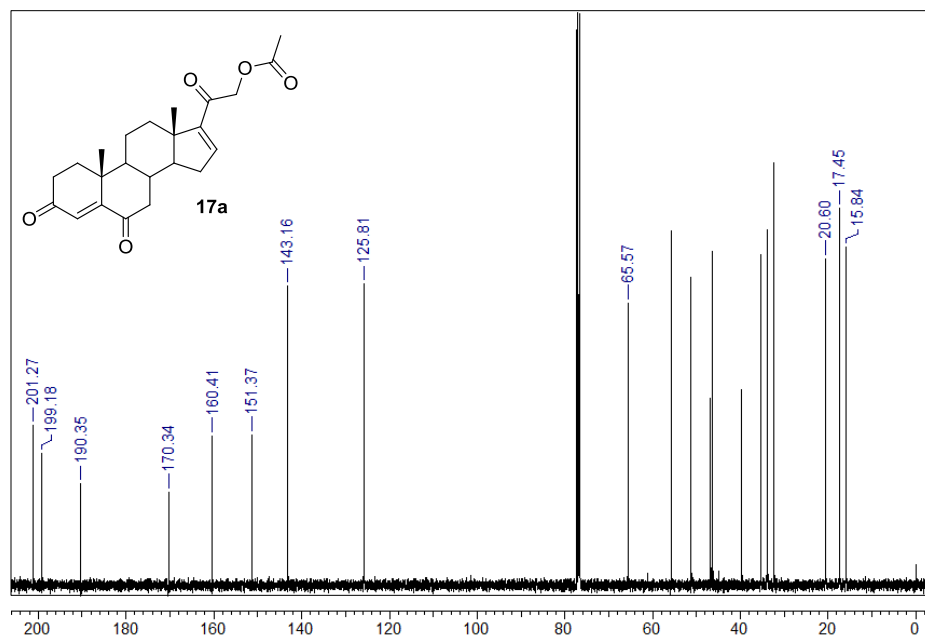
Espectro A.83 RMN de ¹H de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (**16d**).



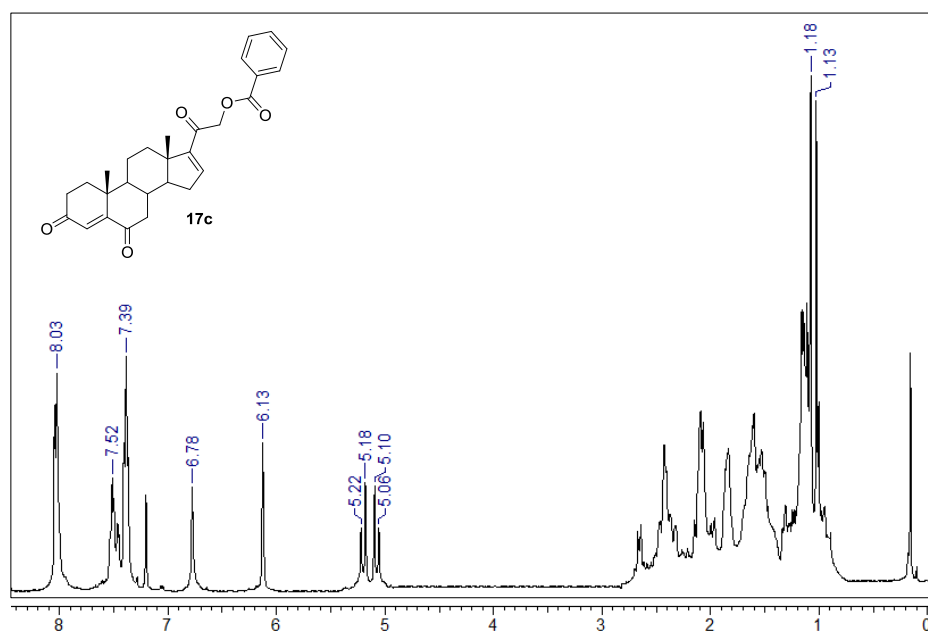
Espectro A.84 RMN de ¹³C de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxi-5-hidroxi-5 α -pregn-16-en-3,6,20-triona (**16d**).



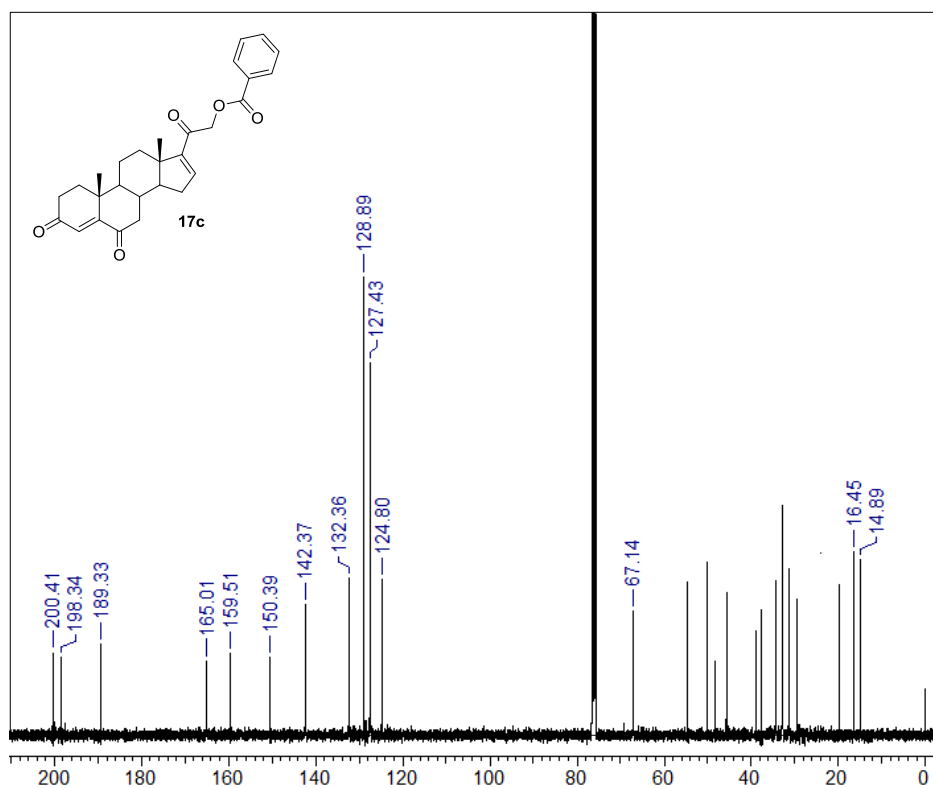
Espectro A.85 RMN de ^1H de la 21-acetoxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (**17a**).



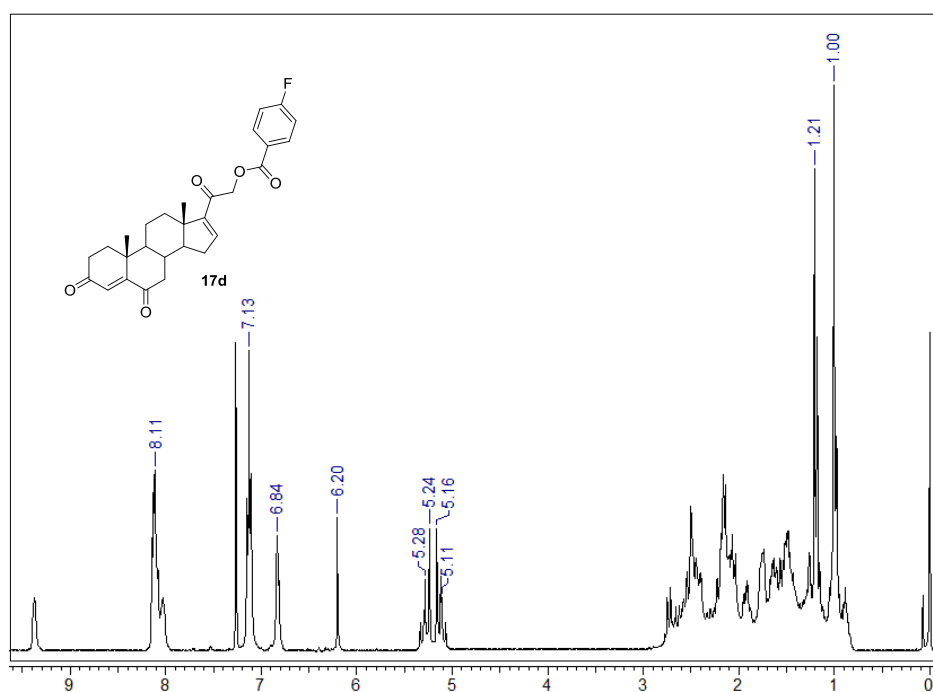
Espectro A.86 RMN de ^{13}C de la 21-acetoxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (**17a**).



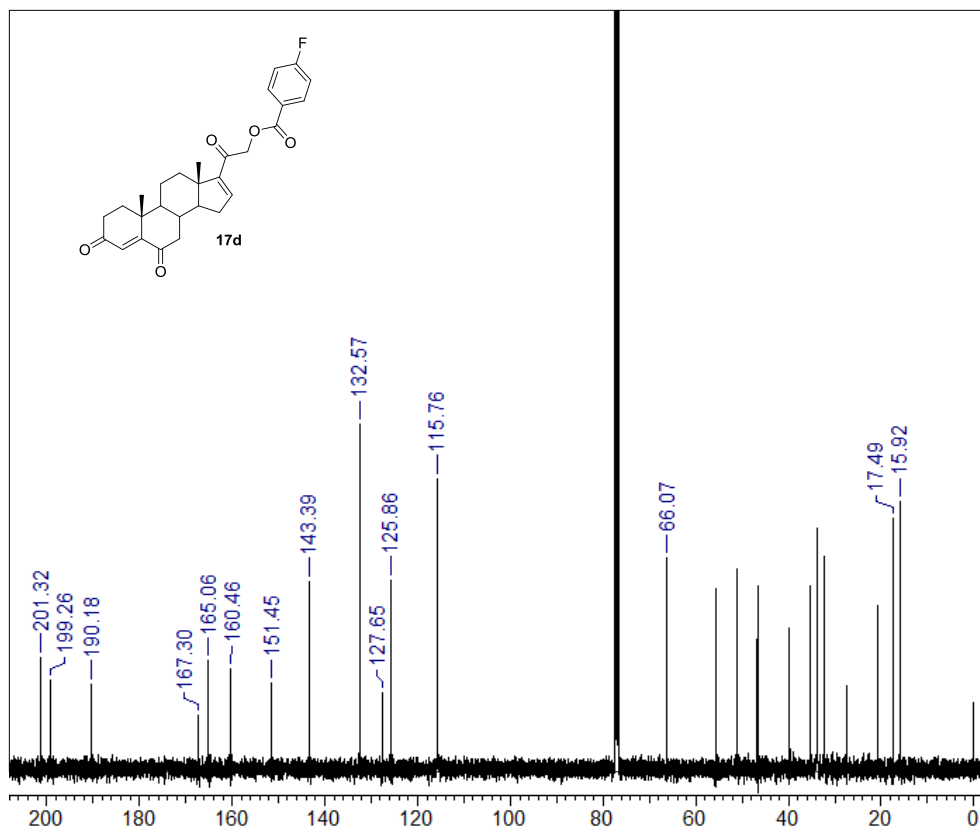
Espectro A.87 RMN de ^1H de la 21-benzoiloxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (**17c**).



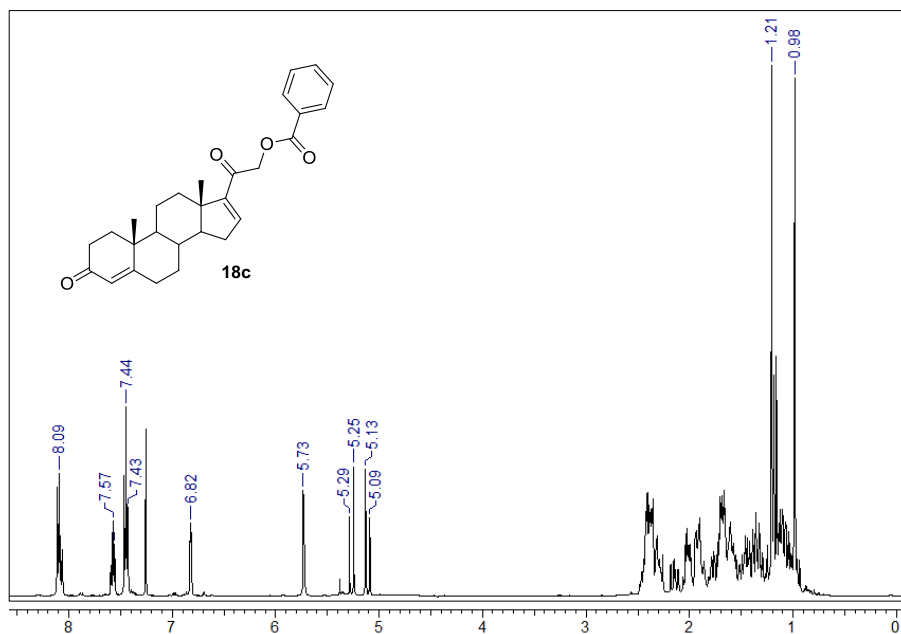
Espectro A.88 RMN de ^{13}C de la 21-benzoiloxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (**17c**).



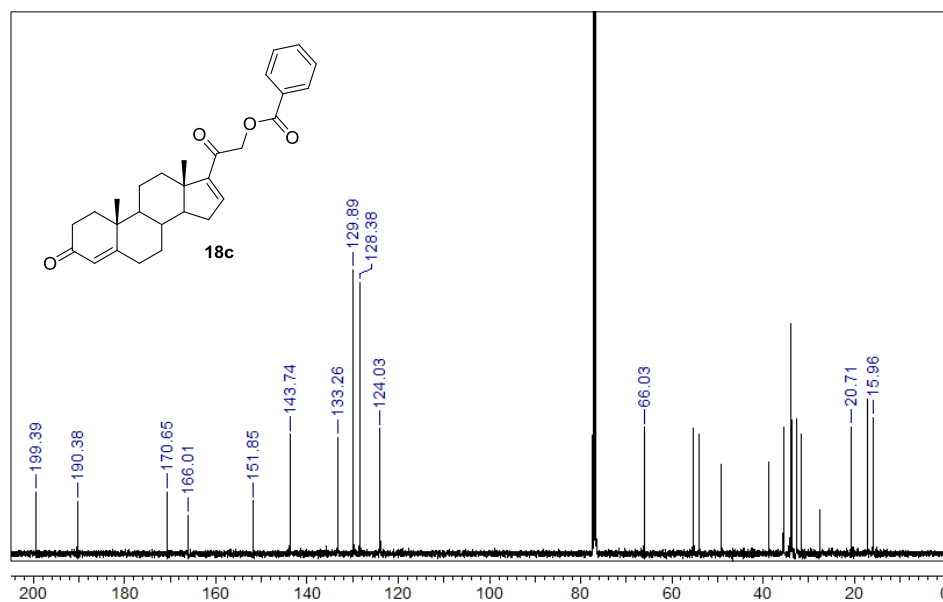
Espectro A.89 RMN de ^1H de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (**17d**).



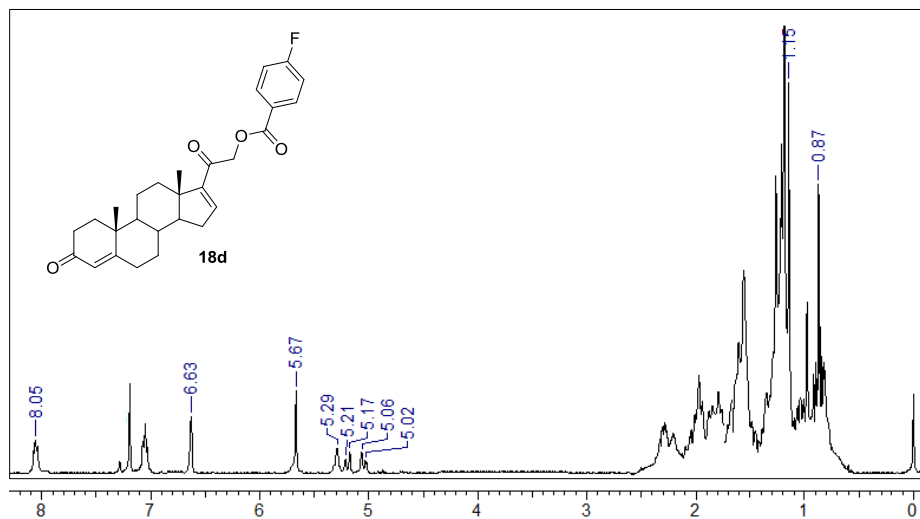
Espectro A.90 RMN de ^{13}C de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,6,20-triona (**17d**).



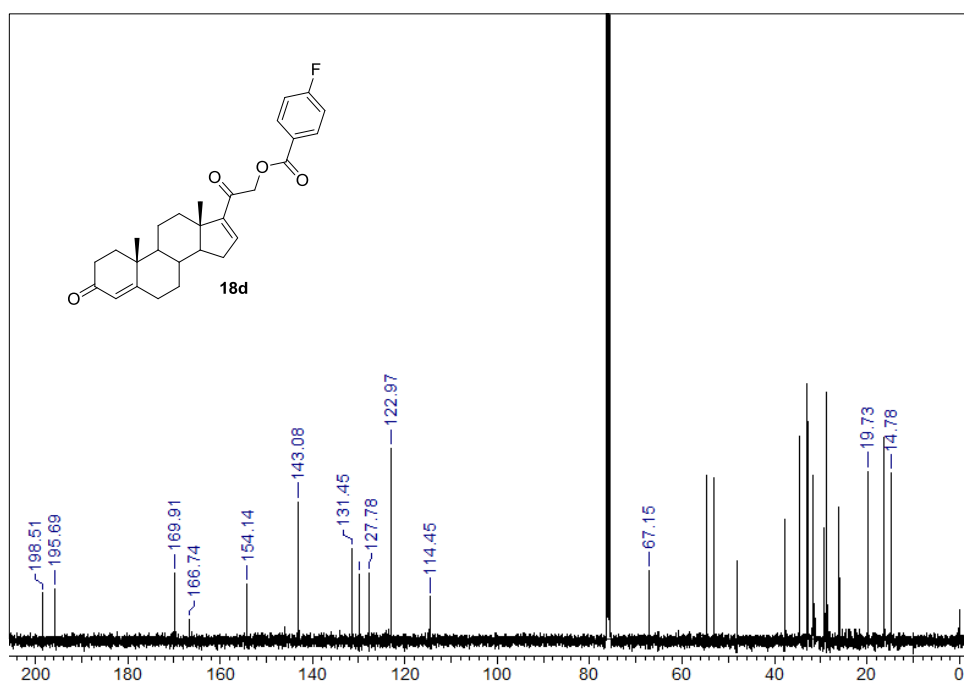
Espectro A.91 RMN de ^1H de la 21-benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (**18c**).



Espectro A.92 RMN de ^{13}C de la 21-benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (**18c**).



Espectro A.93 RMN de ¹H de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (**18d**).



Espectro A.94 RMN de ¹³C de la 21-(*p*-fluoro)benzoiloxipregna-4,16-dien-3,20-diona (**18d**).



Original article

Synthesis and cytotoxic effect on cancer cell lines and macrophages of novel progesterone derivatives having an ester or a carbamate function at C-3 and C-17



Alejandra Chávez-Riveros^{a,*}, Mariana Garrido^a, María Teresa Ramírez Apan^b, Armando Zambrano^a, Mario Díaz^a, Eugene Bratoeff^a

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

^b Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, DF 04510 D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2014

Received in revised form

4 June 2014

Accepted 5 June 2014

Available online 6 June 2014

Keywords:

Cytotoxic effect

Synthesis

Progesterone derivatives

Esters

Carbamates

ABSTRACT

In this study we report the cytotoxic effect on human cancer cells of two series of novel progesterone derivatives; the first containing an aromatic ester (**8a–e**) or a carbamate functions both linked to C-3 (**9a–e**) on the pregn-4,16-diene-6,20-dione skeleton. In the second series, both functional groups (ester and carbamate) are bound to C-17 on the pregn-4,6-diene-3,20-dione scaffold (**13a–e** and **14a–e**). The panel cancer cell lines used in this study were the following: PC-3 (human prostate cancer cell line), MCF-7 (human breast cancer cell line), HCT-15 (human colon cancer cell line) and J774 (noncancerous murine macrophages) for comparison.

The results from this study showed that steroid **14a**, having a carbamate function at C-17, was the most potent against PC-3 cell line (96.6%) while **8c** and **8e** showed much higher cytotoxic activity (100%) for MCF-7 cell line. Finally, compounds **8c** and **14a** displayed selective properties towards tumor cell lines than noncancerous murine macrophages.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The past decade has witnessed a quiet revolution in the field of cancer hormone therapy. Although there have been no spectacular breakthroughs as were seen in the 1940s with the discovery of penicillin and other antibiotics for the treatment of infectious diseases, a wealth of basic knowledge, improved investigation techniques, and a substantial number of new antineoplastic agents have emerged.

Steroids are important physiological and pharmacological regulators of cell growth and survival. There are several examples in the literature that describe the use of natural [1] and synthetic [2] steroids for the treatment of sex hormone-dependent cancer tumors, including breast cancer [3], endometrial cancer [4], cervical cancer [5] and prostate cancer [6]. These hormone-dependent tumor cells can control tumor growth through hormone receptors antagonist whereas in sex hormone-independent cancer [3–6],

some synthetic steroids have been previously described as indicators of apoptosis [7].

The pharmacological studies using synthetic steroids offer an important strategy for tumor control growth and tumor cell apoptosis. In this respect, 16-dehydropregnenolone acetate (**1**, Fig. 1) offers possibilities for the synthesis of a variety of compounds having anticancer activity [8]. The results from these investigations inspired us to synthesize a number of new progesterone (**2**, Fig. 1) derivatives having an ester or a carbamate moiety at C-3 (series 1, Fig. 2) and in the second series (Fig. 3), these groups are bound to C-17 of the progesterone skeleton. In compounds **8b–e** the ester moiety is a *p*-substituted phenyl ring containing electronegative atoms (F, Cl, Br, I, and unsubstituted phenyl ring **8a**). Steroidal derivatives **8a–e** and **9a–e** have two α,β -unsaturated carbonyl function at C-6 and C-20. Compounds **13a–e** and **14a–e** have an $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -conjugated carbonyl group at C-3.

The steroidal derivatives synthesized in this work were tested *in vitro*, against a panel of human cancer cell lines such as PC-3 (prostate), MCF-7 (breast), HCT-15 (colon); and J774 (noncancerous murine cells) for comparison.

In addition, ketoconazole (**3**, Fig. 1), an antimycotic drug that has previously been described as an agent that inhibits cytochrome

* Corresponding author.

E-mail address: alechavezriveros@hotmail.com (A. Chávez-Riveros).

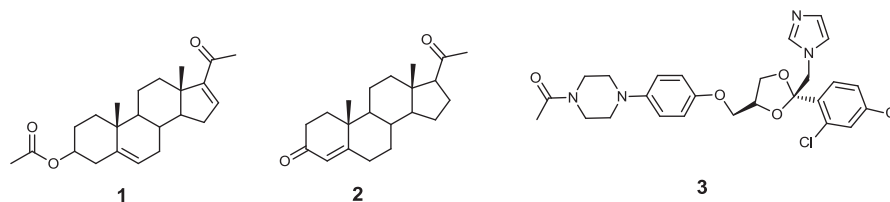
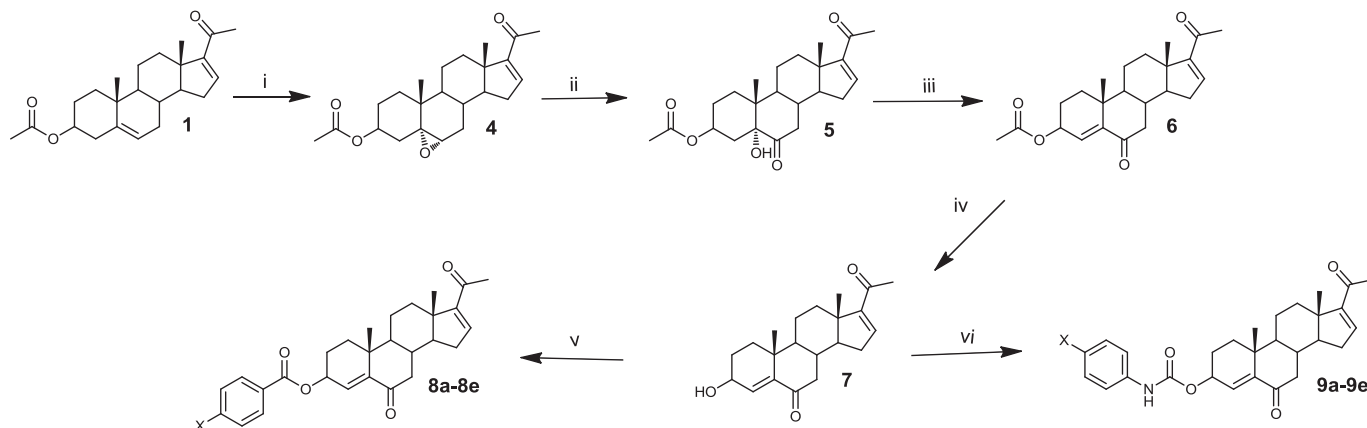


Fig. 1. 16-Dehydropregnenolone (1), progesterone (2) and ketoconazole (3).

Synthesis of compounds 8a–e and 9a–e series 1



X= a, H; b, F; c, Cl; d, Br; e, I

Fig. 2. Reagents and conditions: i) m-CPBA, CHCl_3 ; ii) CrO_3 , H_2O , acetone; iii) SOCl_2 , Py, CH_2Cl_2 ; iv) 2% NaOH, MeOH; v) *p*-x-Ph-COOH, DCC, DMAP, CHCl_3 ; vi) $\text{C}_7\text{H}_5\text{NOX}$, CuI, THF.

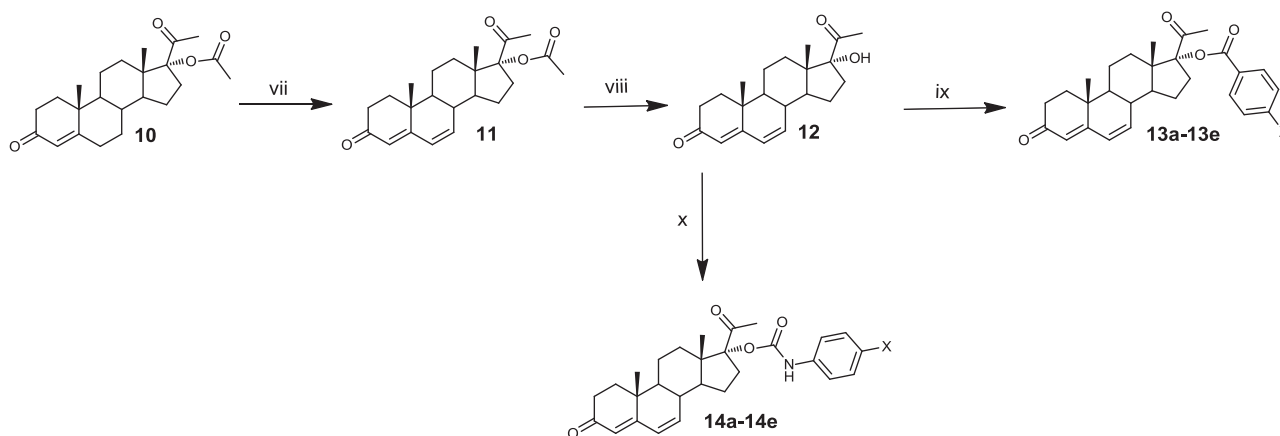
P450 enzymes and which are required for the synthesis of androgens [9], was used as positive control. This compound has also shown cytotoxic activity in prostate cancer cell lines in the *in vitro* studies. Furthermore, it has been previously demonstrated that at low dose, compound 3 can be used for the treatment of prostate cancer which has failed androgen deprivation therapy [10–12].

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The synthetic strategy for the preparation of the steroidal derivatives 8a–e, 9a–e, 13a–e and 14a–e are outlined in Figs. 2 and 3,

Synthesis of compounds 13a–e and 14a–e



X= a, H; b, F; c, Cl; d, Br; e, I

Fig. 3. Reagents and conditions: vii) Chloranil, acetic acid, toluene, reflux 4 h; viii) NaOH 2%, MeOH, reflux 2 h; ix) *p*-x-Ph-COOH, trifluoroacetic anhydride, PTSA, CHCl_3 , 2–24 h; x) isocyanate, $\text{CuBr} \cdot \text{CH}_3\text{SCH}_3$, THF.

respectively. Compounds **8a–e** and **9a–e** were prepared in the following manner: commercially available 16-dehydropregnenolone acetate (**1**) was treated with *m*-chloroperoxybenzoic acid to form the 5 α ,6 α -epoxy compound **4**. The oxidation of **4** with chromic anhydride in acetone–water afforded the 5 α -ketoalcohol **5**. Elimination of the hydroxyl group at C-4 in **5** with thionyl chloride yielded the α,β -unsaturated carbonyl compound (**6**). The acetoxy group in **6** was hydrolyzed with sodium hydroxide in methanol to afford the alcohol **7**. The final compounds **8a–e** were obtained from **7** by using the Steglich esterification method [13]. These esters were obtained with a high yield (75–79%). The synthesis of **9a–e** having a carbamate function at C-3 was carried out with compound **7**, the corresponding phenyl isocyanate and copper bromide in tetrahydrofuran. The desired carbamates **9a–e** were obtained with a yield of 9–32%.

The second series of compounds **13a–e** and **14a–e** was prepared from the commercially available 17 α -acetoxyprogesterone (**10**). Treatment of **10** with chloranil, acetic acid in toluene afforded the $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -unsaturated carbonyl derivative **11**. Compound **11** upon treatment with sodium hydroxide in methanol afforded the alcohol **12**. Steroid **12** was reacted with the corresponding acid using the Steglich procedure for ester formation **13a–e**. On the other hand when **12** was treated with the corresponding phenyl isocyanate (this procedure is described above for the preparation of **9a–e**) to form the desired isocyanate, these compounds (**14a–e**) were obtained with a yield of 50–75%. These derivatives were isolated by column chromatography using as a stationary phase florisil. On the other hand the carbamates **9a–e** were isolated by a silica gel column chromatography with a lower yield. Apparently, the florisil stationary phase purifies much better the carbamate derivatives as compared to silica gel. All intermediates and final compounds are characterized by IR, ^1H and ^{13}C NMR and mass spectrometry.

2.2. Cytotoxic effect

The differences in the cytotoxic activity of compounds **8c** and **8e** having an ester moiety at C-3 for PC-3, MCF-7, and HCT-15 cancer cell lines and their counterparts **13c** and **13e** (ester function at C-17) could be explained on the ground of the higher electrophilic character of compounds **8c** and **8e**. It has been reported that electrophilic centers in α,β -unsaturated ketones react very readily with a variety of nucleophilic amino acids to form a Michael type addition products [14]. Apparently, compounds **7** and **8a–e** having two α,β -unsaturated ketone moieties could react very easily with the nucleophilic part of the cell membrane and form an adduct, thus showing an important cytotoxic effect. There are several nucleophilic amino acids having a free nucleophilic group such as lysine (NH_2), cysteine (SH) and serine (OH) which is not involved in the peptide formation and thus it can react with the electrophilic part of the steroid. As a result of this adduct formation, the steroidal molecule shows a higher cytotoxic effect. This phenomenon explains very well the higher cytotoxic effect of derivatives **8c** and **8e** for PC-3, MCF-7, and HCT-15 cell lines as compared to that of steroids **13c** and **13e**.

The low activity of compounds **9a–e** (carbamate function at C-3) and **14a–e** (carbamate function at C-17) could be explained on the basis of their low solubility. On the other hand, compound **14a** having an unsubstituted phenyl ring showed a potent cytotoxic activity against PC-3 cancer cell line (96.6%) and also exhibited low inhibition of macrophages growth (48.2%). Apparently this compound which lacks a halogen substituent on the phenyl ring (higher solubility) shows certain selectivity for the inhibition of cancerous cells.

From this study, we can infer that compounds having an α,β -unsaturated function (electrophilic center) show high cytotoxic

effect due to their ability to react with the nucleophilic portion of the protein (lysine, cysteine and serine) and thus can form a stable adduct. The compounds of series 1 which contain two α,β -unsaturated carbonyl functions produce higher cytotoxicity as compared to those of series 2 having only one $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -unsaturated carbonyl (Table 1).

3. Experimental

3.1. General

Reagents and solvents were purchased from commercial sources and were used without further purification. Melting points were determined on a Fisher Johns melting point apparatus and are uncorrected. ^1H and ^{13}C NMR were taken on a Varian Gemini 200 and a VRX-300, respectively. Chemical shifts are given in ppm relative to that of Me_4Si ($\delta = 0$) in CDCl_3 . High Resolution Mass Spectra (HRMS) were obtained with a Thermo DFS spectrometer by direct infusion and using FAB^+ ionization mode. IR spectra were recorded on a Perkin–Elmer 200 spectrometer.

3.2. Synthesis of esters and carbamates **8a–e** and **9a–e**

3.2.1. 3 β -Acetoxy-5 α ,6 α -epoxypregn-16-ene-20-one (**4**)

A solution of steroid **1** (1 g, 2.82 mmol) and *m*-chloroperbenzoic acid (1.62 g, 9.4 mmol) in chloroform (50 mL) was stirred at room temperature for 30 min. After this time, a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (84 mL) containing sodium bisulfite (1 g) was added. The reaction mixture was extracted three times with chloroform; the organic phase was washed with water, dried over sodium sulfate and the solvent was removed in vacuum. The crude product was recrystallized from methanol to give **4**. Yield 97% (1.01 g), mp 170–172 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2943, 1734, 1665 and 1588. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.0 (s, 3H, H-21), 2.2 (s, 3H, acetoxy), 2.9 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-6), 4.7 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-3). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.8 (C-18), 16.9 (C-19), 21.3 (C-21), 27.2 (acetoxy), 63.2 (C-6), 65.3 (C-5), 144.1 (C-16), 155.2 (C-17), 170.5 (acetoxy carbonyl), 196.7 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$ 372.2301, found 372.2311.

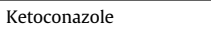
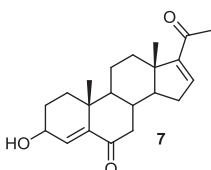
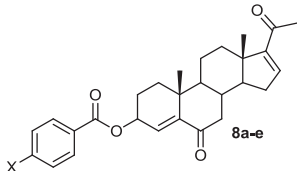
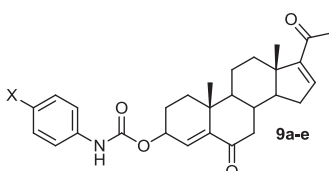
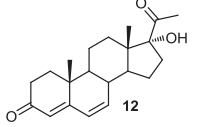
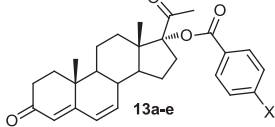
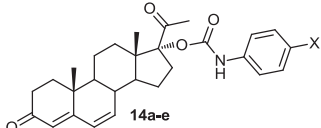
3.2.2. 3 β -Acetoxy-5 α -hydroxypregn-16-ene-6,20-dione (**5**)

To a solution of steroid **4** (1 g, 2.7 mmol) in acetone (50 mL) was added dropwise a solution of chromium trioxide (1.05 g, 10.5 mmol) in water (5 mL) at 0 °C during 10 min. The resulting mixture was allowed to warm up to room temperature and after 30 min the same amount of chromium trioxide was added in the same manner. The mixture was diluted with cold water (150 mL) and the precipitated product was filtered and dried. The product was recrystallized from methanol. Yield 81% (0.848 g), mp 244–245 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3409, 2940, 1730, 1700, 1685 and 1600. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.0 (s, 3H, H-21), 2.2 (s, 3H, acetoxy), 4.8 (m, 1H, H-3), 6.6 (q, 1H, $J = 2$ Hz, H-16). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.8 (C-18), 17.0 (C-19), 22.0 (C-21), 28.0 (acetoxy), 80.0 (C-5), 143.8 (C-16), 155.0 (C-17), 173.0 (acetoxy carbonyl), 197.2 (C-20), 212.8 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_5$ 388.2550, found 388.2542.

3.2.3. 3 β -Acetoxypregn-4,16-diene-6,20-dione (**6**)

To a cold solution of steroid **5** (1 g, 2.57 mmol) in a mixture of pyridine (10 mL) and chloroform (5 mL) was added dropwise thionyl chloride (1 mL) under a nitrogen atmosphere. The resulting solution was stirred at room temperature for 45 min. Iced water (100 mL) was added and it was extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was washed with 10% aqueous hydrochloric acid, 5% aqueous sodium bicarbonate and water. It was dried

Table 1
Inhibitory activity^a on the growth of several cancer cell lines and murine macrophages of series **8a–e**, **9a–e**, **13a–e** and **14a–e**.

Structure	Compound	PC-3	MCF-7	HCT-15	J774
	3	88.48 ± 3.9	95.16 ± 4.8	90.59 ± 1.2	53.95 ± 0.6
	7	70.6 ± 3.3	63.5 ± 3.4	67.7 ± 5.9	98.9 ± 0.2
	8a (X = H)	2.9 ± 0.9	32.7 ± 1.2	48.7 ± 15.1	89.3 ± 0.8
	8b (X = F)	8.3 ± 1.0	20.8 ± 4.5	22.8 ± 7.7	50.0 ± 3.6
	8c (X = Cl)	87.3 ± 11.2	100 ± 2.5	88.2 ± 6.9	38.78 ± 1.5
	8d (X = Br)	51.9 ± 29.3	86.2 ± 13.7	55.9 ± 31.4	60.87 ± 1.2
	8e (X = I)	64.1 ± 28	100 ± 4.3	67.3 ± 4.8	61.15 ± 3.6
	9a (X = H)	4.5 ± 2.0	34.7 ± 6.2	41.4 ± 8.8	73.8 ± 0.2
	9b (X = F)	33.0 ± 5.4	34.6 ± 1.7	60.1 ± 6.8	78.3 ± 2.2
	9c (X = Cl)	63.4 ± 10.9	13.7 ± 5.3	65.3 ± 16.1	92.4 ± 2.1
	9d (X = Br)	26.9 ± 2.4	14.0 ± 2.5	30.0 ± 0.8	80.5 ± 0.6
	9e (X = I)	42.8 ± 1.5	33.1 ± 3.9	43.2 ± 6.4	70.7 ± 1.0
	12	39.6 ± 2.7	27.8 ± 1.9	25.0 ± 4.9	58.5 ± 0.5
	13a (X = H)	42.49 ± 4.7	26.80 ± 2.3	50.82 ± 4.3	100 ± 3.8
	13b (X = F)	30.92 ± 3.5	29.16 ± 9.7	35.59 ± 1.7	100 ± 1.9
	13c (X = Cl)	46.09 ± 6.4	39.76 ± 3.2	39.32 ± 0.6	73.64 ± 1.4
	13d (X = Br)	84.71 ± 8.1	44.44 ± 3.7	53.87 ± 4.2	56.97 ± 1.8
	13e (X = I)	30.8 ± 3.0	22.6 ± 4.7	27.5 ± 3.5	74.3 ± 0.3
	14a (X = H)	96.6 ± 3.0	51.3 ± 9.5	45.3 ± 3.8	48.2 ± 0.7
	14b (X = F)	33.4 ± 8.4	20.0 ± 0.1	NA	43.4 ± 2.5
	14c (X = Cl)	15.8 ± 5.3	11.2 ± 3.4	NA	36.9 ± 3.8
	14d (X = Br)	26.4 ± 4.0	13.1 ± 2.0	NA	32.0 ± 1.7
	14e (X = I)	17.8 ± 2.7	NA ^b	NA	21.7 ± 0.8

The bold numbers represent the highest activities of the compounds.

^a Results are expressed as a percentage of inhibition ± standard error.

^b These compounds were not active.

over sodium sulfate and the solvent was evaporated in vacuum. The crude product was recrystallized from ethyl acetate–hexane. Yield 66% (0.64 g), mp 193–195 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2942, 1735, 1691 and 1635. ¹H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.0 (s, 3H, H-19), 2.1 (s, 3H, H-21), 2.3 (s, 3H, acetoxy), 5.1 (m, 1H, H-3), 6.0 (q, 1H, $J = 2$ Hz, H-4), 6.7 (q, 1H, $J = 2$ Hz, H-16). ¹³C NMR (CDCl_3) δ : 15.7 (C-18), 19.6 (C-19), 22.0 (C-21), 29.5 (acetoxy), 70.1 (C-3), 129.0 (C-4), 143.7 (C-16), 147.2 (C-5), 154.6 (C-17), 170.6 (acetoxy carbonyl), 195.0 (C-20), 201.7 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_4$ 370.2144, found 370.2551.

3.2.4. 3 β -Hydroxypregn-4,16-diene-6,20-dione (**7**)

To a solution of steroid **6** (1 g, 2.7 mmol) in methanol (150 mL) was added an aqueous sodium hydroxide solution (2%, 10 mL) and stirred at room temperature for 20 min. Upon termination of the hydrolysis, the methanol was evaporated and water (200 mL) was added. The precipitated product was filtered and recrystallized from methanol. Yield 60% (0.53 g), mp 168–170 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3430, 2941, 1688, 1663 and 1630. ¹H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.0 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 4.3 (t, 1H, $J = 2$ Hz, H-3), 6.2

(q, 1H, $J = 2$, H-4), 6.7 (q, 1H, $J = 2$, H-16). ¹³C NMR (CDCl_3) δ : 15.7 (C-18), 19.8 (C-19), 27.1 (C-21), 67.1 (C-3), 133.2 (C-4), 143.9 (C-16), 146.5 (C-5), 154.8 (C-17), 196.6 (C-20), 202.4 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_3$ 328.2038, found 328.2032.

3.2.5. General procedure for the synthesis of esters **8a–e**

To solution of steroid **7** (1 mmol), DCC (3 mmol) and DMAP (2 mmol) in chloroform (6 mL) was added the corresponding acid (5 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 2 h. Ethyl acetate (5 mL) was added and the precipitated dicyclohexyl urea was filtered. The organic phase was washed three times with 10% aqueous hydrochloric acid, 5% aqueous sodium bicarbonate, water and was dried over anhydrous sodium sulfate. The crude ester was recrystallized from methanol.

3.2.6. 3 β -Benzoyloxypregn-4,16-diene-6,20-dione (**8a**)

Yield 77% (0.335 g), mp 168–170 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3072, 2944, 1718, 1686 and 1662. ¹H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.3 (s, 3H, H-21), 5.5 (t, 1H, $J = 2$ Hz, H-3), 6.2 (q, 1H, $J = 2$ Hz,

H-4), 6.7 (m, 1H, H-16), 7.4 (m, 1H, Ar-H), 7.5 (m, 1H, Ar-H) and 8.0 (m, 2H, Ar-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.7 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 70.0 (C-3), 128.3 (Ar-C), 129.1 (C-4), 129.7 (Ar-C), 130.0 (Ar-C), 133.0 (Ar-C), 143.7 (C-16), 147.0 (C-5), 154.8 (C-17), 166.1 (ester carbonyl), 196.5 (C-20), 201.5 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_4$ 432.2301, found 432.2298.

3.2.7. 3β -p-Fluorobenzoyloxy-pregn-4,16-diene-6,20-dione (**8b**)

Yield 75% (0.34 g), mp 129–131 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3086, 2944, 1720 and 1691. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.0 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.5 (t, 1H, $J = 2$ Hz, H-3), 6.2 (q, 1H, $J = 2$ Hz, H-4), 6.7 (t, 1H, $J = 2$ Hz, H-16), 7.1 (t, 1H, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 8.1 (m, 1H, Ar-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.8 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 70.0 (C-3), 115.4 (Ar-C), 126.3 (Ar-C), 128.9 (C-4), 132.2 (Ar-C), 143.7 (C-16), 148.1 (C-5), 154.9 (C-17), 165.2 (ester carbonyl), 167.1 (Ar-C), 196.5 (C-20), 201.8 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{FO}_4$ 450.2206, found 450.2209.

3.2.8. 3β -p-Chlorobenzoyloxy-pregn-4,16-diene-6,20-dione (**8c**)

Yield 76% (0.354 g), mp 238–240 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3077, 2940, 1719, 1692 and 1660. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.8 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.5 (m, 1H, H-3), 6.2 (s, 1H, H-4), 6.7 (m, 1H, H-16), 7.4 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.9 (m, 2H, Ar-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.8 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 70.5 (C-3), 128.5 (Ar-C), 128.7 (Ar-C), 131.1 (Ar-C), 139.5 (Ar-C), 128.9 (C-4), 143.7 (C-16), 148.0 (C-5), 154.9 (C-17), 165.3 (ester carbonyl), 196.5 (C-20), 201.8 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClO}_4$ 466.1911, found 466.1903.

3.2.9. 3β -p-Bromobenzoyloxy-pregn-4,16-diene-6,20-dione (**8d**)

Yield 79% (0.4 g), mp 235–237 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3074, 2940, 1719, 1691 and 1660. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.6 (m, 1H, H-3), 6.2 (s, 1H, H-4), 6.7 (m, 1H, H-16), 7.6 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, Ar-H), 7.9 (m, 2H, Ar-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.8 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 70.1 (C-3), 128.2 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 128.9 (C-4), 131.2 (Ar-C), 131.7 (Ar-C), 143.7 (C-16), 148.2 (C-5), 154.8 (C-17), 165.6 (ester carbonyl), 196.5 (C-20), 201.5 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{BrO}_4$ 510.1406, found 510.1399.

3.2.10. 3β -p-Iodobenzoyloxy-pregn-4,16-diene-6,20-dione (**8e**)

Yield 76% (0.424 g), mp 229–231 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3097, 2946, 1709, 1687 and 1657. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.6 (m, 1H, H-3), 6.2 (s, 1H, H-4), 6.7 (m, 1H, H-16), 7.7 (s, 2H, Ar-H), 7.7 (m, 2H, Ar-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.7 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 70.0 (C-3), 100.9 (Ar-C), 128.7 (Ar-C), 129.5 (C-4), 131.1 (Ar-C), 137.6 (Ar-C), 143.7 (C-16), 147.9 (C-5), 154.8 (C-17), 165.6 (ester carbonyl), 196.5 (C-20), 201.5 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{IO}_4$ 558.1267, found 558.1258.

3.2.11. General procedure for the synthesis of carbamates **9a–e**

To a solution of compound **7** (1 mmol) and CuI (0.1 mmol) in dry THF (4 mL) under nitrogen atmosphere was added the corresponding isocyanate (3 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. Chloroform was added and the catalyst CuI was filtered. The organic layer was washed with 10% aqueous hydrochloric acid, 5% of aqueous sodium bicarbonate, water and was dried over anhydrous sodium sulfate. Purification by silica gel column chromatography using a mixture of hexane and ethyl acetate (9:1) afforded the **9a–e** carbamate derivatives.

3.2.12. 3β -Phenylcarbamoyloxy-pregn-4,16-diene-6,20-dione (**9a**)

Yield 32% (0.143 g), mp 252–254 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3331, 1721, 1687 and 1662. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.3 (m, 1H, H-3), 6.1 (s, 1H, H-4), 6.7 (s, 1H, H-16), 6.9 (s, 1H, N-H), 7.0 (m, 1H, Ar-H), 7.3 (m, 2H, Ar-H), 7.3 (m, 2H, Ar-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.7 (C-18), 19.5 (C-19), 27.1 (C-21), 70.0

(C-3), 118.7 (Ar-C), 129.0 (Ar-C), 129.1 (C-4), 129.3 (Ar-C), 137.6 (Ar-C), 143.8 (C-16), 147.9 (C-5), 152.9 (carbamate carbonyl), 154.8 (C-17), 196.6 (C-20) and 201.9 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{NO}_4$ 447.2410, found 447.2415.

3.2.13. 3β -p-Fluorophenylcarbamoyloxy-pregn-4,16-diene-6,20-dione (**9b**)

Yield 29% (0.135 g), mp 224–227 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3335, 1724, 1685 and 1662. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.0 (s, 3H, H-19), 2.1 (s, 3H, H-21), 5.2 (m, 1H, H-3), 6.0 (s, 1H, H-4), 6.9 (s, 1H, H-16), 7.1 (m, 2H, Ar-H), 7.4 (m, 2H, Ar-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.6 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 74.3 (C-3), 120.3 (Ar-C), 120.5 (Ar-C), 128.5 (C-4), 133.6 (Ar-C), 141.1 (C-16), 150.3 (C-5), 152.8 (carbamate carbonyl), 156.7 (C-17), 163.7 (Ar-C), 201.3 (C-20) and 206.0 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{FNO}_4$ 465.2315, found 465.2306.

3.2.14. 3β -p-Chlorophenylcarbamoyloxy-pregn-4,16-diene-6,20-dione (**9c**)

Yield 23% (0.11 g), mp 221–223 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3365, 1726, 1683 and 1662. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.0 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.3 (m, 1H, H-3), 6.2 (s, 1H, H-4), 6.7 (s, 1H, H-16), 6.8 (s, 1H, N-H), 7.2 (m, 2H, Ar-H), 7.3 (m, 2H, Ar-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.6 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 70.2 (C-3), 119.9 (Ar-C), 128.9 (C-4), 129.0 (Ar-C), 135.0 (Ar-C), 136.4 (Ar-C), 143.8 (C-16), 148.0 (C-5), 152.9 (carbamate carbonyl), 154.9 (C-17), 196.6 (C-20) and 201.8 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{ClNO}_4$ 481.2020, found 481.2030.

3.2.15. 3β -p-Bromophenylcarbamoyloxy-pregn-4,16-diene-6,20-dione (**9d**)

Yield 9% (0.047 g), mp 201–203 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3294, 1727, 1692 and 1663. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.2 (s, 3H, H-19), 2.1 (s, 3H, H-21), 5.3 (m, 1H, H-3), 5.9 (s, 1H, H-4), 6.0 (s, 1H, H-16), 7.4 (m, 2H, Ar-H), 7.5 (m, 2H, Ar-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.6 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 75.31 (C-3), 120.0 (Ar-C), 121.0 (Ar-C), 127.0 (C-4), 133.6 (Ar-C), 139.2 (Ar-C), 144.1 (C-16), 152.7 (C-5), 156.7 (carbamate carbonyl), 153.2 (C-17), 205.9 (C-20) and 212.6 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{BrNO}_4$ 525.1515, found 525.1507.

3.2.16. 3β -p-Iodobenzoyloxy-pregn-4,16-diene-6,20-dione (**9e**)

Yield 9% (0.051 g), mp 197–199 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3327, 1726, 1695 and 1663. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.9 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.3 (m, 1H, H-3), 5.7 (s, 1H, H-4), 6.1 (s, 1H, H-16), 7.3 (m, 2H, Ar-H), 7.5 (m, 2H, Ar-H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.7 (C-18), 19.6 (C-19), 27.1 (C-21), 72.1 (C-3), 119.5 (Ar-C), 128.1 (C-4), 129.1 (Ar-C), 134.5 (Ar-C), 139.3 (Ar-C), 144.2 (C-16), 148.6 (C-5), 152.1 (carbamate carbonyl), 154.0 (C-17), 196.2 (C-20) and 202.0 (C-6). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{INO}_4$ 573.1376, found 573.1384.

3.3. Synthesis of esters and carbamates **13a–e** and **14a–e**

3.3.1. 17α -Acetoxypregn-4,5-dien-3,20-dione (**11**)

Compound **10** (1 g, 2.68 mmol) and chloranil (0.7 g, 2.8 mmol) were dissolved in a mixture of toluene (2 mL) and glacial acetic acid (8 mL) and was allowed to reflux for 4 h. To the reaction was added cold water (10 mL) and the precipitated tetrachlorohydroquinone was filtered. The compound was extracted with ethyl acetate and the organic layer was washed with an aqueous solution of sodium hydroxide (11%) and distilled water. The organic phase was dried over sodium sulfate and evaporated under reduced pressure. The compound was recrystallized from ethyl acetate. Yield 70% (0.696 g), mp 224–226 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 2978, 1733, 1718, 1652 and 1620. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.7 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.0 (s, 3H, acetoxy), 2.1 (s, 3H, H-21), 5.7 (s, 1H, H-4), 6.1 (dd, 1H, $J = 10$

and 1.2 Hz, H-6) and 6.1 (dd, 1H, $J = 9.6$ and 2 Hz, H-7). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.3 (C-18), 16.3 (C-19), 26.4 (C-21), 123.9 (C-4), 128.3 (C-6), 140.0 (C-7), 163.1 (C-5), 170.6 (acetoxy carbonyl), 199.3 (C-3) and 203.8 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_4$ 370.2144, found 370.2138.

3.3.2. 17 α -Hidroxyypregn-4,5-dien-3,20-dione (**12**)

Compound **11** (1 g, 2.703 mmol) was dissolved in methanol (50 mL) and an aqueous solution of sodium hydroxide (2%, 50 mL) was added. The mixture was heated under reflux for 2 h, the excess of methanol was evaporated and the compound was precipitated with water and filtered. The desired product was recrystallized from methanol. Yield 62% (0.55 g), mp 254–256 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3012, 3026, 2945, 1704 and 1644. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 4.9 (s, 1H, H-17), 5.6 (s, 1H, H-4) and 6.1 (s, 2H, H-6 y H-7). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 15.2 (C-18), 16.2 (C-19), 27.8 (C-21), 89.5 (C-17), 123.7 (C-4), 128.1 (C-6), 140.5 (C-7), 163.4 (C-5), 199.4 (C-3) and 211.2 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_3$ 328.2038, found 328.2047.

3.3.3. General procedure for the synthesis of esters **13a–e**

To a solution of the corresponding acid (2.1 mmol) and PTSA (0.33 mmol) in chloroform was added trifluoroacetic anhydride (8.15 mmol) and the mixture was stirred for 3 h. After this time, the compound **12** (1 mmol) was added and stirred until the reaction was completed. Chloroform was added (3 mL) and subsequently was washed with a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate, the organic phase was separated and dried over sodium sulfate. The solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by basic aluminum column chromatography using a mixture of hexane and ethyl acetate (8:2) gave the series **13a–e**.

3.3.4. 17 α -Benzoiloxypregn-4,6-dien-3,20-dione (**13a**)

Yield 34% (0.146 g), mp 230–231 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3054, 3025, 2946, 1713 and 1658. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.1 (s, 3H, H-21), 5.7 (s, 1H, H-4), 6.1 (s, 2H, H-6 y H-7), 7.4 (t, 2H, $J = 7.8$ and 1.6 Hz, Ar–H), 7.6 (t, 1H, $J = 7.4$ and 1.44 Hz, Ar–H) and 8.0 (d, 2H, $J = 8.4$ and 1.2 Hz, Ar–H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.4 (C-18), 16.4 (C-19), 26.4 (C-21), 124.0 (C-4), 128.4 (C-6), 128.6 (Ar–C), 129.7 (Ar–C), 129.8 (Ar–C), 133.6 (Ar–C), 140.1 (C-7), 163.1 (C-5), 165.1 (C-17), 199.4 (C-3) and 203.7 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_4$ 432.2301, found 432.2307.

3.3.5. 17 α -p-Fluorobenzoiloxypregn-4,6-dien-3,20-dione (**13b**)

Yield 33% (0.148 g), mp 248–251 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3080, 2940, 1718 and 1660. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.7 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.0 (s, 3H, H-21), 5.7 (s, 1H, H-4), 6.1 (d, 1H, $3J = 8.8$ Hz, H-6), 6.1 (t, 1H, $J = 8.8$ and 2.4 Hz, H-7), 7.1 (m, 2H, Ar–H), 8.0 (m, 2H, Ar–H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.9 (C-18), 16.8 (C-19), 26.9 (C-21), 116.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.9$ Hz, C–F, Ar–C), 124.2 (C-4), 128.5 (C-6), 132.4 (d, $J_{\text{C-F}} = 9.1$ Hz, C–F, Ar–C), 140.2 (C-7), 163.2 (C-5), 165.1 (C-17), 162.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 253.3$ Hz, C–F, Ar–C), 199.4 (C-3) and 203.7 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{FO}_4$ 450.2206, found 450.2219.

3.3.6. 17 α -p-Chlorobenzoiloxypregn-4,6-dien-3,20-dione (**13c**)

Yield 28% (0.130 g), mp 216–218 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3078, 3004, 2970, 1717 and 1677. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.1 (s, 3H, H-21), 5.7 (s, 1H, H-4), 6.1 (m, 2H, H-6 y H-7), 7.4 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar–H), 7.9 (d, 2H, $J = 8.4$, Ar–H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.5 (C-18), 16.4 (C-19), 26.5 (C-21), 124.2 (C-4), 128.5 (C-6), 129.1 (Ar–C), 131.0 (Ar–C), 139.7 (C-7), 140.2 (C-5), 165.1 (C-17), 199.0 (C-3) and 201.9 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClO}_4$ 466.1911, found 466.1904.

3.3.7. 17 α -p-Bromobenzoiloxypregn-4,6-dien-3,20-dione (**13d**)

Yield 22.5% (0.112 g), mp 196–199 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3061, 2947, 1780 and 1663. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.1 (s, 3H, H-21), 5.7 (s, 1H, H-4), 6.1 (m, 2H, H-6 y H-7), 7.6 (d, 2H, $J = 8.2$ and 2.2 Hz, Ar–H), 7.8 (d, 2H, $J = 8.8$ and 2.1 Hz, Ar–H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.5 (C-18), 16.4 (C-19), 26.5 (C-21), 124.2 (C-4), 128.8 (C-6), 129.1 (Ar–C), 131.1 (Ar–C), 132.1 (Ar–C), 139.7 (C-7), 139.8 (Ar–C) 157.6 (C-5), 165.9 (C-17), 197.2 (C-3) and 213.7 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{BrO}_4$ 510.1406, found 510.1416.

3.3.8. 17 α -p-Iodobenzoiloxypregn-4,6-dien-3,20-dione (**13e**)

Yield 20% (0.11 g), mp 267–269 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3060, 2940, 1716 and 1665. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.8 (s, 3H, H-18), 1.2 (s, 3H, H-19), 2.1 (s, 3H, H-21), 5.8 (s, 1H, H-4), 6.1 (m, 2H, H-6 y H-7), 7.5 (m, 2H, Ar–H), 8.1 (m, 2H, Ar–H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.9 (C-18), 17.4 (C-19), 26.3 (C-21), 97.0 (C-17), 97.9 (Ar–C), 123.7 (C-4), 128.1 (C-6), 128.6 (Ar–C), 129.6 (Ar–C), 135.5 (Ar–C), 140.5 (C-7), 157.5 (C-5), 199.3 (C-3) and 208.8 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{IO}_4$ 558.1267, found 558.1258.

3.3.9. General procedure for the synthesis of carbamates **14a–e**

Compound **12** (1 mmol), copper bromide-dimethyl sulfide complex (3 mmol) and the corresponding isocyanate (6 mmol) were dissolved in anhydrous THF (3 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere for 48 h at room temperature. Upon termination of the reaction, chloroform (5 mL) was added and the complex was filtered. The organic layer was washed with water and dried over sodium sulfate. The solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by florisil column chromatography using a mixture of hexane and ethyl acetate gave the desired carbamates **14a–e**.

3.3.10. 17 α -Phenylcarbamoiloxypregn-4,6-dien-3,20-dione (**14a**)

Yield 65% (0.290 g), mp 224–226 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3264, 2944, 1728 and 1660. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.7 (s, 3H, H-18), 1.2 (s, 3H, H-19), 2.2 (s, 3H, H-21), 5.8 (s, 1H, H-4), 6.0 (dd, 1H, $J = 13.2$ and 1.2 Hz, H-6), 6.2 (m, 1H, H-7), 7.1 (dd, 1H, $J = 12.8$ and 3.2 Hz, Ar–H), 7.3 (d, 1H, $J = 17.2$ Hz, Ar–H), 7.4 (d, 1H, $J = 10$ Hz, Ar–H), 7.5 (d, 1H, $J = 10$ Hz, Ar–H), 7.6 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, Ar–H), 10.6 (s, 1H, N–H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.6 (C-18), 15.9 (C-19), 26.1 (C-21), 89.5 (C-17), 123.6 (Ar–C), 123.9 (C-4), 127.8 (Ar–C), 128.1 (C-6), 128.7 (Ar–C), 131.4 (C-7), 139.3 (Ar–C), 154.3 (carbamate carbonyl), 162.7 (C-5), 199.1 (C-3) and 202.9 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{NO}_4$ 447.2410, found 447.2405.

3.3.11. 17 α -p-Fluorophenylcarbamoiloxypregn-4,6-dien-3,20-dione (**14b**)

Yield 55% (0.256 g), mp 220–221 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3264, 2944, 1728 and 1661. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.7 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.3 (s, 3H, H-21), 5.9 (s, 1H, H-4), 6.0 (dd, 1H, $J = 13.2$ and 1.2 Hz, H-6), 6.2 (dd, 1H, $J = 9.6$ and 3.0 Hz, H-7), 7.3 (d, 1H, $J = 17.2$ Hz, Ar–H), 7.4 (d, 1H, $J = 10$ Hz, Ar–H), 7.5 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, Ar–H), 7.6 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, Ar–H), 10.6 (s, 1H, N–H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.6 (C-18), 15.9 (C-19), 26.1 (C-21), 89.5 (C-17), 124.0 (C-4), 128.9 (C-6), 129.3 (Ar–C), 129.7 (Ar–C), 130.4 (Ar–C), 134.5 (C-7), 135.9 (Ar–C), 154.5 (carbamate carbonyl), 162.4 (C-5), 199.0 (C-3) and 202.5 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{FNO}_4$ 466.2394, found 466.2402.

3.3.12. 17 α -p-Chlorophenylcarbamoiloxypregn-4,6-dien-3,20-dione (**14c**)

Yield 75% (0.361 g), mp 170–172 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3264, 2944, 1728 and 1661. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.6 (s, 3H, H-18), 1.0 (s, 3H, H-19), 2.3 (s, 3H, H-21), 5.7 (s, 1H, H-4), 5.9 (dd, 1H, $J = 13.2$ and 1.2 Hz, H-6), 6.2 (dd, 1H, $J = 10$ and 3.2 Hz, H-7), 7.1 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz, Ar–H), 7.2 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, Ar–H), 7.3 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, Ar–H), 7.4 (d, 1H,

$J = 8.8$ Hz, Ar–H), 10.5 (s, 1H, N–H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.9 (C-18), 16.3 (C-19), 26.1 (C-21), 99.1 (C-17), 124.2 (C-4), 128.6 (C-6), 129.1 (Ar–C), 129.5 (Ar–C), 130.1 (Ar–C), 134.5 (C-7), 135.8 (Ar–C), 154.5 (carbamate carbonyl), 162.7 (C-5), 199.4 (C-3) and 202.9 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{ClNO}_4$ 482.2098, found 482.2104.

3.3.13. 17 α -p-Bromophenylcarbamoyloxy-pregn-4,6-dien-3,20-dione (**14d**)

Yield 58% (0.305 g), mp 206–208 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3287, 2949, 1721 and 1659. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.6 (s, 3H, H-18), 1.0 (s, 3H, H-19), 2.1 (s, 3H, H-21), 5.7 (s, 1H, H-4), 5.9 (dd, 1H, $J = 13.2$ and 1.2 Hz, H-6), 6.2 (dd, 1H, $J = 9.6$ and 3.1 Hz, H-7), 7.1 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, Ar–H), 7.3 (d, 1H, $J = 10$ Hz, Ar–H), 7.4 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz, Ar–H), 7.6 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, Ar–H), 10.5 (s, 1H, N–H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.0 (C-18), 16.5 (C-19), 26.5 (C-21), 90.3 (C-17), 124.0 (C-4), 128.7 (C-6), 129.0 (Ar–C), 130.1 (Ar–C), 130.7 (Ar–C), 135.3 (C-7), 136.1 (Ar–C), 154.7 (carbamate carbonyl), 162.9 (C-5), 199.5 (C-3) and 202.9 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{BrNO}_4$ 526.1593, found 526.1584.

3.3.14. 17 α -p-Iodophenylcarbamoyloxy-pregn-4,6-dien-3,20-dione (**14e**)

Yield 50% (0.286 g), mp 217–219 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3287, 2949, 1726 and 1659. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.6 (s, 3H, H-18), 1.0 (s, 3H, H-19), 2.1 (s, 3H, H-21), 5.7 (s, 1H, H-4), 5.9 (dd, 1H, $J = 10$ and 1.2 Hz, H-6), 6.2 (dd, 1H, $J = 2.4$ and 9.6 Hz, H-7), 6.9 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ar–H), 7.3 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, Ar–H), 7.3 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, Ar–H), 7.6 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, Ar–H), 10.5 (s, 1H, N–H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 13.8 (C-18), 16.0 (C-19), 26.2 (C-21), 90.0 (C-17), 124.1 (C-4), 128.5 (C-6), 129.3 (Ar–C), 129.8 (Ar–C), 130.0 (Ar–C), 135.2 (C-7), 135.9 (Ar–C), 154.6 (carbamate carbonyl), 162.9 (C-5), 199.5 (C-3) and 202.9 (C-20). HRMS cal for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{INO}_4$ 573.1376, found 573.1371.

3.4. Cytotoxicity assay

3.4.1. Biological material

The panel cells used in this study were the following: PC-3 (human prostate cancer cell line), MCF-7 (human breast cancer cell line), HCT-15 (human colon cancer cell line) and J774 (murine macrophages) and were supplied by the National Cancer Institute (NCI, USA). The ketoconazol used as a reference in this experiment was purchased from Sigma Life Science.

3.4.2. Methodology

The compounds were screened *in vitro* against four cell lines: PC-3 (human prostate cancer cell line), MCF-7 (human breast cancer cell line), HCT-15 (human colon cancer cell line) and J774 (murine macrophages). The cancer cell lines were supplied by NCI, USA [16] and murine macrophages were purchased from ATCC. The human tumor cytotoxicity was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth. The cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin G sodium, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin sulfate, and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B (Gibco) and 1% of nonessential amino acids (Gibco). They were maintained at 37° in humidified atmosphere with 5% CO_2 . The viability of the cells used in the experiments exceeds 95% as determined with trypan blue.

The cells were removed from the tissue culture flask and diluted with fresh media. Of this cell suspension, 100 μL containing 5000 or 10,000 cells per well (depending on the duplication time), were pipetted into microtiter plates (Costar) and the material was incubated at 37 °C for 24 h in a 5% CO_2 atmosphere. In addition, another plate was prepared with culture medium only and it was incubated for 1 h. Subsequently, 100 μL of a solution of the test

compounds obtained by diluting the stocks were added to each well.

The cultures were exposed for 48 h to the compounds at concentration of 50 μM ; after the incubation period, the cells were fixed to the plastic substrate by the addition of 50 μL of cold 50% aqueous trichloroacetic acid. The plates were incubated at 4 °C for 1 h, washed with tap H_2O and air-dried. The trichloroacetic-acid-fixed cells were stained by the addition of 0.4% SRB. Free SRB solution was removed by washing with 1% aqueous acetic acid. The plates were air dried, and the bound dye was solubilized by the addition of 10 mM of unbuffered tris base (100 μL). The plates were placed on a vortex for 5 min, and the absorption was determinate at 515 nm using an ELISA plates reader (Bio-Tex Instruments). Percentage cell growth inhibition was calculated according to the following expression [15]:

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

4. Conclusions

In this paper, we describe the synthesis and the cytotoxic activity of twenty two novel pregnenolone derivatives. The cytotoxic effect of **7**, **8a–e**, **9a–e**, **12**, **13a–e** and **14a–e** was evaluated on three cancer cell lines: PC-3 (human prostate), MCF-7 (human breast), HCT-15 (human colon) and J774 (noncancerous murine cells). The ester derivative belonging to the α, β -unsaturated carbonyl system **8a–e** showed considerably higher cytotoxic activity (higher electrophilic character) as compared to compounds **13a–e** having an $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -unsaturated carbonyl system.

In general, all carbamates derivatives showed a low cytotoxic activity for all cancer cell lines studied; their low cytotoxic activity could be attributable to their low solubility. On the other hand, the carbamate derivative **14a** having an unsaturated phenyl ring showed a very high cytotoxic activity (96.6%) for prostate cancer cell line (PC-3) and lower cytotoxicity in noncancerous cells (J774). Apparently, this compound, lacking a halogen substituent on the phenyl ring, has a higher solubility and could form readily a complex with the reactive site of the cell.

The most active steroid was **8c** showing the highest cytotoxicity against MCF-7 and PC-3 cell lines; this compound exhibited a low cytotoxic activity against murine macrophages cell lines.

Acknowledgment

The authors thank DGAPA, project IN211312 (UNAM) and CONACYT, and project CB 2011/165049 for the financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.008>.

References

- [1] S.R. Samuel, J.T. Isaacs, A history of prostate cancer treatment, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 389–396.
- [2] E. Frank, G. Schneider, Synthesis of sex hormone-derived modified steroids possessing antiproliferative activity, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 137 (2013) 301–315.
- [3] S.T. Pearce, V.C. Jordan, The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 50 (2004) 3–22.
- [4] C.C. Schneider, R.K. Cibb, D.D. Taylor, T. Wan, C. Gerçel-Taylor, Inhibition of endometrial cancer cell lines by mifepristone (RU840), *J. Soc. Gynecol. Investig.* 5 (1998) 334–338.

- [5] R. Minorics, N. Bózsity, J. Wolfling, E. Mernyák, G. Schneider, Á. Márki, G. Falkay, I. Ocsosvzkc, I. Zupkó, Antiproliferative effect of normal and 13-epi-d-hormoestrone and their 3-methyl ethers on human reproductive cancer cell lines, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 132 (2012) 168–175.
- [6] T. Nishiyama, Androgen deprivation therapy in combination with radiotherapy for high-risk clinically localized prostate cancer, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 129 (2012) 179–190.
- [7] D.Q. Li, Z.B. Wang, J. Zhao, Y. Wang, K. Hu, Effects of mifepristone on proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 in vitro, *World J. Gastroenterol.* 10 (2004) 2628–2631.
- [8] M.I. Choudhary, M.S. Alam, Atta-ur -Rahman, S. Yousuf, Y.-C. Wu, A.-S. Lin, F. Shaheen, Pregnenolone derivatives as potential anticancer agents, *Steroids* 76 (2011) 1554–1559.
- [9] S. Wilkinson, G. Chodak, An evaluation of intermediate-dose ketoconazole in hormone refractory prostate cancer, *Eur. Urol.* 45 (2004) 581–584.
- [10] L.S.M. Ngo, A. Yeo, A.S.C. Wong, M.H. Tay, Efficacy of low-dose ketoconazole in hormone refractory prostate cancer. Patients at the National Cancer Centre and the Cancer Institute, Singapore, *Ann. Acad. Med. Singap.* 36 (2007) 811–814.
- [11] A. Pont, J.R. Graybill, P.C. Craven, J.N. Galgiani, W.E. Dismukes, R.E. Reitz, D.A. Stevens, High-dose ketoconazole therapy and adrenal and testicular function in human, *Arch. Intern. Med.* 144 (1984) 2150–2153.
- [12] T. Eichenberger, J. Trachenbeig, P. Chronis, Synergistic effect of ketoconazole and anti-neoplastic agents in hormone-independent prostatic cancer cells, *Clin. Invest. Med.* 12 (1989) 363–366.
- [13] B. Neises, W. Steglich, Simple method for the esterification of carboxylic acids, *Angew. Chem. Int. Ed.* 17 (1978) 522–524.
- [14] V. Perez-Ornelaz, M. Cabeza, E. Bratoeff, I. Heuze, M. Sánchez, E. Ramirez, E. Naranjo-Rodríguez, New 5 α -reductase inhibitors: In vitro and in vivo effects, *Steroids* 70 (2005) 217–224.
- [15] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paul, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boy, Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *J. Natl. Cancer Inst.* 38 (1991) 757–766.

Full Paper

Synthesis and Identification of Pregnenolone Derivatives as Inhibitors of Isozymes of 5 α -Reductase

Alejandra Chávez-Riveros¹, Eugene Bratoeff¹, Yvonne Heuze², Juan Soriano³, Isabel Moreno², Araceli Sánchez-Márquez², and Marisa Cabeza²

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Distrito Federal, México, D. F., Mexico

² Departamento de Sistemas Biológicos y de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Ciudad de México, México, D. F., Mexico

³ Departamento de Patología, Hospital General de México, México, D. F., Mexico

Hyperplasia of the prostate gland and prostate cancer have been associated with high levels of serum 5 α -dihydrotestosterone. This steroid is formed from testosterone by the activity of the enzyme 5 α -reductase (5 α -R) present in the prostate. Thus, inhibition of this enzyme could be a goal for therapies to treat these diseases. This study reports the synthesis and effects of five different 21-esters of pregnenolone derivatives as inhibitors of 5 α -R types 1 and 2. The activity of these steroidal compounds was determined using *in vivo* and *in vitro* experiments. The results indicate that of the five steroids studied, the 21(*p*-fluoro)benzoyloxypregna-4,16-diene-3,6,20-trione derivative, whose structure has not yet been reported, has the best molecular conformation to inhibit the *in vitro* activity of both types of 5 α -R. In addition, this steroid also displayed activity *in vivo*. Apparently, its pharmacological effect was increased by the presence of a keto group at C-6, because this group decreased the possibility that the steroid would be metabolized by hepatic enzymes. In addition, the double bond present at C-4 of this compound also enhanced its inhibitory activity on 5 α -R, and the C-21 ester moiety increased its lipophilicity. Therefore, its solubility in the cell membrane and its pharmacological activity were both increased.

Keywords: 5 α -Reductase / Hamster prostate gland / Hamster seminal vesicles / (*p*-Fluoro)benzoyloxy 21-esters of pregnenolone derivatives / Steroidal esters

Received: July 1, 2015; Revised: August 19, 2015; Accepted: August 21, 2015

DOI 10.1002/ardp.201500220



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Introduction

The 5 α -reductase enzyme (EC 1.3.99.5) converts Δ^4 -3-ketosteroids to 5 α -3-ketosteroids in androgen-dependent tissues. The activity of this enzyme in androgen-dependent tissues has

long been known; the enzyme converts testosterone (T) to 5 α -dihydrotestosterone (DHT) in the prostate gland.

Hyperplasia of the prostate gland and prostate cancer have been associated with high levels of serum 5 α -DHT [1–3].

Three types of 5 α -reductase (5 α -R) isozymes have been described; type 2 5 α -R plays a major role in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia as it is predominantly expressed in this tissue. However, some evidence indicates that type 1 is expressed in the prostate epithelial cells whereas type 2 is mainly located in the stromal compartment [4, 5]. Type 1 5 α -R is also located in the liver and skin and acts in a neutral or basic medium, whereas type 2 is active in acidic pH [4]. Recently 5 α -R3 has been investigated; this isozyme can

Correspondence: Dr. Marisa Cabeza, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada Del Hueso No. 1100, México, D. F., C.P. 04960, México.

E-mail: marisa@correo.xoc.uam.mx

Fax: +52-55-54837260

be found in the brain and pancreas and is related to hormone-refractory prostate cancer (HRPC) [6, 7]. None of these three isozymes have been purified, due to their unstable nature, and as a result, 5α -reductase isozyme inhibitors have been designed by targeting their substrate.

Various 5α -R2 inhibitors have been developed for relieving the symptoms produced in benign prostatic hyperplasia. These 5α -R inhibitors reduce bladder obstruction present in this disease by inhibiting the conversion of T to its more active form DHT. Moreover, these inhibitors eliminate the need for surgery and prevent further progression of the disease. The most extensively studied 5α -R inhibitors are finasteride and dutasteride [8]. Finasteride and dutasteride are 4-azasteroids that have demonstrated low affinity for androgen receptors and thus were not expected to produce undesirable antiandrogen effects such as impotence, muscle growth impairment, or gynecomastia [9]. However, when these drugs are used for long periods, they could induce hepatotoxicity [10]; thus, synthesis of new 5α -R inhibitors with low side effects has been a goal for researchers.

In view of the fact that we have recently synthesized several progesterone derivatives with an ester moiety at C-17, which showed high activity as inhibitors of 5α -R2 and prostate cancer cell growth [11, 12], in this paper we describe the biological activity of five novel steroidal compounds based on the progesterone skeleton and with an ester moiety at C-21. They are the following steroidal compounds: 21(*p*-fluoro)benzoyloxy- $16\alpha,17\alpha$ -epoxy- 3β -hydroxypregna-5-en-20-one **5**, 21(*p*-fluoro)benzoyloxy- 3β -hydroxypregna-5,16-dien-20-one **6**, 21(*p*-fluoro)benzoyloxy- $5\alpha,6\alpha$ -epoxy- 3β -hydroxypregna-16-en-20-one **7**,

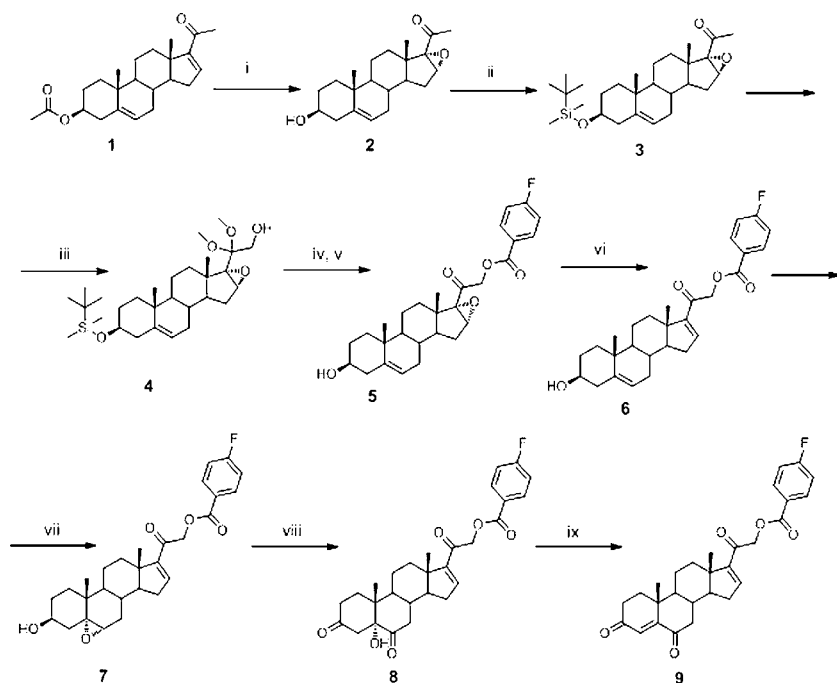
(*p*-fluoro)benzoyloxy- 5α -hydroxypregna-16-en-3,6,20-trione **8**, 21(*p*-fluoro)benzoyloxypregna-4,16-diene-3,6,20-trione **9**.

Results

Chemistry

The target compound 21(*p*-fluoro)benzoyloxypregna-4,16-diene-3,6,20-trione (**9**) was synthesized as shown in Scheme 1. The starting material 16-dehydropregnenolone acetate (**1**) was treated with hydrogen peroxide under basic conditions to form the $16\alpha,17\alpha$ epoxy compound **2**. Protection of the alcohol at C-3 of compound **2** with *tert*-butyldimethylsilyl chloride followed by oxidation of C-21 using (diacetoxyiodo) benzene afforded compound **4**. The alcohol **4** was esterified using the Steglich method and the C-3 hydroxy was deprotected using acidic conditions to obtain compound **5**. To regenerate the double bond at C-16, the epoxide was reduced using CrCl_2 to give compound **6**. The double bond at C-5 of compound **6** was reacted with *m*-chloroperoxybenzoic acid to afford the $5\alpha,6\alpha$ -epoxy compound **7**. Oxidation of the alcohol **7** with chromic acid yielded the 3,6-diketo- 5α -alcohol **8**. Dehydration of the hydroxyl group at C-4 in **8** with thionyl chloride yielded the α,β -unsaturated dicarbonyl analog **9**.

The configuration of the novel pregnenolone derivatives whose geometry resulted from the spatial arrangement of its bonds is shown in Fig. 1. The models of these structures were obtained using the ChemBio3D[®] program.



Scheme 1. Synthesis of compounds 2–9. Reagents: (i) 30% H_2O_2 , 4 N NaOH, MeOH; (ii) TBDMSCL, imidazole, DMF; (iii) $\text{C}_6\text{H}_5\text{I}(\text{OAc})_2$, NaOH, MeOH, CH_2Cl_2 ; (iv) *p*-fluorobenzoic acid, DCC, DMAP, CH_2Cl_2 ; (v) HCl, acetone; (vi) CrCl_2 , acetic acid, acetone; (vii) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 ; (viii) $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{O}$, acetone; (ix) SOCl_2 , Py, CH_2Cl_2 .

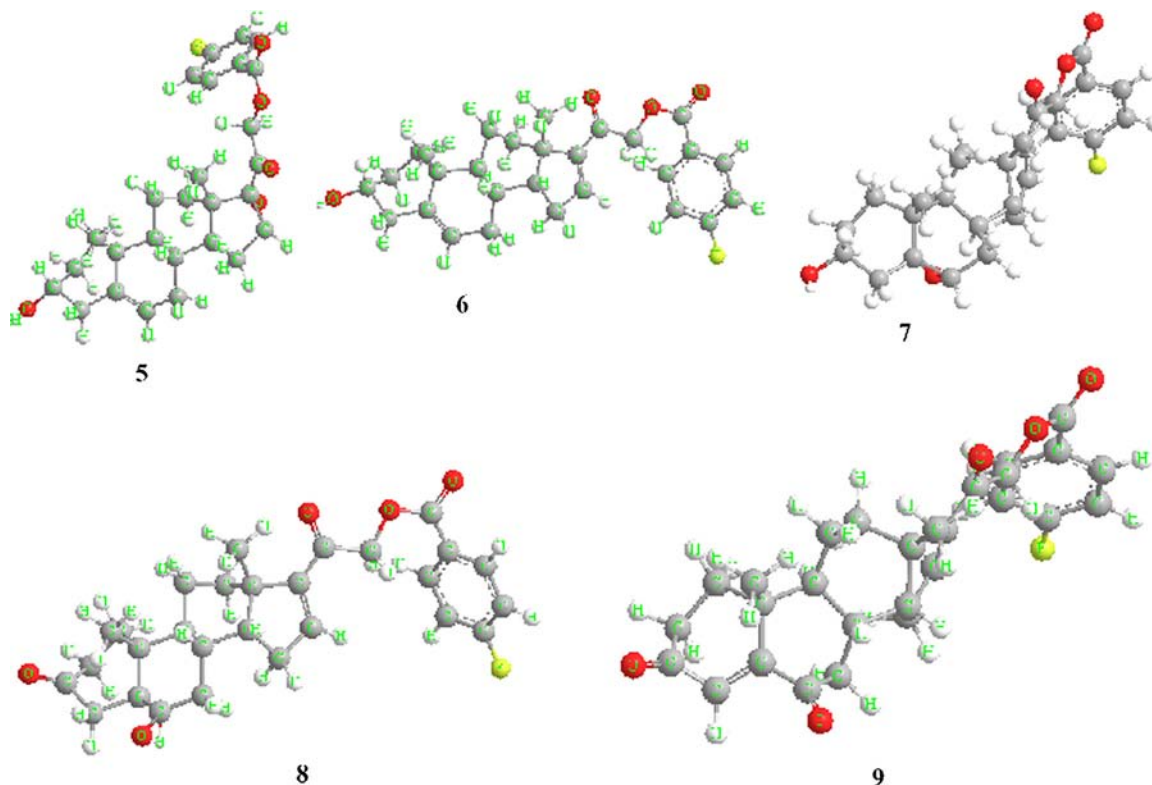


Figure 1. Configuration of the novel 21-esters of pregnenolone derivatives; their geometry resulted from the spatial arrangement of their bonds.

Activity of compounds 5–9 as inhibitors of 5 α -R 1 and 2

Figure 2 shows the IC_{50} values of 5–9 required to inhibit 50% of the activity of 5 α -reductase isoenzymes 1 and 2. Compared to 5–8, steroid 9 exhibited the highest inhibitory activity (IC_{50} = 1.0 μ M) for isoenzyme type 1. For the type 2 5 α -reductase isoenzyme, derivative 9 also displayed the highest inhibitory activity (IC_{50} = 0.179 nM). Steroids 5–8 showed lower inhibitory potency than finasteride for 5 α R2 (higher IC_{50} value) (Fig. 2).

Weight of the prostate gland and seminal vesicles of hamsters

After sacrificing the animals they were observed statistically significant ($p < 0.05$) reductions in the weights of the prostates and seminal vesicles as compared to glands from intact hamsters (Fig. 3). However, treatment with 1 mg/kg (BW) of T significantly reversed the effect of castration on these glands.

Finasteride (F) and the steroids 9, when administered together with T, significantly decreased the weight of the prostate and seminal vesicles ($p < 0.05$); however, compared to T, compounds 5–8 did not display any statistically significant effect (Fig. 3).

For 6 days, the castrated hamsters received subcutaneous injections of the various test materials, with the castrated control animals (V) being treated with vehicle only. The experiment was carried out in duplicate. The asterisks show the instances of statistically significant differences ($p < 0.05$) between the group of hamsters treated with testosterone (T) and those treated with T and with either finasteride (F) or with the synthesized steroids (5–9; see Scheme 1 for structures).

Discussion

We synthesized and identified the biological activity of five different (*p*-fluoro)benzoyloxy 21-esters of pregnenolone derivatives. On the basis of the results obtained in these experiments, the most accepted spatial conformation of both isozymes of 5 α -R was that in steroid 9. The presence of an ester group at C-21 masks the polar moiety and facilitates its crossing through the cell membranes. Thus, all these steroidal ester derivatives can cross phospholipid membranes and once they are in the bloodstream, they are hydrolyzed at C-21 by esterases in the blood to revert to the corresponding free acid. However, 9 was the only one which displayed a suitable steric

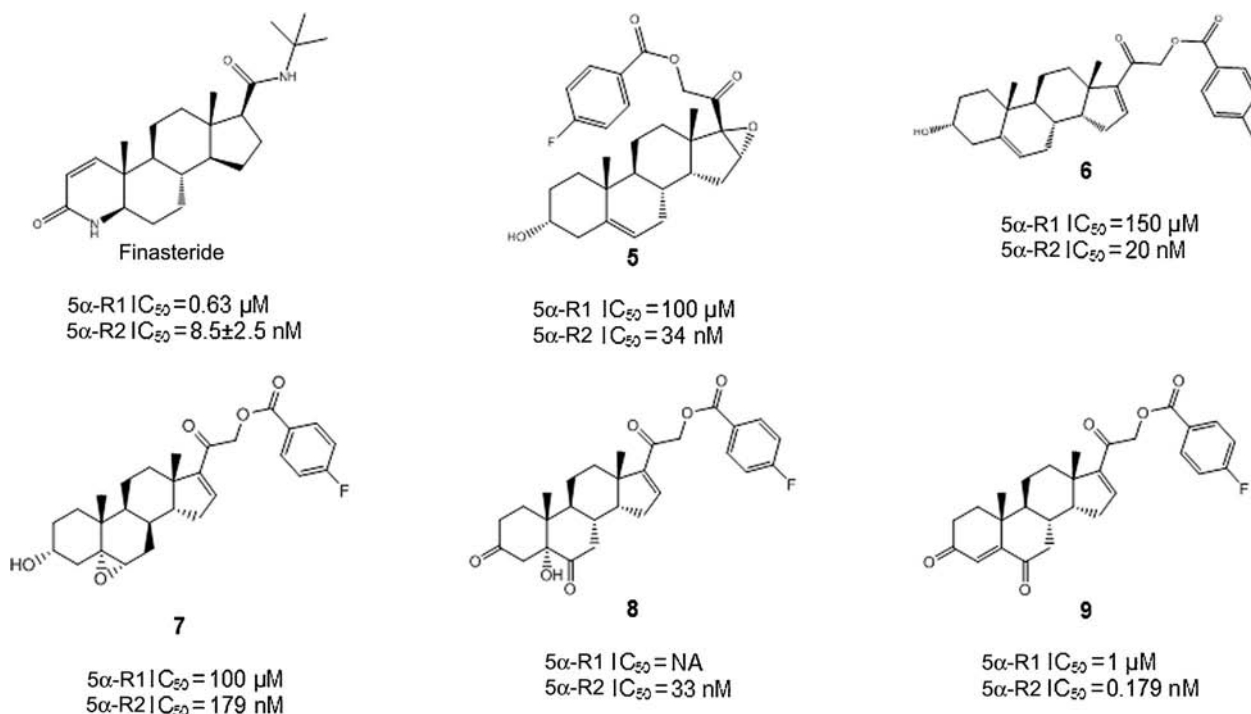


Figure 2. Structures and biological activities of different (*p*-fluoro)benzoyloxy 21-esters of pregnenolone.

conformation to induce pharmacological activity. This observation is consistent with the results previously reported by our group [13]. These previous data indicated that the

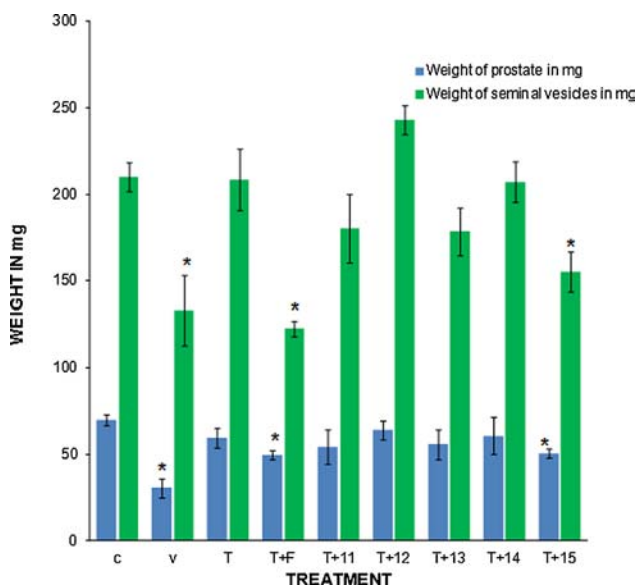


Figure 3. Weights of prostate and seminal vesicles glands (\pm standard deviation) from castrated (V) and intact animals (C) hamsters. *Statistical significance.

synthesized steroid pregna-4,6-diene-3,6,20-trione was an inhibitor of $5\alpha\text{-R-2}$, with an IC_{50} value 0.85 nM. This steroid also exhibited slight pharmacological activity, decreasing prostate weight in castrated hamsters stimulated with T [13]. On this basis, we designed the more lipophilic compound **9** to improve the pharmacological activity of this pregna-4,6-diene-3,6,20-trione previously studied, and obtained better results.

The presence of an OH group in the 5α -position in steroid **8** enables the formation of polar conjugates which can be promptly eliminated in the urine, as has been previously reported [14]. The introduction of a keto group at C-6 as in **9** apparently blocked the hepatic metabolism [14] of this molecule and, as a consequence, an increased effect of this steroid was observed.

The epoxy moiety at C-16 of **5** enhanced the inhibitory effect of $5\alpha\text{-R-2}$ and increased its potency (lower IC_{50} value) as compared with **7**, which has the epoxy moiety in C-5. Thus this spatial arrangement of the molecule was appropriate for inducing the inhibitory effect. However, this increase in activity and potency (**5**) was not observed for the $5\alpha\text{-R-1}$ isoenzyme.

The unsaturated points of these pregnenolone derivatives could also be correlated with the ability of these steroids to inhibit $5\alpha\text{-R}$ activity. The presence of the double bond in Δ^5 as in **6** increased the inhibitory effect on $5\alpha\text{-R-2}$ activity as compared with that produced by **8** (which does not have a double bond in Δ^5). However, the position of this double bond

did not influence 5 α -R1 activity (**8**), whereas the unsaturated point at C-4 in steroid **9** enhanced the inhibitory effect on the activity of both isozymes.

The presence of a keto group at C-3 makes the synthetic steroid a competitive substrate for these both isozymes, because their natural substrates possess this same group. However, the inhibitory activity of compound **8** was not enhanced by the presence of this keto group in C-3, as we would have expected.

In conclusion, **9** proved to have the best molecular conformation for acceptance by both types of 5 α -R as a likely substrate. In addition, this steroid also displayed activity *in vivo*; apparently the pharmacological activity was increased by the presence of a keto group at C-6. This could be an advantage for administration of this steroid in the body. As **9** was not metabolized by the liver, this compound could be administered orally. Future studies will enable us to test this hypothesis.

Because the structure of 5 α -reductase has not been elucidated, this study contributes to an understanding of the molecular interactions of these two types of 5 α -R enzymes.

Experimental

Chemistry

Chemical reagents

Reagents and solvents (laboratory grade) were purchased from commercial sources and were used without further purification. Melting points (uncorrected) were determined on a melting point apparatus (Fisher Johns, Mexico City); ¹H NMR and ¹³C NMR were taken on Varian Gemini 200 and VRX-300 spectrometer, respectively (MR resources NC, USA). Chemical shifts are given in ppm relative to that of Me₄Si ($\delta = 0$) in CDCl₃ (the abbreviations of signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet). Mass spectra were obtained with an HP5985-B spectrometer (Avantes, Apeldoorn, Netherlands). IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 200s spectrometer (Perkin-Elmer Life and Analytical Science, Shelton CT, USA). The UV lamp (254 nm) was from UVP (Upland, CA).

(1,2,6,7-³H)-Testosterone ([³H]T; specific activity: 95 Ci/mmol) was purchased from Perkin-Elmer Analytical Sciences (Boston, MA). This labeled steroid was purified by thin layer chromatography (TLC) on HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ plates (Merck, Darmstadt, Germany); the solvent system recommended by the manufacturer was used.

Radioinert T and 5 α -DHT were purchased from Steraloids (Wilton, NH, USA), Lubrol PX, DL-dithiothreitol (DTT). F was obtained by extraction from Proscar[®] (Merck, Sharp & Dohm, Mexico City) as follows: 180 Proscar tablets were crushed and extracted with 200 mL chloroform; after the solvent was removed under vacuum, the crude product was purified by silica gel 60 (63–200 μ m) column chromatography (Sigma–Aldrich) with ethyl acetate as an eluant [15].

Syntheses of the steroid derivatives: Overview

As starting material to prepare the steroids, we used commercially available 16-dehydropregnenolone acetate, purity 95%, melting point 172–175°C, Rot: –40° (Sigma–Aldrich) (**1** in Scheme 1). This steroid was hydrolyzed by treatment with 4N solution of NaOH in methanol. To this mixture, a 30% hydrogen peroxide solution was added drop by drop. The reaction was stirred at room temperature for 4 h, then the solvent was evaporated, and water was added. The precipitate was filtered and washed with water. The crude was purified by recrystallization from methanol to afford 0.87 g of the pure compound.

16 α ,17 α -Epoxy-3 β -hydroxypregna-5-en-20-one **2**

Yield: 95%, mp 180–182°C. IR (cm⁻¹): 3454, 2936, 1642, 1042, 1692. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.05 (s, 3H, H-18), 1.02 (s, 3H, H-19), 2.2 (m, 2H, H-21), 2.3 (m, 1H, H-16), 3.5 (m, 1H, H-3), 3.68 (s, 1H, –OH), 5.33 (m, 1H, H-6). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 15.1 (C-18), 19.3 (C-19), 27.51 (C-21), 60.46 (C-16), 71.02 (C-17), 71.06 (C-3), 120.9 (C-6), 141.12 (C-5), 204.9 (C-20). FAB-MS *m/z*: C₂₁H₃₀O₃ [M+H]⁺ calculated 331.2228, found 331.2220.

16 α ,17 α -Epoxy-3 β -tert-butyl dimethylsilyloxypregna-5-en-20-one **3**

16 α ,17 α -Epoxy-3 β β -hydroxypregna-5-en-20-one **2** (1 g, 3 mmol) in Fig. 1 was dissolved in methanol; tert-butyl dimethylsilyl chloride (0.76 g, 6.8 mmol) and imidazole (0.450 g, 5 mmol) in 15 mL of *N,N*-dimethylformamide were added to this solution. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. After completion of the reaction, the methanol was evaporated and water was added, and the precipitate was filtered and washed with water. The crude was purified by column chromatography using a mixture of 20% ethyl acetate in hexane to give 1.3 g of the pure compound **3**. Yield: 98%, mp 126–127°C. IR (cm⁻¹): 2929, 1659, 1698, 1083. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.58 (m, 6H, (CH₃)₂Si), 0.89 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.99 (s, 3H, H-18), 1.09 (s, 3H, H-19), 2.13 (s, 3H, H-21), 2.2 (m, 1H, H-16), 3.42 (m, 1H, H-3), 5.24 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-6). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 19.7 (C-18), 22.8 (C-19), 25.0 (C-21), 30.5 ((CH₃)₃CSi), 32.14 (C-Si), 65.1 (C-16), 75.5 (C-17), 77.0 (C-3), 125.0 (C-6), 146.5 (C-5), 209.4 (C-20). FAB-MS *m/z*: C₂₇H₄₄O₃Si [M+H]⁺ calculated 445.3093, found 445.3102.

16 α ,17 α -Epoxy-21-hydroxy-20-dimethoxy-3 β -tert-butyl dimethylsilyloxypregna-5-en-20-one **4**

16 α ,17 α -Epoxy-3 β -tert-butyl dimethylsilyloxypregna-5-en-20-one (**3**, 1 g, 2.25 mmol) was dissolved in 10 mL of dichloromethane; 20 mL of a methanolic solution of NaOH (1 g, 25 mmol) and (diacetoxyiodo)benzene (1.2 g, 3.72 mmol) were added. The mixture was stirred for 18 h and then the solvent was evaporated *in vacuo*, water was added, and the precipitate was filtered and washed with water. The crude was purified on silica gel using 10% ethyl acetate in hexane to give 0.74 g of the pure compound **4**. Yield: 65%, mp 205–207°C. IR (cm⁻¹): 3596, 1666, 1070, 1033. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.1 (s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.83 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.97 (s, 3H, H-18),

1.2 (s, 3H, H-19), 2.2 (m, 1H, H-16), 3.24 (m, 1H, H-3), 3.25 (m, 6H, CH₃O–), 3.5 (s, 1H, –OH), 3.25 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H-21), 5.24 (m, 1H, H-6). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 17.1 (C-18), 20.7 (C-19), 30.51 ((CH₃)₃CSi), 31.57 (C-Si), 50.75 (C-16), 50.75 (CH₃OH–), 63.05 (C-21), 74.22 (C-17), 77.08 (C-3), 125.27 (C-20), 125.27 (C-6), 146.39 (C-5). FAB-MS *m/z*: C₂₉H₅₀O₅Si [M+H]⁺ calculated 507.3461, found 507.3472.

21(*p*-Fluoro)benzoyloxy-16 α ,17 α -epoxy-3 β -hydroxypregna-5-en-20-one 5

16 α ,17 α -Epoxy-21-hydroxy-20-dimethoxy-3 β -*tert*-butyldimethylsilyloxypregna-5-en-20-one 4 (1.5 g, 3.05 mmol) was dissolved in methanol; DCC (3.95 g, 19.75 mmol) and DMAP (2.37 g, 19.75 mmol) in dichloromethane (60 mL) was added *p*-fluorobenzoic acid (2.7 g, 19.75 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 4 h. Ethyl acetate (250 mL) was added and the precipitated dicyclohexyl urea was filtered. The organic phase was washed three times with 10% aqueous hydrochloric acid, 5% aqueous sodium bicarbonate and water, the solvent was dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated under vacuum. The crude ester was dissolved in acetone (30 mL), and to this solution hydrochloric acid (1 mL) was added drop by drop and the mixture was stirred for 15 min, then water was added and the precipitate was filtered and washed with water. The crude was purified by column chromatography using 10% ethyl acetate in hexane to afford 1.17 g of pure compound 5. Yield: 82%, mp 210–212°C. IR (cm⁻¹): 3320, 3044, 2936, 1721, 1381, 1055. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.02 (s, 3H, H-18), 1.13 (s, 3H, H-19), 3.48 (m, 1H, H-3), 3.87 (s, 1H, –OH), 4.85 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H-21), 4.94 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H-21), 5.33 (s, 1H, H-6), 7.12 (t, *J* = 12 Hz, 2H, H-Ar), 8.1 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-Ar). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 15.17 (C-18), 19.33 (C-19), 42.18 (C-4), 61.66 (C-21), 66.44 (C-16), 70.66 (C-17), 71.60 (C-3), 115.74 (C-Ar), 120.91 (C-6), 125.54 (C-Ar), 132.43 (C-Ar), 141.13 (C-5), 165.54 (ester carbonyl), 167.26 (C-Ar). FAB-MS *m/z*: C₂₈H₃₃FO₅ [M+H]⁺ calculated 469.2346, found 469.2338.

21(*p*-Fluoro)benzoyloxy-3 β -hydroxypregna-5,16-dien-20-one 6

21(*p*-Fluoro)benzoyloxy-16 α ,17 α -epoxy-3 β -hydroxypregna-5-en-20-one (5) (1 g, 2.1 mmol) dissolved in 100 mL of acetone containing CrCl₂ (1.29 g, 10.5 mmol) and 2 mL of acetic acid were stirred at room temperature for 45 min. A mixture of ice in water was then added and the precipitate was filtered and dried under vacuum. The crude was purified on silica gel using 10% ethyl acetate in hexane to afford 0.65 g pure compound 6. Yield: 69%, mp 280–282°C. IR (cm⁻¹): 3325, 2933, 1723, 1677. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.95 (s, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19), 3.51 (m, 1H, H-3), 4.20 (s, 1H, –OH), 5.11 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H-21), 5.25 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H-21), 5.34 (s, 1H, H-6), 6.82 (s, 1H, H-16), 7.11 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-Ar), 8.11 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-Ar). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 15.88 (C-18), 19.29 (C-19), 66.09 (C-21), 71.68 (C-3), 115.67 (C-Ar), 120.93 (C-6), 125.7 (C-Ar), 132.45 (C-Ar), 141.34 (C-5), 144.26 (C-16), 152.0 (C-17), 165.07 (ester carbonyl), 167.21 (C-Ar), 190.31 (C-20). FAB-MS *m/z*: C₂₈H₃₃FO₄ [M+H]⁺ calculated 453.2396, found 453.2403.

21(*p*-Fluoro)benzoyloxy-5 α ,6 α -epoxy-3 β -hydroxypregna-16-en-20-one 7

21(*p*-Fluoro)benzoyloxy-3 β -hydroxypregna-5,16-dien-20-one (6) (0.45 g, 1 mmol) and *m*-chloroperbenzoic acid (0.52 g, 3 mmol) dissolved in 15 mL of dichloromethane were stirred at room temperature for 45 min. After this, a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (30 mL) containing sodium bisulfite (0.3 g) was added. The reaction mixture was extracted with chloroform; the organic phase was washed with water, dried over sodium sulfate, and the solvent was removed under vacuum. The product was recrystallized from methanol to give 0.36 g of pure compound 7. Yield: 77%, mp 213–215°C. IR (cm⁻¹): 3517, 2930, 1718, 1678, 1087. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.89 (s, 3H, H-18), 1.1 (s, 3H, H-19), 2.93 (d, *J* = 4 Hz, 1H, H-6), 3.84 (s, 1H, –OH), 3.91 (m, 1H, H-3), 4.09 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H-21), 5.27 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H-21), 6.8 (s, 1H, H-16), 7.12 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-Ar), 8.11 (m, 2H, H-Ar). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 15.14 (C-18), 15.91 (C-19), 58.8 (C-6), 65.87 (C-21), 66.08 (C-5), 68.60 (C-3), 115.47 (C-Ar), 125.71 (C-Ar), 132.56 (C-Ar), 143.97 (C-16), 151.81 (C-17), 165.06 (ester carbonyl), 167.22 (C-Ar), 198.8 (C-20). FAB-MS *m/z*: C₂₈H₃₃FO₅ [M+H]⁺ calculated 469.2346, found 469.2339.

(*p*-Fluoro)benzoyloxy-5 α -hydroxypregna-16-en-3,6,20-trione 8

21(*p*-Fluoro)benzoyloxy-5 α ,6 α -epoxy-3 β -hydroxypregna-16-en-20-one 7 (0.47 g, 1 mmol) was dissolved in 10 mL of acetone. A solution of chromium trioxide (0.85 g, 8.5 mmol) dissolved in 4.5 mL water at 0°C for 10 min was added dropwise. The resulting mixture was allowed to warm up to room temperature and after 30 min the same amount of chromium trioxide was added in the same manner. The mixture was diluted with cold water (75 mL) and the precipitate was filtered and dried. The product was recrystallized from methanol to afford 0.41 g of the pure compound 8. Yield: 86%, mp 135–136°C. IR (cm⁻¹): 3332, 2950, 1710, 1685. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.95 (s, 3H, H-18), 1.04 (s, 3H, H-19), 2.8 (m, 2H, H-4), 3.89 (s, 1H, –OH), 5.12 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H-21), 5.26 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H-21), 6.81 (s, 1H, H-16), 7.13 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-Ar), 8.12 (m, 2H, H-Ar). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 13.82 (C-18), 15.98 (C-19), 66.1 (C-21), 82.77 (C-5), 115.52 (C-Ar), 125.68 (C-Ar), 132.59 (C-Ar), 143.62 (C-16), 151.68 (C-17), 165.09 (ester carbonyl), 167.28 (C-Ar), 190.26 (C-20), 210.18 (C-3), 210.87 (C-6). FAB-MS *m/z*: C₂₈H₃₁FO₆ [M+H]⁺ calculated 483.2138, found 483.2144.

21(*p*-Fluoro)benzoyloxypregna-4,16-diene-3,6,20-trione 9

A volume of 4 mL of a cold solution of (*p*-fluoro)benzoyloxy-5 α -hydroxypregna-16-en-3,6,20-trione 8 (0.48 g, 1 mmol) was dissolved in dichloromethane. A mixture with 0.4 mL pyridine was added dropwise with thionyl chloride (0.1 mL) under a nitrogen atmosphere. The resulting solution was stirred at room temperature for 2 h. Iced water (100 mL) was added and it was extracted three times with ethyl acetate. The organic phase was washed with 10% aqueous hydrochloric acid, 5%

aqueous sodium bicarbonate, and water. It was dried over sodium sulfate and the solvent was evaporated under vacuum. The product was recrystallized from 20% ethyl acetate in hexane to give 0.38 g of pure compound **9**. Yield: 82%, mp 182–185°C. IR (cm⁻¹): 2942, 1722, 1681. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.0 (s, 3H, H-18), 1.21 (s, 3H, H-19), 5.14 (d, J = 16 Hz, 1H, H-21), 5.26 (d, J = 16 Hz, 1H, H-21), 6.2 (s, 1H, H-4), 6.8 (s, 1H, H-16), 7.13 (s, 2H, H-Ar), 8.11 (s, 2H, H-Ar). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 15.9 (C-18), 17.4 (C-19), 66.0 (C-21), 115.5 (C-Ar), 115.7 (C-Ar), 125.8 (C-4), 127.6 (C-Ar), 132.4 (C-Ar), 143.3 (C-16), 151.4 (C-17), 160.4 (C-5), 165.0 (ester carbonyl), 167.0 (C-Ar), 190.1 (C-20), 199.2 (C-3), 201.3 (C-6). FAB-MS m/z : C₂₈H₂₉FO₅ [M+H]⁺ calculated 465.2033, found 465.2026.

Human and animal tissues and procedures

Four hours after a 57-year-old man had died from myocardial infarction, his normal prostate was extirpated in the Pathology Department of the Mexico City General Hospital. The Ethical Committee of the General Hospital in Mexico City approved this protocol.

The tissue was rinsed and immediately chilled in ice-cold 150 mM NaCl and stored at –20°C. The frozen human prostate was thawed on ice, rinsed, and minced in buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 6.5, containing 0.32 M sucrose, 0.1 mM DTT) (Sigma–Aldrich, Mexico City, Mexico) with an IKA[®] A11 basic tissue mill (IKA Laboratory Equipment, Mexico City, Mexico). Unless otherwise specified, the following procedures were carried out at 4°C.

Type 2 5 α -R isozyme isolated from human prostate

Human prostate was used in this experiment because this tissue is an abundant source of 5 α -R2 for the study of the effect(s) of **5–9**, which were designed for inhibition of the activity of this enzyme in humans. In this tissue, type 1 5 α -R is not as abundant as type 2.

Human prostate tissue was homogenized in two volumes of buffer A with a tissue homogenizer Ultra-Turrax IKA, T18 basic (Wilmington, NC). The homogenates were centrifuged (1500g; 60 min) [16] in a SW 60 Ti rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). The pellets were resuspended in buffer A, and stored at –70°C. This suspension had a final concentration of 5 mg protein/mL, as determined by the Bradford method [17] and was used as a source of type 2 5 α -R isozyme.

Type 1 5 α -R isozyme isolated from rat liver

All procedures involving animals were approved by the Institutional Care and Use Committee of the Metropolitan University of Mexico (UAM; Xochimilco, Mexico). All animals used in this study were obtained from the Animal Care Facility at UAM.

Two adult (8-month-old) rats had been fasted overnight to decrease glycogen levels before their livers were extirpated for use as a source of 5 α -R1, as recommended by Levy et al. [18]. To prepare microsomes, the livers (30g) were minced in one volume of buffer A, using the tissue mill. Unless otherwise specified, the following procedures were carried

out at 4°C. The tissue was homogenized, the suspension was centrifuged (10000g; 30 min; 0°C) (Beckman L70K ultracentrifuge), and the pellet was discarded. The supernatant was filtered through a nylon mesh filter (pore size 11 μ m, distributed by OEM-Membrane Solution, Dallas, TX) and centrifuged (100000g; 60 min). The microsomal pellet was resuspended in five volumes of buffer A with a homogenizer, and the protein concentration was determined by the Bradford method. The suspension was recentrifuged (100000g; 30 min) and the pellet was resuspended in buffer A to give a final concentration of 20 mg protein/mL. The microsomal suspension was stored at –80°C prior to preparation of the solubilized type 1 5 α -R steroid.

The solubilization of type 1 5 α -R isozyme from rat liver microsomes was carried out according to Levy et al. [18].

Gonadectomized male hamsters

For the experiments *in vivo*, 80 adult male golden hamsters (2.5 months old; 150–200 g) were used. After gonadectomies had been performed on 80 hamsters under isoflurane anesthesia, the castrated hamsters were allowed to recover for 30 days prior to experimentation [19]. The castrated hamsters and the remaining eight intact hamsters were housed in a room with controlled temperature (22°C) and light-dark periods of 12 h; the hamsters were fed with food and water *ad libitum*. Thirty days post-gonadectomy, the hamsters were separated into ten groups consisting of four animals per group. The hamsters were treated for 6 days as described above and thereafter sacrificed with CO₂. This experiment was carried out twice under the same conditions.

Biological activity of steroidal derivatives: Experiments *in vitro*

The activities of types 1 and 2 5 α -reductase were measured by following the conversion of T to DHT, as previously described [16, 18, 20, 21]. The reagent mixture (final volume, 1 mL) contained 1 mM of DTT in 40 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0 for type 1; pH 6.5 for type 2), 2 nM [1,2,6,7-³H]T, 6.31 μ M T (for type 1), and 2 mM NADPH. The reaction, carried out in duplicate, was started when this mixture was added to the enzymatic fraction (for type 1, 90 μ g protein/6.7 μ L from the solubilized microsomes; for type 2, 50 μ g/80 μ L from the membrane fraction of human prostate). After incubation (37.5°C; 60 min), the reaction was stopped by adding dichloromethane (1 mL) and mixing; this was considered the end point. As a control, the procedure was also carried out without the addition of the enzyme fraction.

In order to extract and purify DHT formed by the activity of types 1 and 2 5 α -reductase, after the individual reaction mixtures had been shaken (1 min) using a Type 16700 mixer (Barnstead Thermolyne, Proveedor Científico, México, D. F.), the dichloromethane phase of each was placed into individual tubes. This extraction was repeated for four additional times. Each pooled dichloromethane extract was evaporated to dryness under a nitrogen stream and then suspended in

methanol (50 μ L); each preparation was spotted onto HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ plates. T, DHT, and a mixture of both standards were applied to the plate in distinct lanes on either side of the spotted preparation samples. The plates were developed in chloroform/acetone (9:1) and were air-dried; the chromatography was repeated for two additional times. DHT was detected using phosphomolybdic acid reagent (Sigma–Aldrich), and T, by fluorescence (UV lamp; 254 nm). The radioactivity on the plate was scanned by using a Bioscanner AR2000 (Bioscan, Washington, DC). The zones that showed chromatographic behavior identical to that of the standards (retention factor, R_f) were quantified as T or DHT. The DHT transformation yields were calculated from the lanes, taking into account the total radioactivity in the TLC, and were plotted using SigmaPlot 12 software (Systat Software, INC., San Jose, CA). For the control incubations, the chromatographic separations and identifications were carried out in the same manner.

Type 1 5 α -R activity was calculated from the percentage of labeled DHT that had been formed, taking into consideration the recovery, blank values, specific activity of [³H]T, and the ratio of added [³H]T to unlabeled T. Type 2 5 α -R activity was calculated taking into consideration the recovery, blank values, and specific activity of [³H]T.

The R_f of the T standard was 0.56. The radioactive zone that had chromatographic behavior identical to that of the standard T corresponded to 70% of the radioactivity accounted for in the plate. The radioactivity contained in the zone of the experimental chromatogram, which had an R_f identical to that of the DHT standard (R_f : 0.67), was identified as the transformed DHT; it corresponded to 20–27% of the total radioactivity accounted for in the TLC. This result was considered to be 100% of the activity of 5 α -R (types 1 or 2) for the development of inhibition plots.

Unmodified [³H]T, identified (R_f 0.56) from control incubations (i.e., those that had not contained tissue), had identical chromatographic behavior to that of the non-labeled standard T.

The radioactivity contained in the zone corresponding to the DHT standard (R_f 0.67) of the control chromatogram was 1% of the total radioactivity accounted for in the plate and was considered as an error; it was subtracted from the experimental chromatograms.

Effect of steroid derivatives on activity of types 1 and 2 5 α -reductase types

The effect of steroids 5–9 on the activity of types 1 and 2 5 α -reductase was determined under the same conditions *in vitro* as described above, but in the presence of six different concentrations ($\{1 \times 10^{-11}, 1 \times 10^{-10}, \dots, 1 \times 10^{-3} \text{ M}\}$) of each one of derivatives 5–9. Extraction and purification of the DHT formed from these incubations were carried out as described above.

Control tubes (without inhibitors) were prepared with the same incubating medium and labeled T plus either type 1 or type 2 5 α -reductase, under the same conditions. DHT transformations in the presence of 5–9 were calculated from the lanes, taking into account the total radioactivity in the plate, and inhibition curves were plotted using SigmaPlot 12 software.

Determination of the 50% inhibitory concentration of steroids 5–9 on the activities of types 1 and 2 5 α -reductase
To determine the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of steroids 5–9 and 6 on the activities of types 1 and 2 5 α -reductase, the inhibition plots obtained as we indicated above were analyzed with the SigmaPlot 12.5 software (Fig. 4).

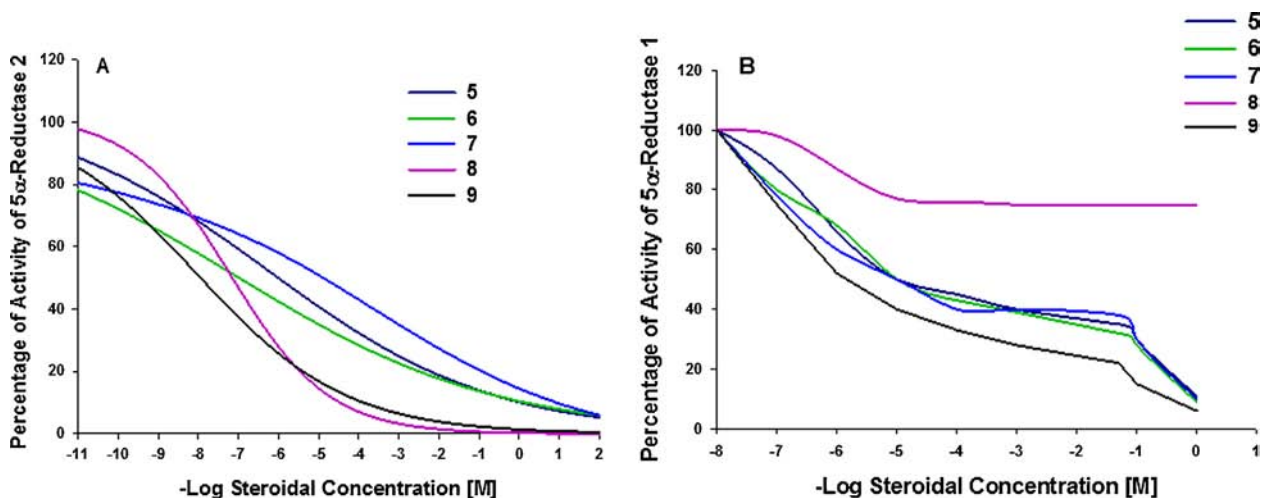


Figure 4. IC₅₀ values of steroids 4–9 determined from the curves obtained by plotting the activity of 5 α -R types 1 and 2 versus the concentration. The program SigmaPlot was used for curve analysis.

Biological activity of steroidal derivatives: Experiments *in vivo*

Effect of steroid derivatives on prostate and seminal vesicles of castrated hamsters

For 6 consecutive days, each of the steroid derivatives 5–9 (2 mg/kg body weight (BW)) dissolved in 200 μ L sesame oil, together with 1 mg T/kg (BW), was administered by s.c. injection to a group of gonadectomized hamsters (four animals per derivative). Three groups of gonadectomized animals were used as controls: the first group was injected s.c. with 200 μ L sesame oil; the second group, with 1 mg T/kg (BW); and the third group, with 1 mg T plus 1 mg F/kg (BW) also prepared in sesame oil. Additionally, one group of four intact hamsters was used as an intact control. On the seventh day, the animals were sacrificed with CO₂. The prostate and seminal vesicles of each hamster were dissected and weighed.

Two separate experiments were performed for each group of steroid-treated hamsters. The results were analyzed by one-way analysis of variance and Dunnett's method to compare means, using JMP IN 5.1 software (JMP, Statistical Discovery, and Cary, NC, USA).

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

The authors declare that there are no real or perceived conflicts of interest arising from intellectual, personal, or financial circumstances of the research. Additionally, all authors are aware, and approve, of the contents and order of authorship of the article.

References

- [1] E. P. Jenkins, S. Andersson, J. Imperato-McGinley, J. D. Wilson, D. W. Russell, *J. Clin. Invest.* **1992**, *89*, 293–300.
- [2] M. Marberger, *Nat. Clin. Pract. Urol.* **2006**, *3*, 495–503.
- [3] L. N. Thomas, C. B. Lazier, R. Gupta, R. W. Norman, D. A. Troyer, S. P. O'Brien, R. S. Rittmaster, *Prostate* **2005**, *63*, 231–239.
- [4] D. W. Russell, *J. D. Ann. Rev. Biochem.* **1994**, *63*(1), 25–61.
- [5] T. E. H. M. Liang, M. A. Cascieri, A. H. Cheung, G. F. Reynolds, G. H. Rasmusson, *Endocrinology* **1985**, *117*, 571–579.
- [6] T. Ogishima, F. Mitani, M. Suematsu, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *111*, 80–86.
- [7] M. Uemura, K. Tamura, S. Chung, S. Honma, A. Okuyama, Y. Nakamura, H. Nakagawa, *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 81–86.
- [8] F. Machetti, A. Guarna, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2002**, *12*, 201–215.
- [9] T. Liang, C. E. Heiss, A. H. Cheung, G. F. Reynolds, G. H. Rasmusson, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 734–739.
- [10] M. Brandt, M. A. Levy, *Biochemistry* **1989**, *28*, 140–148.
- [11] M. Cabeza, E. Bratoeff, I. Heuze, A. Rojas, N. Terán, M. Ochoa, M. T. Ramírez-Apan, E. Ramírez, V. Pérez, I. Gracia, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2006**, *21*, 371–378.
- [12] E. Bratoeff, M. Garrido, T. Ramírez-Apan, Y. Heuze, A. Sánchez, J. Soriano, M. Cabeza, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6233–6241.
- [13] V. Pérez-Ornelas, M. Cabeza, E. Bratoeff, I. Heuze, M. Sánchez, E. Ramírez, E. Naranjo-Rodríguez, *Steroids* **2005**, *70*, 217–224.
- [14] G. L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, Oxford **2001**.
- [15] G. Trapani, L. Dazzi, M. G. Pisu, A. Reho, E. Seu, G. Biggio, *Brain Res. Protocols* **2002**, *9*, 130–134.
- [16] J. Hirosumi, O. Nakayama, T. Fagan, K. Sawada, N. Chida, M. Inami, S. Takahashi, H. Kojo, Y. Notsu, M. Okuhara, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *52*, 357–363.
- [17] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*(1–2), 248–254.
- [18] M. A. Levy, M. Brandt, A. T. Greway, *Biochemistry* **1990**, *29*, 2808–2815.
- [19] M. Cabeza, Y. Heuze, H. Quintana, E. Bratoeff, *Asian J Anim. Vet. Adv.* **2010**, *5*, 202–209.
- [20] E. Bratoeff, A. Sánchez, Y. Arellano, Y. Heuze, J. Soriano, M. Cabeza, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*, 1247–1254.
- [21] E. Bratoeff, T. Segura, S. Recillas, E. Carrizales, A. Palacios, I. Heuze, M. Cabeza, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2009**, *24*, 655–662.

Crystal Structure and Synthesis of 3 β -(*p*-Iodobenzoyloxy)-16 α ,17 α - Eoxypregn-4-En-6,20-Dione

Alejandra Chávez-Riveros¹, Marisa Cabeza², Eugene Bratoeff¹, Manuel Soriano-García³

¹Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, México D. F., México

²Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México D. F., México

³Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D. F., México

Email: soriano@servidor.unam.mx

Received 23 March 2014; revised 26 April 2014; accepted 18 May 2014

Copyright © 2014 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

3 β -(*p*-iodobenzoyloxy)-16 α ,17 α -epoxypregn-4-en-6,20-dione (7), C₂₈H₃₁O₅I, was synthesized from the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate. X-ray diffraction analysis of (1) demonstrated that it consisted of four rings, three six-membered rings (A, B and C) and one five-membered ring (D). A, B, C and D rings occur in an envelope, deformed chair, deformed chair, and the half chair conformations, respectively. The absolute configurations of 7 for the chiral centers are 3S, 8S, 9S, 10R, 13S and 14S. The crystal of 3 β -(*p*-iodobenzoyloxy)-16 α ,17 α -epoxypregn-4-en-6,20-dione is in monoclinic crystal system with space group *P*2₁, lattice constants: *a* = 10.8567 (11), *b* = 7.5479 (7), *c* = 16.0391 (16) Å, β = 109.473 (1)°, *V* = 1239.1 (2) Å³, *D*_x = 1.518 g/cm³ and *Z* = 2. The molecules in the crystal are stabilized by C-H...O interactions and van der Waals forces.

Keywords

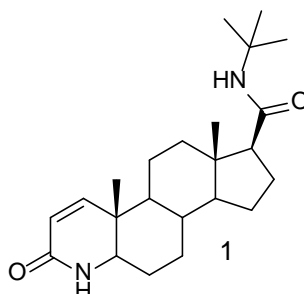
Progesterone Derivatives, Androgen Receptor, 5-Alpha-Reductase Inhibitors, Human Prostate

1. Introduction

At the present time cancer still represents an enormous medical challenge. It is predicted that in this year in the USA about 580,350 persons will die from this disease. Worldwide breast cancer represents the main cause of deaths for women [1] and prostate cancer for men [2]. For this reason our attention is focused on finding a ste-

roidal compound with the high anticarcinogenic activity [3].

The most extensively studied class of 5α -reductase inhibitors is the 4-azasteroids, which include the drug finasteride **1**. This compound is the first 5α -reductase inhibitor approved in the USA for the treatment of BPH. This compound has approximately a 100-fold greater affinity for type 2 5α -reductase, than for the type 1 enzyme [4]. In humans, finasteride decreases prostatic DHT levels by 70% - 90% and reduces the prostate size, while T tissue levels remain constant. The use of finasteride demonstrated a sustained improvement in the treatment of androgen-dependent diseases and it also reduced the prostate specific antigen (PSA) levels [5].



In view of the fact that the 16,17-epoxy derivatives of 4,6-pregnadiene showed antiandrogenic activity [6], it was of interest to synthesize the 3β -(*p*-iodobenzoyloxy)- $16\alpha,17\alpha$ -epoxypregn-4-en-6,20-dione analog **7**, and evaluate it as an antiandrogen [7] [8].

In this paper we describe the synthesis and X-ray determination of 3β -(*p*-iodobenzoyloxy)- $16\alpha,17\alpha$ -epoxypregn-4-en-6,20-dione **7**. Compound **7** is prepared from the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate and its synthesis is shown in **Scheme 1**. This compound has a high biological activity with a good probability to be used in the future for the treatment of androgen dependent diseases [9] [10].

2. Experimental

2.1. Synthesis of the Compound

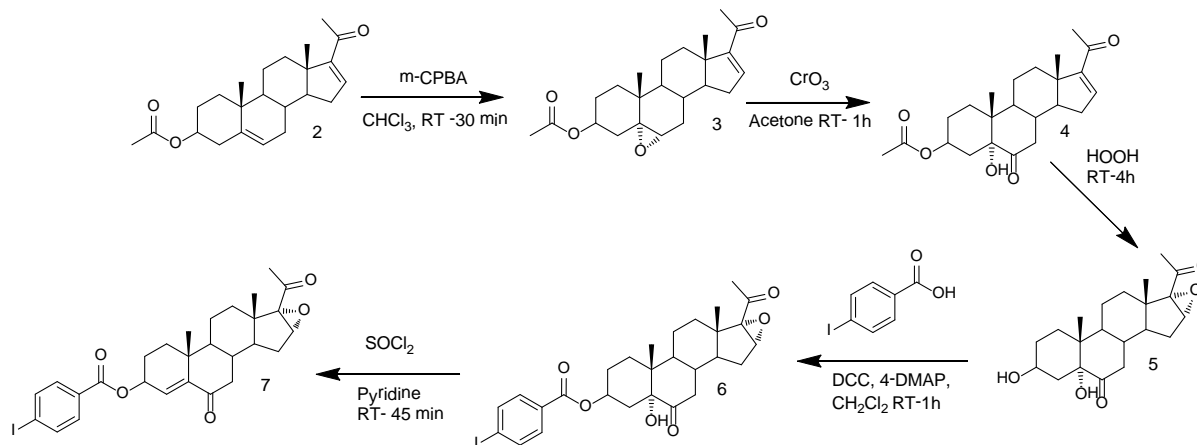
3β -(*p*-Iodobenzoyloxy)- $16\alpha,17\alpha$ -Eoxypregn-4-En-6,20-Dione (**7**)

To a solution of steroid **6** (1 g, 1.74 mmol) in methylene chloride (8 mL) and pyridine (1 mL) was added dropwise under a nitrogen atmosphere at 0°C thionyl chloride (0.2 mL). The resulting solution was stirred at room temperature for 45 min. Ice water (100 mL) was added and it was extracted three times with chloroform. The organic phase was washed with 10% aqueous hydrochloric acid, 5% aqueous sodium bicarbonate and water. It was dried over sodium sulfate and the solvent was removed in vacuum. The crude product was recrystallized from methanol. Yield of 87%. (KBr) cm^{-1} : 3000, 2942, 1730, 1675, 1610. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.04 (3H, s, H-18), 1.3 (3H, s, H-19), 2.1 (3H, s, H-21), 2.7 (1H, H-16), 4.43 (2H, H-3), 6.6 (1H, H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 18.7 (C-18), 20.1 (C-19), 67.6 (C-16), 69.9 (C-3), 79.5 (C-17), 129.1 (C-4), 147.8 (C-5), 201.6 (C-6). MS m/z 574 (M^+).

2.2. *In Vitro* Experiments

Cytotoxicity Assay

Compound **7** was screened *in vitro* against six human cancer cell lines: PC-3 (human prostate), MCF-7 (human breast), U251 (human glioblastoma), K562 (human erythromyeloblastoid leukemia), HCT-15 (human colorectal adenocarcinoma), SKLU-1 (humanlung adenocarcinoma). The cell lines were supplied by National Cancer Institute (USA). The human tumor cytotoxicity was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B test (SRB) in microculture assay to measure cell growth, as described in the protocols established by the NCI. The cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 10,000 units/mL penicillin G sodium, 10,000 $\mu\text{g/mL}$, streptomycin sulfate, 25 $\mu\text{g/mL}$ amphotericin B (Gibco) and 1% nonessential amino acids (Gibco) were added. They were maintained at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO_2 . The viability of the cells used in the experiments exceeds 95% as determined with trypan blue. The cells were removed from the tissue culture flask and diluted with fresh media. Of this cell



Scheme 1. Schematic representation of the formation of 3β-(*p*-iodobenzoyloxy)-16α,17α-epoxypregn-4-en-6,20-dione.

suspension, 100 μL containing 5000 or 10,000 cells per well, were pipetted into 96-well microtiter plates (Costar) and the material was incubated at 37°C for 24 h in a 5% CO_2 atmosphere. Subsequently, 100 μL of a solution of the test compounds obtained by diluting the stocks were added to each well. The cultures were exposed for 48 h to the drug at concentration of 50 μM . After the incubation period, cells were fixed to the plastic substratum by the addition of 50 μL of cold 50% aqueous trichloroacetic acid. The plates were incubated at 4°C for 1 h washed with tap H_2O , and air dried. The trichloroacetic acid fixed cells were stained by the addition of 0.4% SRB. Free SRB solution was removed by washing with 1% aqueous acetic acid. The plates were air dried, and the bound dye was solubilized by the addition of 10 mM of buffered Tris based (100 μL). The plates were placed on a shaker for 5 min, and the absorption was determinate at 515 nm using an ELISA plates reader (Bio-Tex Instruments) [11].

2.3. *In Vivo* Experiments

Animals and Tissues

Adult male golden hamsters (150 - 200 g) were obtained from the Metropolitan University in Xochimilco, Mexico. Gonadectomies were performed under pentobarbital anesthesia 30 days prior to the experiments and the animals were sacrificed with CO_2 . This protocol was approved by the Institutional Care and Use Committee of the Metropolitan University of Mexico (UAM). Human prostate from cadaver was kindly provided by Dr. Avissai Alcántara at The General Hospital (SS) in Mexico City, and stored at -70°C. The prostate glands from hamsters were immediately removed, blotted and weighed prior to their use. Frozen human prostate was thawed on ice and minced with scissors. Unless specified, the following procedures were carried out at 4°C. The animal and human tissues were homogenized with a tissue homogenize (model 985-370; variable speed 5000 - 30,000 rpm, Biospec Products, Inc.).

2.4. Determination of the Crystal Structure

X-ray data were collected on a Bruker Smart APEX AXS CCD area detector with a graphite monochromator and Mo $K\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) by the ω -scan method. The collected data were reduced using *SAINT* [10] and the empirical absorption corrections were performed using *SADABS* program [10]. The details were shown in **Table 1**.

3. Results and Discussion

3.1. Refinement Details

All reflections were defined based on F^2 . The weighted R-factor wR and goodness of fit S are based on F^2 , conventional R-factors R are based on F, with F set to zero for negative F^2 . The threshold expression of $F^2 > \sigma(F^2)$ is used only for calculating R-factors (gt) etc., and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R-factors based on F^2 are statistically about twice as large as those based on F, and R-factors based on all data will

Table 1. Data collection and handling.

Empirical formula	C ₂₈ H ₃₁ O ₅ I
Formula weight	267.28
Crystal external appearance	Colorless prism
Crystal size	0.36 × 0.28 × 0.07 mm
Diffractometer	Bruker Smart APEX AXS CCD area detector
Scan mode	psi-scan
Theta range for data collection	1.19 to 25.34 deg
Completeness to theta	99.8%
Wavelength	Mo K α radiation (0.71073 Å)
Programs	SHELXS-97, SHELXL-97
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Absorption correction	Sadabs, Sheldrick, G. M. (1996)

be even larger. I1 and I1A atoms show some disorder and have occupancy factors of 0.55 (3) and 0.45 (3) and treated anisotropically.

3.2. Geometric Details

All esds (except the esd in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell esds are taken into account individually in the estimation of esds in distances, angles and torsion angles; correlations between esds in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell esds is used for estimating esds involving l.s. planes.

3.3. Structure Details

The structure was solved by direct methods [11], and then refined by full-matrix least-squares technique; the position and anisotropic parameters of all the non-hydrogen atoms were obtained. The Flack [12] absolute structure parameter = -0.01 (2). The crystal structure is therefore determined with the correct absolute configuration and all relevant tables and figures are based on this configuration. **Table 2** showed some crystal and refinement parameters. The crystal system of the title compound belongs to Monoclinic and the space group is P2₁, with cell parameters $a = 10.8567$ (11) Å, $b = 7.5479$ (7) Å, $c = 16.0391$ (16) Å, $\beta = 109.473$ (1)°. Atomic coordinates and displacement parameters of the compound were shown in **Table 3**, from these data the structure was gained, which was shown in **Figure 1**.

The bond distances and bond angles are in good agreement with the corresponding values obtained in case of 16 α -17-epoxy-4-pregnene-3, 20-dione [13]; 21-hydroxy-11 β ,18-oxido-4-pregnene-3,20-dione [14]; pregnenolone hemisuccinate [15]; and 17 α -acetoxy-6,7-epoxypregn-4-ene-3,20-dione [16]. Mean bond lengths for C(sp³)-C(sp³) and C(sp²) = O for compound **7** are 1.529 (7), 1.197 (7) Å, respectively.

In all essential details, the molecular geometry of **7** in terms of the bond lengths and angles are in good agreement with standard values. However, the C8-C9-C11, C12-C13-C17 and C14-C13-C18 bond angles of 113.5.1 (4), 118.7 (4) and 113.5 (4)° have been increased to minimize the steric interactions between the double bond at C4-C5 and the methyl groups at C10; and the interaction between the methyl group at C13 and the O atoms of the carbonyl oxygen atom at C17, respectively. The C20 carbonyl group eclipses C13-C17, the O3-C20-C17-C13 torsion angle is -2.8 (9)°. The molecule is comprised of a quadricyclic skeleton consisting of three six-membered rings (A, B and C) and one five-membered ring (D). The molecule consists of three six-membered rings and one five-membered ring, all *trans* fused. According to the torsion angles and the puckering-parameters values (ϕ_2 , θ_2 and Q) [17], the six-membered rings A ($\phi_2 = 3.21$ (0.88)°, $\theta_2 = 48.29$ (0.58)° and $Q = 0.470$ (0.005)); B ($\theta_2 = -154.70$ (1.05)°, $\theta_2 = 27.01$ (0.54)° and $Q = 0.484$ (0.004)); and C ($\phi_2 = -105.01$ (3.57)°, $\theta_2 = 8.51$ (0.50)° and $Q = 0.573$ (0.005)) occur in an envelope (¹E), deformed chair (¹C₄), and deformed chair (¹C₄)

Table 2. Crystal and refinement parameters.

Crystal system	Monoclinic
Unit cell dimensions	$a = 10.8567$ (11) Å $\alpha = 90.00$ deg $b = 7.54798$ (7) Å $\beta = 109.473$ (1) deg $c = 16.0391$ (16) Å $\gamma = 90.00$ deg
Volume	1239.1 (2) Å ³
Z, calculated density	2, 1.518 mg/m ³
Absorption coefficient	0.088 mm ⁻¹
Space group	<i>P</i> 2 ₁
F (000)	576
Limiting indices	$-13 \leq h \leq 13, -9 \leq k \leq 9, -19 \leq l \leq 19$
Reflections collected/unique	10200/4525 [R (int) = 0.0228]
Completeness to $\theta = 25.10$	99.9%
Max. and min. transmission	0.6183 and 0.8990
Data/restraints/parameters	4519/1/301
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0306, wR2 = 0.0618
R indices (all data)	R1 = 0.0355, wR2 = 0.0638
Absolute structure parameter	0.009 (3)
Goodness-of-fit on F ²	1.090
Extinction coefficient	None
Largest diff. peak and hole	0.327 and -0.262 e. Å ⁻³

conformations, respectively. Ring D occurs in a half chair conformation.

The absolute configurations of **7** for the chiral centers are 3*S*, 8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S* and 14*S*. The stereochemistry of the title compound is as follows: C8- β H is *trans* to C9- α H; C9- α H is *trans* to C10- β CH₃; C13- β CH₃ is *trans* to both C14- α H and C16-C17 epoxy ring.

Figure 2 shows the unit-cell packing arrangement for **7** along the *b*-axis. There are four intramolecular C-H \cdots O interactions, which are due to their length, and could be considered as significant ones [18] [C12 \cdots O3, C18 \cdots O3, C11 \cdots O5 [$-x + 1, +y + 1/2, -z + 1$], C21 \cdots O4 [$x + 1, +y, +z + 1$], C25 \cdots O3 [$-x, +y - 1/2, -z + 1$] 3.100 (7), 3.324 (8), 3.126 (14), 3.324 (6), 3.211 (8) Å; H2B \cdots O3, H18C \cdots O3, H11A \cdots O5, H21C \cdots O4, H25 \cdots O3 2.589 (4), 2.811 (5), 2.232 (12), 2.544 (3) Å, 2.501 (5) and C12-H2B \cdots O3, C18-H18C \cdots O3, C11-H11A \cdots O5, C21-H21C \cdots O4, C25-H25 \cdots O3 113.04 (37), 114.38 (37), 152.73 (44), 138.38 (14), 133.10 (31)°]. The molecules in the crystal are packed at normal van der Waals distances.

Table 4 shows the results for compound **7** in comparison to adriamycin which is used in chemotherapy. After castration, the weight of the male hamster prostates decreased ($p < 0.005$) as compared to that of the normal glands. Treatment with vehicle alone did not change this condition, whereas s.c. injections of 200 μ g of testosterone for 6 days significantly increased ($p < 0.005$) the weight of the prostate glands in castrated male hamsters (**Table 4**). When testosterone and finasteride were injected together, the weight of the prostate decreased ($p < 0.005$) as compared to testosterone-treated animals (**Table 5**). However, when the same experiment was carried out with compound **7**, the weight of the prostate significantly ($p < 0.005$) decreased.

The results from this study with six cancer cell lines and the weight of prostate's hamsters showed very clearly that compounds **7** is a much better inhibitor for the enzyme 5 α -reductase than the presently used Proscar **1** (finasteride).

Table 3. Atomic coordinates and displacement parameters (\AA^2).

	x	y	z	U11	U22	U33	U23	U13	U12
II	-0.9004 (3)	0.4839 (10)	-0.01368 (19)	0.078 (2)	0.137 (4)	0.118 (3)	0.008 (2)	0.0241 (12)	0.004 (2)
IIA	-0.90564 (19)	0.4840 (5)	-0.01653 (11)	0.0351 (13)	0.0534 (19)	0.0427 (18)	0.0068 (10)	0.0069 (7)	0.0078 (10)
O1	-0.2276 (3)	0.3942 (5)	0.1453 (2)	0.0478 (18)	0.097 (3)	0.0488 (19)	0.0121 (17)	0.0062 (16)	-0.0031 (17)
O2	0.0196 (3)	0.0022 (7)	0.3744 (2)	0.0655 (17)	0.049 (2)	0.082 (2)	-0.001 (3)	0.0054 (16)	-0.013 (3)
O3	0.6075 (5)	0.7777 (7)	0.7225 (3)	0.092 (3)	0.098 (3)	0.075 (3)	-0.015 (3)	0.004 (2)	-0.033 (3)
O4	-0.2386 (3)	0.4688 (12)	0.0086 (2)	0.0625 (18)	0.136 (4)	0.0583 (19)	0.023 (4)	0.0176 (16)	0.013 (4)
O5	0.6222 (8)	0.3676 (15)	0.6569 (7)	0.063 (5)	0.132 (8)	0.120 (8)	-0.027 (7)	0.001 (6)	0.010 (5)
C1	0.0849 (5)	0.5963 (7)	0.2856 (3)	0.061 (3)	0.065 (3)	0.060 (3)	0.012 (3)	0.012 (3)	-0.008 (3)
C2	-0.0455 (6)	0.5917 (9)	0.2102 (4)	0.071 (4)	0.070 (4)	0.056 (4)	0.014 (3)	0.007 (3)	-0.001 (3)
C3	-0.0835 (5)	0.4063 (8)	0.1771 (3)	0.045 (3)	0.085 (4)	0.045 (3)	0.003 (3)	0.010 (2)	-0.004 (3)
C4	-0.0383 (4)	0.2663 (8)	0.2466 (3)	0.044 (3)	0.060 (3)	0.056 (3)	-0.005 (2)	0.015 (2)	0.000 (2)
C5	0.0411 (4)	0.2954 (6)	0.3296 (3)	0.035 (2)	0.052 (3)	0.048 (3)	0.000 (2)	0.016 (2)	0.0014 (19)
C6	0.0825 (4)	0.1383 (6)	0.3883 (3)	0.045 (2)	0.047 (3)	0.057 (3)	-0.005 (2)	0.018 (2)	0.001 (2)
C7	0.2091 (4)	0.1541 (6)	0.4638 (3)	0.046 (2)	0.046 (3)	0.057 (3)	0.000 (2)	0.013 (2)	-0.001 (2)
C8	0.2347 (4)	0.3358 (6)	0.5056 (3)	0.038 (2)	0.046 (3)	0.050 (3)	-0.001 (2)	0.013 (2)	0.002 (2)
C9	0.2227 (3)	0.4748 (10)	0.4349 (2)	0.0448 (18)	0.044 (2)	0.0488 (19)	-0.004 (3)	0.0147 (16)	-0.008 (3)
C10	0.0841 (3)	0.4802 (10)	0.3639 (2)	0.0436 (18)	0.046 (2)	0.0474 (19)	0.004 (4)	0.0133 (16)	0.007 (4)
C11	0.2686 (6)	0.6606 (7)	0.4732 (4)	0.070 (4)	0.050 (3)	0.074 (4)	0.008 (3)	-0.003 (3)	-0.010 (3)
C12	0.4028 (6)	0.6589 (8)	0.5450 (4)	0.058 (3)	0.056 (3)	0.064 (3)	-0.001 (3)	0.002 (3)	-0.012 (3)
C13	0.4064 (4)	0.5297 (6)	0.6180 (3)	0.045 (2)	0.049 (4)	0.055 (3)	-0.007 (2)	0.014 (2)	-0.005 (2)
C14	0.3719 (5)	0.3461 (7)	0.5744 (3)	0.045 (3)	0.054 (3)	0.049 (3)	0.001 (2)	0.019 (2)	0.000 (2)
C15	0.4207 (6)	0.2153 (8)	0.6506 (4)	0.069 (3)	0.077 (4)	0.069 (4)	0.011 (3)	0.002 (3)	-0.003 (3)
C16	0.5413 (6)	0.3080 (10)	0.7084 (4)	0.058 (4)	0.107 (6)	0.061 (4)	0.012 (3)	0.007 (3)	-0.005 (3)
C17	0.5377 (4)	0.4865 (14)	0.6877 (3)	0.050 (2)	0.081 (3)	0.052 (2)	-0.006 (5)	0.0121 (18)	0.006 (5)
C18	0.3153 (5)	0.5886 (9)	0.6694 (4)	0.061 (3)	0.116 (5)	0.074 (4)	-0.034 (3)	0.018 (3)	0.002 (3)
C19	-0.0173 (5)	0.5492 (7)	0.4041 (3)	0.054 (3)	0.059 (3)	0.069 (3)	-0.005 (2)	0.013 (2)	0.010 (2)
C20	0.6320 (6)	0.6235 (10)	0.7383 (3)	0.058 (3)	0.097 (5)	0.047 (3)	-0.005 (3)	0.017 (3)	-0.018 (3)
C21	0.7575 (5)	0.5635 (10)	0.8054 (4)	0.055 (3)	0.140 (7)	0.062 (3)	0.000 (3)	0.007 (3)	-0.024 (3)
C22	-0.2920 (5)	0.4382 (7)	0.0610 (3)	0.060 (3)	0.065 (5)	0.050 (3)	0.015 (2)	0.012 (2)	0.004 (2)
C23	-0.4351 (4)	0.4442 (6)	0.0434 (3)	0.051 (2)	0.057 (5)	0.047 (2)	0.008 (2)	0.0078 (19)	0.001 (2)
C24	-0.4870 (5)	0.4457 (10)	0.1114 (3)	0.059 (3)	0.104 (7)	0.045 (2)	0.005 (3)	0.007 (2)	0.000 (3)
C25	-0.6198 (5)	0.4574 (11)	0.0934 (3)	0.059 (3)	0.097 (6)	0.053 (2)	0.010 (3)	0.018 (2)	0.006 (4)
C26	-0.7023 (4)	0.4660 (11)	0.0076 (3)	0.055 (2)	0.054 (3)	0.059 (2)	0.007 (3)	0.011 (2)	0.003 (3)
C27	-0.6519 (5)	0.4670 (14)	-0.0604 (3)	0.064 (3)	0.092 (5)	0.050 (2)	0.004 (4)	0.007 (2)	0.007 (5)
C28	-0.5195 (5)	0.4571 (11)	-0.0426 (3)	0.061 (3)	0.088 (6)	0.050 (2)	0.006 (3)	0.014 (2)	0.015 (4)

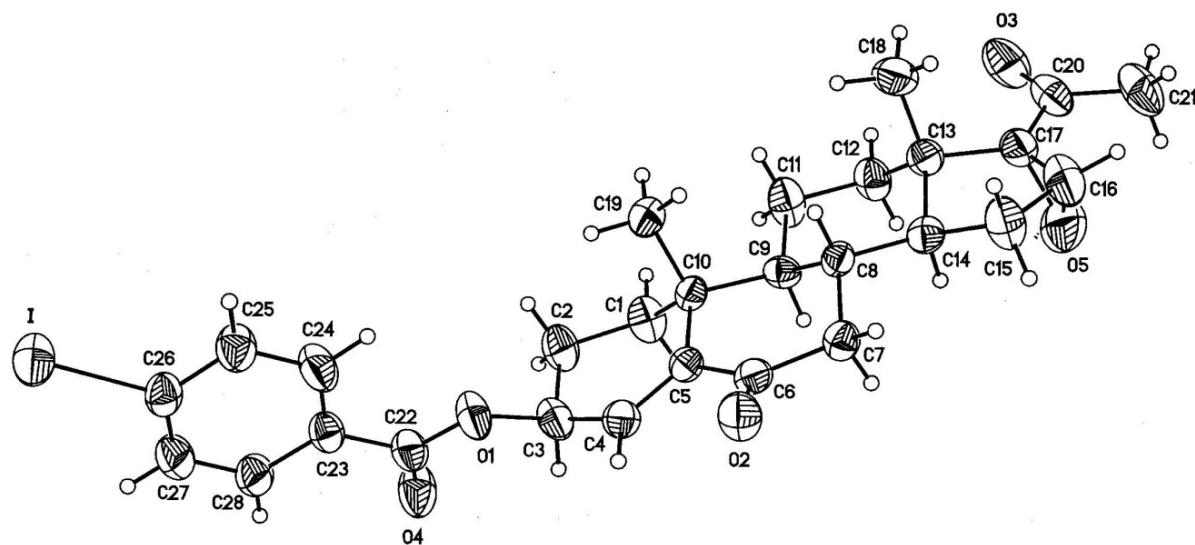


Figure 1. The molecular structure of **7**.

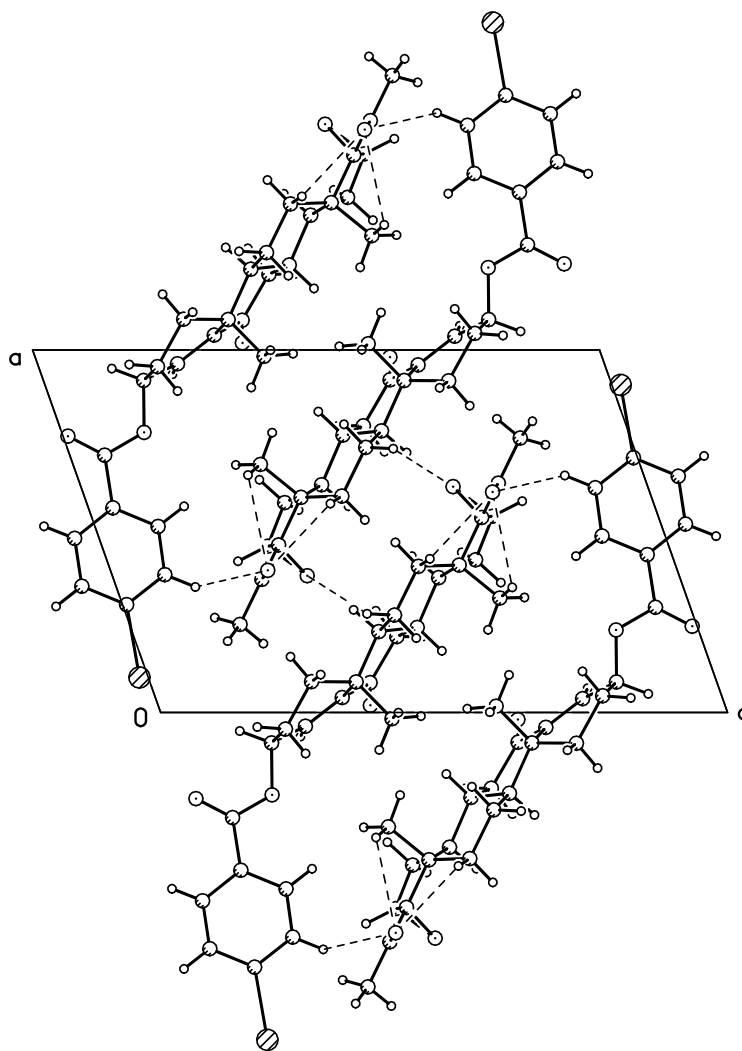


Figure 2. The packing diagram for **7** projected along the *b*-axis.

Table 4. Effect of *in vitro* screening of compound 7 and adriamycin against six human cancer cell lines.

Compound	PC-3	MCF-7	U251	K562	HCT-15	SKLU-1
Adriamycin	56.11 ± 4.28	82.63 ± 4.56	94.63 ± 2.28	95.29 ± 3.0	73.91 ± 6.45	81.34 ± 4.74
7	64.1 ± 28	100	49.7 ± 13.9	56.5 ± 6.4	67.3 ± 4.8	70.4 ± 23.4

Table 5. Effect of *in vivo* of the synthesized steroid 7 and finasteride on the weight of prostate's hamsters.

Treatment	Weight of seminal vesicles
Control 1	139 ± 14.1
T	248.7 ± 67.1
T + finasteride	195.5 ± 32.9
T + 7	168.2 ± 13.5

4. Conclusion

In this paper, the conformation of 3β -(*p*-iodobenzoyloxy)- $16\alpha,17\alpha$ -epoxypregn-4-en-6,20-dione **7** was synthesized, and characterized by spectroscopic methods and its structure determined. X-ray diffraction analysis of (**7**) demonstrated that it consisted of four rings, three six-membered rings (A, B and C) and one five-membered ring (D). A, B, C and D rings occur in an envelope, deformed chair, deformed chair, and half chair conformations, respectively. The absolute configurations of **7** for the chiral centers are 3S, 8S, 9S, 10R, 13S and 14S. The crystal of 3β -(*p*-iodobenzoyloxy)- $16\alpha,17\alpha$ -epoxypregn-4-en-6,20-dione is in monoclinic crystal system with space group $P2_1$, lattice constants: $a = 10.8567$ (11), $b = 7.5479$ (7), $c = 16.0391$ (16) Å, $\beta = 109.473(1)^\circ$, $V = 1239.1$ (2) Å³, $D_x = 1.518$ g/cm³ and $Z = 2$. The molecules in the crystal are stabilized by C-H...O interactions and van der Waals forces. Compound **7** has a high inhibitory activity for the enzyme 5α -reductase with a good probability to be used in the future for the treatment of androgen dependent diseases.

References

- [1] Stankov, A., Bargallo-Rocha, J.E., Ñamendis-Silva, S., Ramirez, M.T., Stankova-Ninova, K. and Meneses-Garcia, A. (2012) Prognostic Factors and Recurrence in Breast Cancer: Experience at National Cancer Institute of Mexico. *ISRN Oncology*, **2012**, 1-7. <http://dx.doi.org/10.5402/2012/825258>
- [2] Sutcliffe, S. and Colditz, G. (2013) Prostate Cancer: Is It Time to Expand the Research Focus to Early-Life Exposures? *Nature Reviews Cancer*, **3**, 208-218. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3434>
- [3] Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2013) Cancer Statistics, 2013. *Cancer Journal for Clinicians*, **63**, 11-30. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21166>
- [4] Machetti, F. and Guarna, A. (2012) Novel Inhibitors of 5α -Reductase. *Expert Opinion on Therapy Patents*, **12**, 201-215. <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.12.2.201>
- [5] Rick, F.G., Saadat, S.H., Szalontay, L., Block, N.L., Kazzazi, A., Djavan, B. and Schally, A.V. (2013) Hormonal Manipulation of Benign Prostatic Hyperplasia. *Current Opinion in Urology*, **23**, 17-24. <http://dx.doi.org/10.1097/MOU.0b013e32835abd18>
- [6] Flores, E., Bratoeff, E., Cabeza, M., Ramirez, E., Quiroz, A. and Heuze, I. (2003) Steroid 5α -Reductase Inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **3**, 225-237. <http://dx.doi.org/10.2174/1389557033488196>
- [7] Bratoeff, E., García, P., Heuzeb, Y., Soriano, J., Mejía, A., Labastida, A.M., Valencia, N. and Cabeza, M. (2010) Molecular Interaction of Progesterone Derivatives with 5α -Reductase Type 1 and 2 and Androgen Receptors. *Steroids*, **75**, 499-505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2010.03.006>
- [8] Bratoeff, E., Zambrano, A., Heuze, I., Palacios, A., Ramirez, D. and Cabeza, M. (2010) Synthesis and Biological Activity of Progesterone Derivatives as 5α -Reductase Inhibitors, and Their Effect on Hamster Prostate Weight. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **25**, 306-311. <http://dx.doi.org/10.3109/14756360903179401>
- [9] Martínez, R., Avila, J.G., Ramírez, M.T., Pérez, A. and Martínez, A. (2006) Tetrahydropyrrol[3,2-c]Azepin-4-Ones as a New Class of Cytotoxic Compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 4007-4016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2006.02.012>

- [10] Bruker (2009) APEX2, SAINT and SADABS. Bruker AXS Inc., Madison.
- [11] Sheldrick, G.M. (2008) A Short History of SHELX. *Acta Crystallographica*, **A64**, 112-122. <http://dx.doi.org/10.1107/S0108767307043930>
- [12] Flack, H.D. (1983) On Enantiomorph-Polarity Estimation. *Acta Crystallographica*, **A39**, 876-881. <http://dx.doi.org/10.1107/S0108767383001762>
- [13] Goubitz, K., Schenk, H. and Zeelen, F.J. (1984) Conformational-Analysis of 20-Keto Steroids—Single-Crystal X-Ray Structure-Analysis of 16-Alpha, 17-Epoxy-4-Pregnene-3,20-Dione. *Steroids*, **44**, 153-158. [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X\(84\)90081-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-128X(84)90081-3)
- [14] Duax, W.L., Griffin, J.F., Strong, P.D., Funder, J.W. and Ulick, S. (1982) Molecular-Structure of 18-Deoxyaldosterone and Its Relationship to Receptor-Binding and Activity. *Journal of the American Chemical Society*, **104**, 7291-7293. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00389a063>
- [15] Bernes, S., Torrens, H., Lopez-Giral, A. and Buttenklepper, A. (2003) Pregnenolone Hemisuccinate: A P1 Structure with $Z' = 4$. *Acta Crystallographica*, **E59**, o1372-o1375. <http://dx.doi.org/10.1107/S160053680301835X>
- [16] Soriano-Garcia, M., Zambrano, A., Cabeza, M. and Bratoeff, E. (2009) Crystal Structure and Synthesis of 17 α -Acetoxy-6,7-Epoxy-4-Pregn-3,20-Dione. *The Japan Society for Analytical Chemistry*, **25**, 61-62.
- [17] Cremer, D. and Pople, J.A. (1975) General Definition of Ring Puckering Coordinates. *Journal of the American Chemical Society*, **97**, 1354-1358. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00839a011>
- [18] Desiraju, G.R., Kashino, S., Cooms, M.M. and Glusker, J.P. (1993) C-HO Packing Motifs in Some Cyclopenta[a]Phenanthrenes. *Acta Crystallographica*, **B49**, 880-892. <http://dx.doi.org/10.1107/S0108768193001703>

Supplementary Materials

CCDC-932617 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/cgi-bin/catreq.cgi, by e-mailing data_request@ccdc.cam.ac.uk, or by contacting The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK, fax: +44(0)1223-336033.

Effect of two Antiandrogens as Protectors of Prostate and Brain in a Huntington's Animal Model

David Calderón Guzmán¹, Eugene Bratoeff², Alejandra Chávez Riveros², Norma Osnaya Brizuela¹, Gerardo Barragán Mejía¹, Ernestina Hernández García³, Hugo Juárez Olguín^{3,*} and Edna García Cruz¹

¹Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Pediatría (INP), México; ²Laboratorio de Química Farmacéutica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México; ³Laboratorio de Farmacología, INP, Facultad de Medicina, UNAM, México

Abstract: The purpose of this work is to know the effect of flutamide and a novel synthetic steroid 3 β -p-Iodobenzoxyloxyprogesterone-4,16-diene-6,20-dione (IBP) on the levels of dopamine, 5-HIAA (5-hydroxyindole acetic acid), and some oxidative stress markers in animal model with Huntington disease. Thirty male Wistar rats divided in groups of 6 animals each were subjected to the following treatment: group A, 3-nitro propionic acid (3-NPA, as inducer of Huntington); group B, flutamide; group C, 3-NPA + flutamide; group D, IBP; and group E, 3-NPA + IBP. Treatment scheme for all groups were at 4 mg/kg/day administered intraperitoneally. The measurement of haemoglobin was carried out from blood while the concentrations of ATPase, 5 α -reductase, reduced glutathione (GSH), calcium, H₂O₂, 5-HIAA, and dopamine were determined from brain and prostate tissues using validated methods. The results depicted a significant decrease of dopamine and GSH in cerebellum/Medulla oblongata of animals treated with IBP. The prostate gland of the same group of treatment also showed a significant decrease in the concentrations of TBARS, H₂O₂, and total ATPase. In hemispheres of groups D and E, dopamine, H₂O₂, and total ATPase decreased significantly while in prostate, hemispheres, and cerebellum/Medulla oblongata of groups B and C; calcium, 5 α -reductase, ATPase, H₂O₂, and TBARS were found to witness a significant decrease. Results showed an antiandrogenic activity of flutamide, while the novel steroid IBP showed neuroprotective properties by changes on oxidative stress biomarkers as critical pathways leading to prostate and brain degeneration. Probably steroid homeostasis disequilibrium could have led to alterations in dopamine metabolism GSH in Huntington's disease animal models.

Keywords: Brain, oxidative biomarkers, prostate, rat, synthetic steroid.

INTRODUCTION

Antagonist drugs that act as androgen receptor (AR) have proven to be useful in the early control of prostate cancer. Antiandrogens can be natural substances [1], but also, there is a synthetic version that is usually employed in treating prostate gland hyperplasia and cancer as well as other androgen-dependent conditions [2]. Drug development for the treatment of androgen-dependent diseases [3], should aim at successful remission of prostate cancer. Such drugs should not only inhibit 5 α -reductase enzyme whose principal function is the transformation of testosterone to dihydrotestosterone (DHT), but also inhibition of 17-hydroxylase as well as C17, 20 lyase enzymes [4]. It has been proved that testosterone and DHT share similar receptor and that testosterone does not reduce the action of DHT. In fact, DHT increases androgenic effect due to its greater affinity to androgenic receptors [5]. Locally, androgenic effect can be enhanced when testosterone is converted to DHT by redox action of 5-reductase enzyme. However, poor androgenic effect could be the end result of this kind of enhancement in tissues where the amount of testosterone is small nevertheless, in DHT-dependent tissues, this could mean a lot.

Recent studies suggest that hormone therapy affects prostate cancer patients and confirm the association between hormone therapy and anxiety/depression [6]. Indeed, disequilibrium in steroid homeostasis could have prejudiced the signaling of 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) as main metabolite of serotonin, and dopamine (DA).

Tourette syndrome (TS) pathogenesis believed to deregulate DA and other neurotransmitters signaling, leads to disequilibrium in excitation/inhibition of cortico-striato-thalamocortical circuits [7]. On this basis, any effort to secure a new synthetic compound, capable of reducing the levels of DHT without provoking adverse side effects on male sexual characteristics induced by testosterone, would be therapeutically valuable [8]. Likewise, the same strategy may offer benefits in regulating dopaminergic and serotonergic metabolisms. Nevertheless, the mechanisms of these effects still remain unknown. Excitotoxicity-linked neurological disorders suggest a great increase in the concentrations of intracellular Ca²⁺ cation, the consequence of which is elevation of reactive oxygen species (ROS) as well as reactive nitrogen species (RNS) by lethal pathways [9]. In this neurodegenerative disorders, there are alterations in mitochondrial ultrastructure and DNA damage due to oxidative stress provoked by nitric oxide anion (NO) [10]. This damage is the primary event in 3-nitropropionic acid (3-NPA) toxicity which in female Wistar rats induce neurodegeneration. This effect in rats has been used as a way to obtain a good model of Huntington's disease [11].

Also, another neuromodulator is nitric oxide which in a small amount provokes oxidative stress damage or forms nitroso-glutathione (NOGSH) in the cells [12]. GSH has been reported as the main regulator of redox equilibrium for tissue protections against the action of free radicals [13]. The action of free radicals on cell components especially plasma membrane lipids is fatalistic [14, 15]. This particularly constitute a greater danger for the central nervous system (CNS) which is highly susceptible to free radicals and so, extremely depends on the presence of antioxidants. Plasma membrane phospholipids in brain and structural proteins in the lipid bilayer have a close contact [16], where the ionic interchange are maintained by Na⁺K⁺ATPase through the stimulation of Na⁺ and K⁺ flows [17]. Inhibition of the activities of Na⁺ and K⁺ would lead to the release of excitatory amino acids in CNS [18]. The above

*Address correspondence to this author at the Laboratorio de Farmacología, Instituto Nacional de Pediatría, Av Imán #1, 3er piso, Col Cuicuilco, CP 04530, Mexico City, Mexico; Tel/Fax: 5255 1084 3883; E-mails juarezol@yahoo.com, adrianos27@hotmail.com

analysis leads us to derive the purpose of the present paper which compares the action of flutamide and novel synthetic steroids (3 β -p-Iodobenzoyloxyprogesteran-4,16-diene-6,20-dione) (IBP) on the levels of dopamine, 5-HIAA, and selected markers of oxidative stress in prostate and brain of young rats.

MATERIAL AND METHODS

Adult male 10 weeks old Wistar rats of with a weight of 300 \pm 20 g were procured from Bioterium of Metropolitan University of Mexico City and housed in hygienically well maintained cages of plastic in groups of 6 animals per cage. A one-day acclimatization period to the room environment was permitted to the animals after which the cages of animals were transferred to a mass-air displacement room under 12-h light-dark cycle, temperature of 22 \pm 2°C and relative humidity of 50 \pm 10%. The animals were maintained with a balanced diet and were freely given access to pure water. For drug administration, animals were divided into five treatment groups as follows: Group A, 3-nitro propionic acid (3-NPA); group B, flutamide; group C, 3-NPA + flutamide; group D, 3 β -p-Iodobenzoyloxyprogesteran-4,16-diene-6,20-dione (IBP); and group E, 3-NPA + IBP. All drug administration was done intraperitoneally at 4 mg/kg/day for 5 days. on the last day of administration (30 min after receiving the drugs), the animals were sacrificed with guillotine. At the moment of sacrifice, blood was obtained and used to measure the levels of haemoglobin. The extraction of brain and prostate gland was also done immediately after sacrifice and immersed in 0.9% of saline solution at a temperature of 4°C. Sagittal dissection of the brain was carried out and the left hemisphere (left-side slice) was used to assess ATPase and H₂O₂ after homogenization in TRIS-HCL at 0.05M and pH 7.4 in 5 volumes. The right hemisphere was used to evaluate reduced glutathione (GSH), dopamine, 5-HIAA, and calcium concentrations after homogenization in perchloric acid (HClO₄) at 0.1M in 5 volumes. Animal handling was under strict compliance with the Guidelines for Ethical Control and Supervision as outlined in the legal disposition for Laboratory animal care and use.

Prostate obtainment and animal management was strictly in adherence to the ethical principles and international guidelines as well as Mexican Guidelines ZOO-062 for the use and care of laboratory animals.

Following the sacrifice of the animals, they were ventrally positioned and an incision through the infra-supra umbilical plane on the abdomen wall was carried out. The urinary bladder was exposed and the prostate gland was excised from the base. This was weighed and homogenized using ultrasonic sonicator (Vibra Cell, Sonic and Materials Inc. USA) with three 5- second lapses at 60 Htz, and then stored at -20°C until analyzed.

Measurement of Blood Haemoglobin

The measurement of haemoglobin was carried out at the end of treatment. Two blood samples (20 μ l) were withdrawn from tail-end without anticoagulant and placed on a dichromate solution and read. The concentration was reported in mg/dl [19].

Measurement of Dopamine (DA)

From the supernatant of HClO₄ homogenized tissues centrifuged at 9,000 rpm for 10 min in a microcentrifuge (Hettich Zentrifugen, model Mikro 12-42, Germany), the measurement of DA levels was carried out with the technique of Calderon *et al.*, [20]. For this, an aliquot of the supernatant of HClO₄ homogenized tissues and 1.9 ml of buffer (0.003M octyl-sulphate, 0.035M KH₂PO₄, 0.03M citric acid, 0.001M ascorbic acid) were taken and inserted in a test tube and mixed. A 5 min incubation of this at a room temperature in total darkness was done and the reading of the samples was carried out in a spectrofluorometer (Perkin Elmer LS

55, England) with 282 nm excitation and 315 nm emission lengths. The FL Win Lab version 4.00.02 software was used. For the calculation of the values, a curve previously standardized was employed and this was reported in nMoles/g of wet tissue.

5-Hydroxyindole Acetic Acid (5-HIAA) Measurement

The HClO₄ homogenized tissue supernatant centrifuged at 9,000 rpm for 10 min in a microcentrifuge (Hettich Zentrifugen, model Mikro 12-42, Germany), was employed for the measurement of 5-HIAA levels using Beck *et al.* technique [21] with necessary modifications. HClO₄ supernatant aliquot and 1.9 ml acetate buffer 0.01M pH 5.5 were mixed in a test tube and incubated at a room temperature for 5 min in a total darkness. A spectrofluorometer (Perkin Elmer LS 55, England) with 296 nm excitation and 333 nm emission lengths was used to read the samples. The statistical analysis of the sample values was carried out using FL Win Lab version 4.00.02 software while the calculation was done by employing a curve that was previously standardized. The report of the values was made in nMoles/g wet tissue.

Measurement of Reduced Glutathione (GSH)

From the perchloric acid supernatant homogenized tissue resulting from a 5 min centrifugation at 9000 rpm (Mikro 12-42, Germany centrifuge) was used to measure GSH employing Hissin and Hilf [22] method after some modifications. In a test tube, a mixture of 1.8 mL phosphate buffer pH 8.0 with EDTA 0.2%, 20 μ L of the supernatant aliquot, and 100 μ L of ortho-phthaldehyde (OPT) 1mg/mL in methanol was made. This was subjected to 15 min incubation at room temperature in absolute darkness. The reading was carried out in a spectrophotometer (PERKIN ELMER LS 55) with excitation and emission wavelengths of 350 and 420nm, respectively. The statistical analysis of the sample values was carried out using FL Win Lab version 4.00.02 software while the calculation was done by employing a curve that was previously standardized. The report of the values was made in nMoles/g wet tissue.

Calcium Measurement

Calcium measurements were carried out with Ca-Color III AA direct colorimetric method kit (Wiener Lab Rosario, Argentina) using brain homogenate supernatant liquid for all groups of animals. Internal standard was used in obtaining the concentration and the values were expressed in mg/g wet tissue.

Total ATPase Measurement

The assay of ATPase action was carried out employing a method put forward by Calderón *et al.* [23]. 15 min incubation in 3mM MgCl₂, 7mM KCl and 100mM NaCl solution of 1 mg (10%) w/v of homogenized brain tissue in tris-HCl 0.05M pH 7.4 was carried out. To this incubated mixture, 4 mM tris-ATP was added and was subjected to others 30 min incubation at 37°C in a shaking water bath (Dubnoff Labconco). 100 μ L 10% trichloroacetic acid w/v was used to stop the reaction, following this, samples were centrifuged for 5 min at 100 g under a temperature of 4°C. Inorganic phosphate (Pi) was measured in duplicates using one supernatant aliquot as proposed by Fiske and Subarow [24] and the reading of the absorbance was made at 660 nm in a Helios- α , UNICAM spectrophotometer and expressed as μ M Pi/g wet tissue per minute.

Measurement of 5 α -Reductase Activity

The enzymatic activity was determined in 1mg of protein with the supernatant of prostate or rat brain regions, homogenized in tris-HCl 0.05M, and incubated at 37°C with final concentrations of NADPH (0.8mM) and testosterone (4mM) under a shaking water

Table 1. Hemoglobin levels of rats treated with flutamide and 3 β -p-Iodobenzoyloxypregnan-4,16-diene-6,20-dione (IBP) in presence of 3-nitro propionic acid (3-NPA).

Group	mg/dL \pm SD
3-NPA	31.45 \pm 11
Flutamide	24.35 \pm 7*
3-NPA+Flutamide	28.51 \pm 9
IBP	37.74 \pm 5
3-NPA+IBP	30.38 \pm 6

Average values \pm SD. Kruskal-Wallis test. Flutamide vs IBP *p = 0.04

bath. Decrease in absorbance was monitored at 340nm (NADPH) for 30minutes in a Helios- α , UNICAM spectrophotometer [25].

H₂O₂ Measurement

The determination of H₂O₂ was made using the modified technique of Asru [26]. Each brain region (cortex, hemispheres, cerebellum/medulla oblongata) was homogenized in 3 ml tris-HCl 0.05M pH 7.4 buffer. 1ml of potassium dichromate solution (K₂Cr₂O₇) and anhydride acetic acid were mixed with 100 μ l of the diluted homogenate and heated to boiling point for 5 min (Thermomix 1420). A 5-min ice bath of the samples was done followed by a centrifugation of 5 min duration at 3000 g (Sorvall RC-5B Dupont). The reading of the floating absorbance was done in triplicate at 570nm in a spectrophotometer (Helios- α , UNICAM). H₂O₂ concentration was reported in μ Moles.

Statistical Analysis

Kruskal-Wallis and ANOVA tests with their corresponding contrasts as well as previous variance homogeneity comparison were employed in the statistical analysis. Values of p<0.05 were

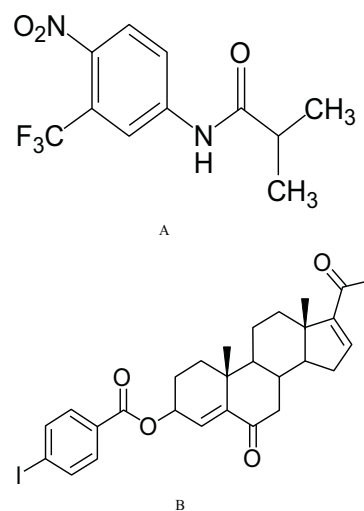


Fig. (1). Chemical structures. **1A:** Flutamide, **1B:** 3 β -p-Iodobenzoyloxypregnan-4,16-diene-6,20-dione.

considered statistically significant [27]. A software of JMP Statistical Discovery from SAS, version 8.0.0 was used.

RESULTS

Table 1 presents haemoglobin levels of rats treated with flutamide and 3 β -p-Iodobenzoyloxypregnan-4,16-diene-6,20-dione (IBP) in presence of 3-nitro propionic acid (3-NPA). Chemical structures of IBP and flutamide appear in Fig. 1. Animal groups treated with flutamide showed significant changes (p = 0.03) when compared with those treated with 3 β -p-Iodobenzoyloxypregnan-4,16-diene-6,20-dione. Fig. 2 shows dopamine levels. In cortex and hemispheres of animals that received flutamide in combination with 3-NPA and IBP plus 3-NPA, the level was found to increase significantly (p=0.01). However, an opposite effect in its level was

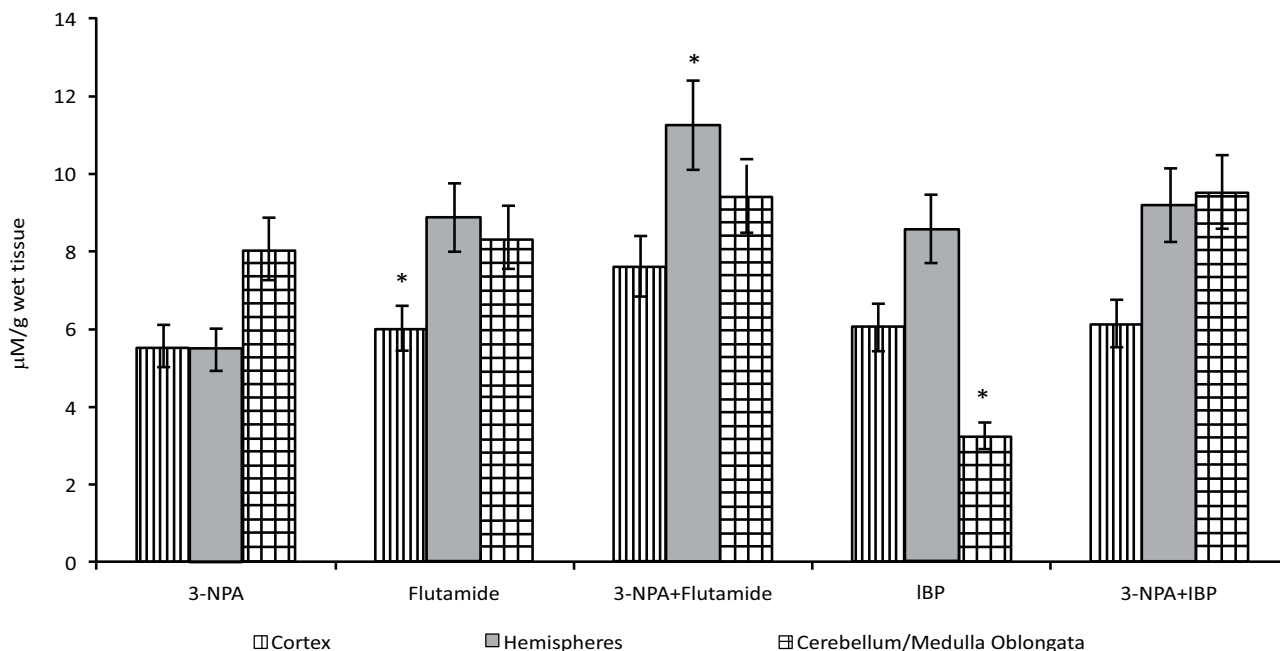


Fig. (2). Dopamine levels in brain regions of rats treated with flutamide and 3 β -p-Iodobenzoyloxypregnan-4,16-diene-6,20-dione (IBP) in presence of 3-nitro propionic acid (3-NPA). Kruskal-Wallis test and ANOVA test.

Cortex: Flutamide + 3-NPA vs 3-NPA, flutamide. *p = 0.01

Hemispheres: Flutamide + 3-NPA vs 3-NPA, IBP, 3-NPA + IBP, flutamide. *p = 0.01

Cerebellum/Medulla oblongata: IBP vs Flutamide + 3-NPA, flutamide, 3-NPA, 3-NPA + IBP. *p = 0.011

seen in cerebellum/medulla oblongata regions in the same groups of animals.

In Fig. 3, the levels of 5-HIAA is shown. It could be found that the administration of flutamide plus 3-NPA and IBP with 3-NPA showed slight but non-significant increase in animal brains of flutamide group. Fig. 4 is the levels of GSH in animals that received the same treatment (Flutamide + 3-NPA or IBP + 3-NPA) showing that GSH levels witnessed a significant increase ($p=0.006$) in hemispheres and cerebellum/Medulla oblongata regions in

animal groups treated with flutamide or IBP combined with 3-NPA with respect to control group.

Fig. 5 depicts the level of lipid peroxidation in brain and prostate of animals that received flutamide with 3-NPA or IBP with 3-NPA. The level of this activity in cortex, hemisphere, and cerebellum/medulla oblongata showed a significant increase ($p<0.02$). Contrary to this, there was a significant decrease ($p<0.02$) of this activity in prostate gland when compared with the control group.

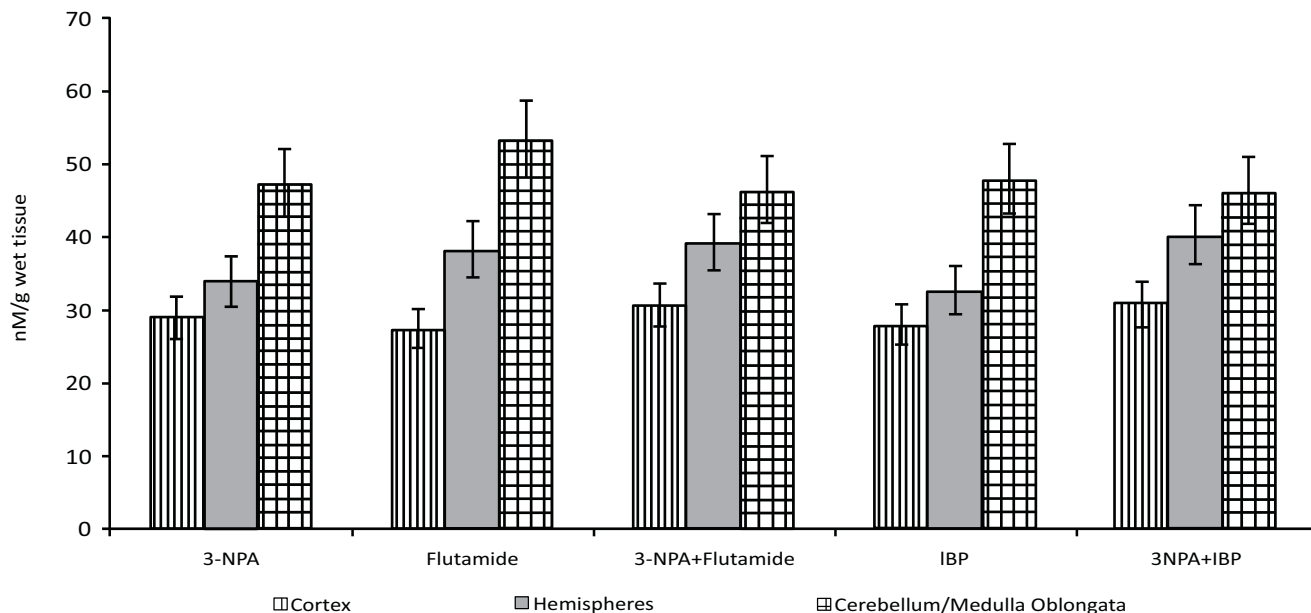


Fig. (3). 5-HIAA levels in brain regions of rats treated with flutamide and 3β -*p*-Iodobenzoyloxyprogesterone-4,16-diene-6,20-dione (IBP) in presence of 3-nitro propionic acid (3-NPA). Kruskal-Wallis test and ANOVA test. Non significant.

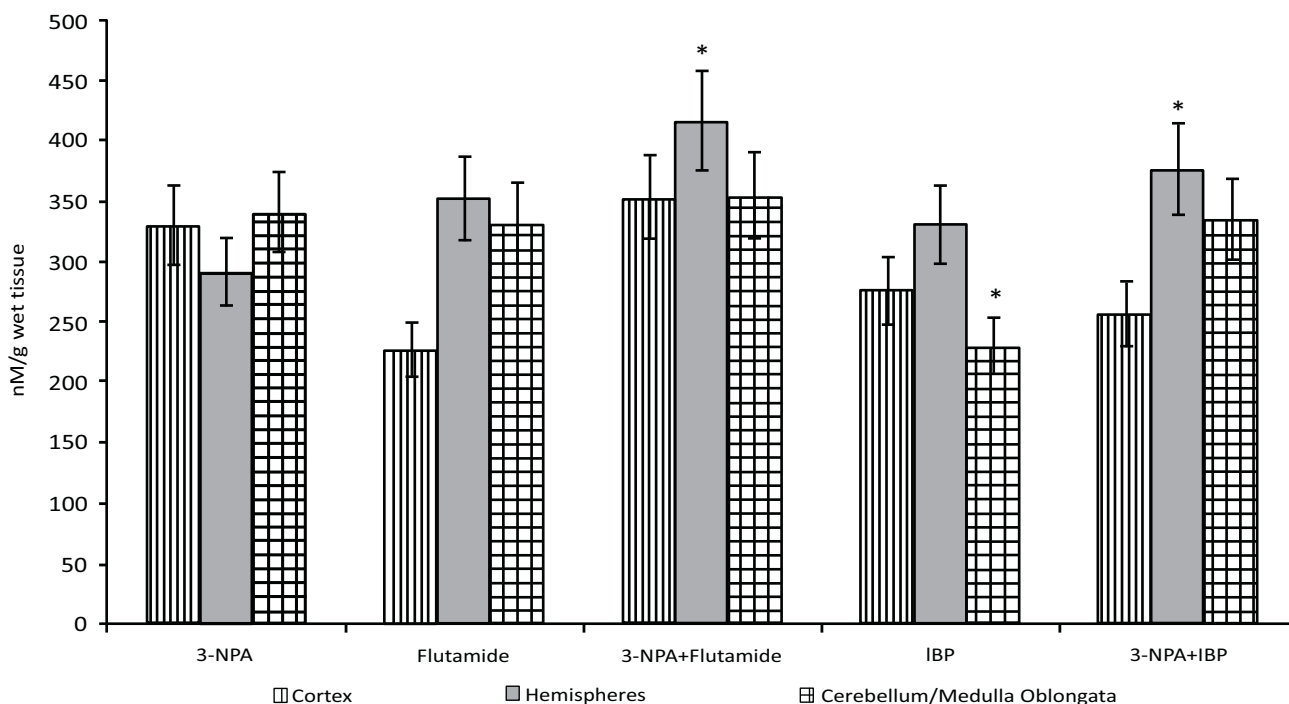


Fig. (4). GSH levels in brain regions of rats treated with flutamide and 3β -*p*-Iodobenzoyloxyprogesterone-4,16-diene-6,20-dione (IBP) in presence of 3-nitro propionic acid (3-NPA). Kruskal-Wallis test and ANOVA test.

Hemispheres: 3-NPA vs 3-NPA + IBP, 3-NPA + flutamide. * $p = 0.04$

Cerebellum/Medulla oblongata: IBP vs flutamide + 3-NPA, 3-NPA, 3-NPA + IBP, flutamide. * $p = 0.001$

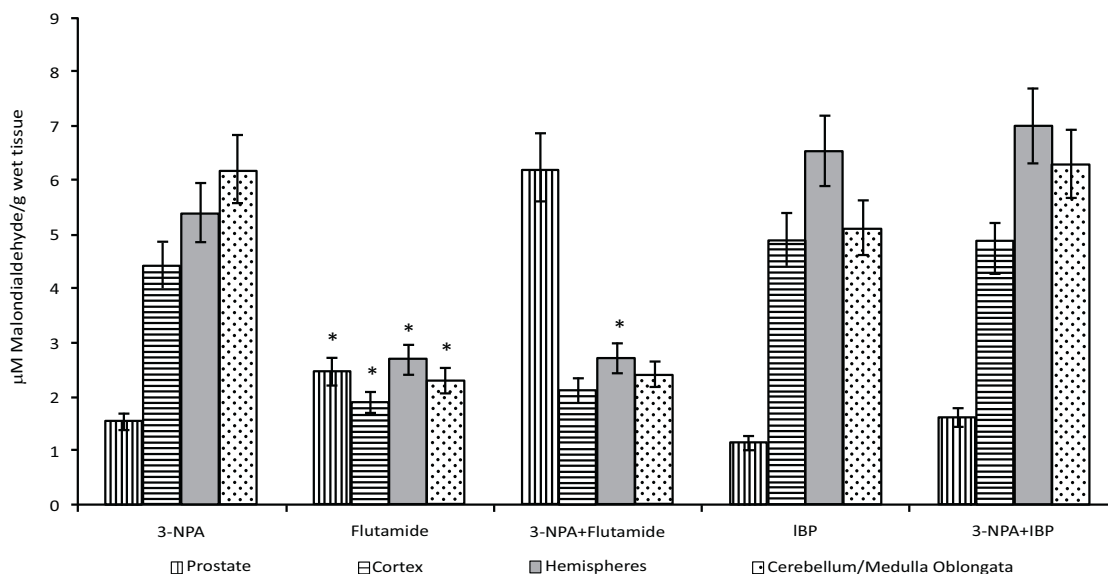


Fig. (5). Lipid peroxidation levels in brain regions and prostate of rats treated with flutamide and 3β -*p*-Iodobenzoyloxyprogren-4,16-diene-6,20-dione (IBP) in presence of 3-nitro propionic acid (3-NPA). Kruskal-Wallis test and ANOVA test.

Prostate: IBP vs flutamide, flutamide + 3-NPA. * $p = 0.02$

Cortex: Flutamide + 3-NPA vs IBP, 3-NPA, 3-NPA + IBP. * $p = 0.025$

Flutamide vs IBP, 3-NPA, 3-NPA + IBP. * $p = 0.02$

Hemispheres: 3-NPA + IBP vs Flutamide, flutamide + 3-NPA, 3-NPA. * $p = 0.01$

IBP vs flutamide, flutamide + 3-NPA. * $p = 0.01$

3-NPA vs flutamide, flutamide + 3-NPA. * $p = 0.003$

Cerebellum/Medulla oblongata: Flutamide vs 3-NPA + IBP, 3-NPA, IBP. * $p = 0.001$

Flutamide + 3-NPA vs 3-NPA + IBP, 3-NPA, IBP. * $p = 0.001$

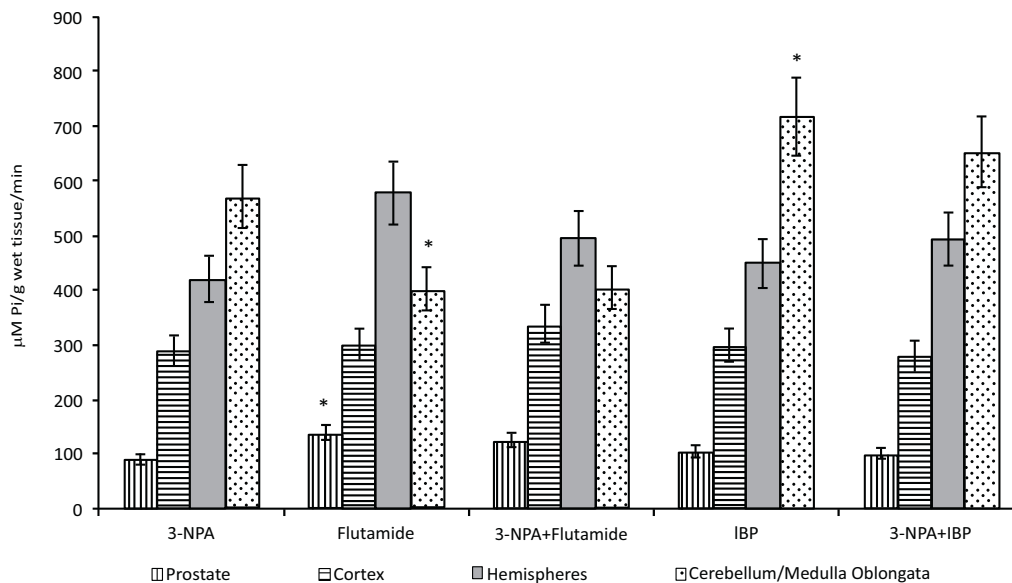


Fig. (6). Activity of ATPase dependent of calcium and magnesium in brain regions and prostate of rats treated with flutamide and 3β -*p*-Iodobenzoyloxyprogren-4,16-diene-6,20-dione (IBP) in presence of 3-nitro propionic acid (3-NPA). Kruskal-Wallis test and ANOVA test.

Prostate: Flutamide vs 3-NPA + IBP, 3-NPA. * $p = 0.03$

Flutamide + 3-NPA vs 3-NPA. * $p = 0.04$

Hemispheres: Flutamide vs 3-NPA, IBP. * $p = 0.025$

Cerebellum/Medulla oblongata: Flutamide + 3-NPA vs IBP, 3-NPA + IBP, 3-NPA. * $p = 0.01$

Flutamide vs IBP, 3-NPA + IBP, 3-NPA. * $p = 0.01$

IBP vs 3-NPA. * $p = 0.002$

Total ATPase activity (Fig. 6) in prostate and brain of animals with the administration of flutamide plus 3-NPA or IBP plus 3-NPA increased significantly ($p < 0.01$) in cerebellum/medulla oblongata regions and decreased in prostate and hemispheres

($p < 0.03$) in groups treated with IBP alone or combined with 3-NPA. This same effect was seen in H_2O_2 levels (Fig. 7) in prostate and brain of animals that received flutamide plus 3-NPA or IBP plus 3-NPA when compared with the control group.

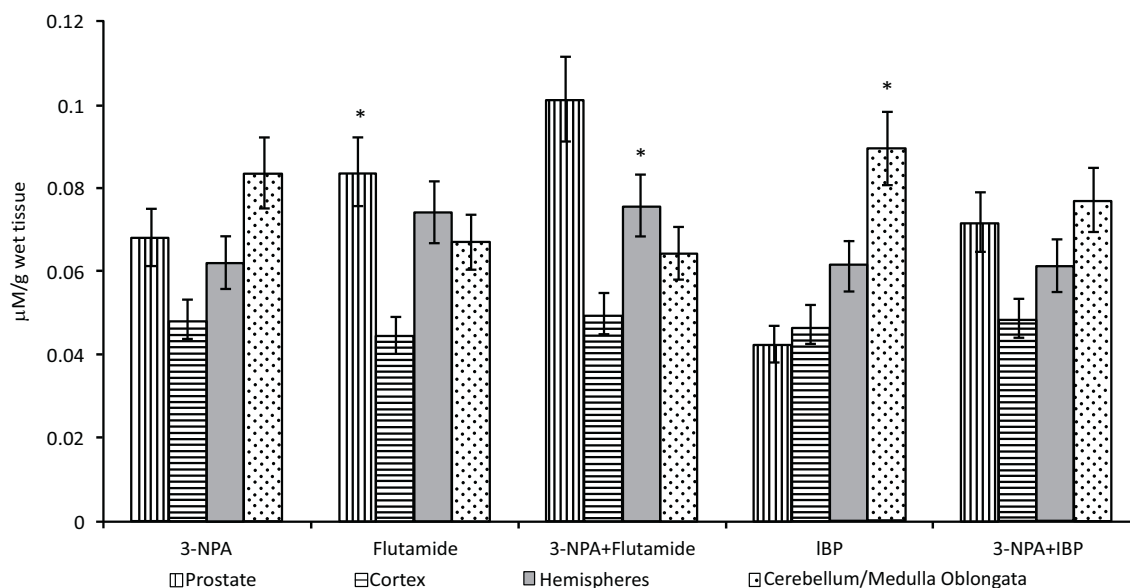


Fig. (7). H₂O₂ levels in brain regions and prostate of rats treated with flutamide and 3β-*p*-Iodobenzoyloxypregnan-4,16-diene-6,20-dione (IBP) in presence of 3-nitro propionic acid (3-NPA). Kruskal-Wallis test and ANOVA test.

Prostate: Flutamide vs IBP, 3-NPA + IBP. **p* = 0.017

Flutamide + 3-NPA vs IBP. **p* = 0.012

Hemispheres: Flutamide + 3-NPA vs 3-NPA, IBP, 3-NPA + IBP. **p* = 0.03

Cerebellum/Medulla oblongata: IBP vs Flutamide, flutamide + 3-NPA. **p* = 0.005

3-NPA vs Flutamide, flutamide + 3-NPA. **p* = 0.01

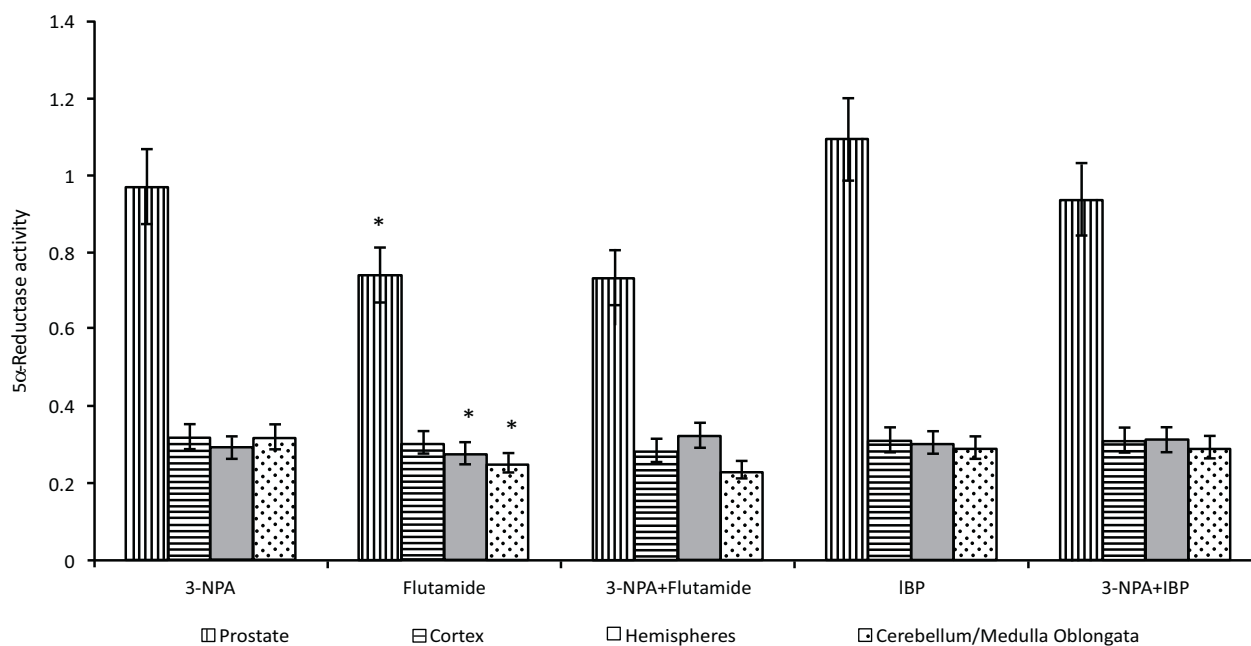


Fig. (8). 5α-reductase activity in brain regions and prostate of rats treated with flutamide and 3β-*p*-Iodobenzoyloxypregnan-4,16-diene-6,20-dione (IBP) in presence of 3-nitro propionic acid (3-NPA). Kruskal-Wallis test and ANOVA test.

Prostate: Flutamide vs 3-NPA **p* = 0.003

Hemispheres: Flutamide vs Flutamide + 3-NPA, 3-NPA + IBP. **p* = 0.02

Cerebellum/Medulla oblongata: Flutamide + 3-NPA vs 3-NPA, 3-NPA + IBP, IBP. **p* = 0.02

Flutamide vs 3-NPA. **p* = 0.002

5α-reductase activity (Fig. 8) in prostate and brain of animals that received flutamide in combination with 3-NPA or IBP plus 3-NPA, decreased significantly (*p* < 0.02) in prostate and hemispheres of groups that received flutamide alone, and in cerebellum/medulla oblongata of animals treated with flutamide alone or combined with 3-NPA. Calcium levels (Fig. 9) in prostate and brain of animals

with the administration of flutamide plus 3-NPA or IBP plus 3-NPA increased significantly (*p* < 0.02) in prostate and cerebellum/medulla oblongata regions of animals treated with IBP alone or combined with 3-NPA, and decreased significantly (*p* < 0.02) in cortex of the same groups when compared with the control group.

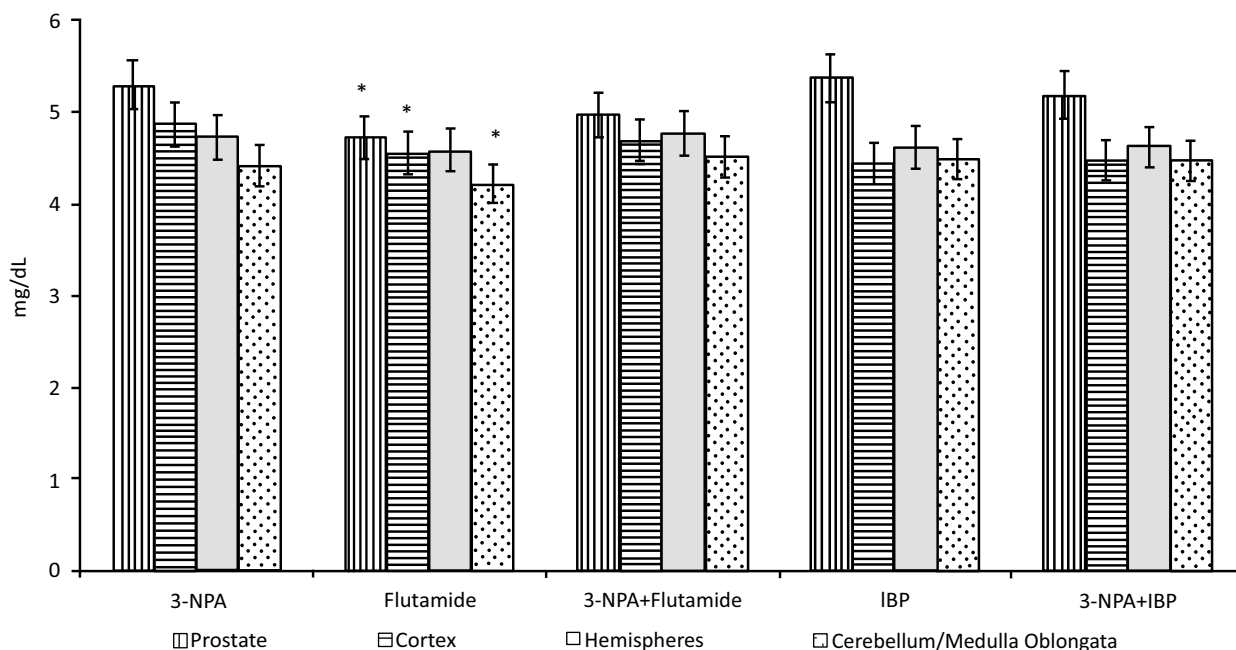


Fig. (9). Calcium levels in brain regions and prostate of rats treated with flutamide and 3β -*p*-Iodobenzoyloxypregnan-4,16-diene-6,20-dione (IBP) in presence of 3-nitro propionic acid (3-NPA). Kruskal-Wallis test and ANOVA test.

Prostate: Flutamide vs 3-NPA, IBP, 3-NPA + IBP. * $p = 0.02$

Cortex: Flutamide + 3-NPA vs 3-NPA + IBP, IBP. * $p = 0.02$

3-NPA vs IBP, 3-NPA + IBP. * $p = 0.02$

Cerebellum/Medulla oblongata: Flutamide vs 3-NPA + IBP. * $p = 0.03$

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The development of striatal lesions and ATP cellular shortage is seen when 3-NPA is administered systemically. These dual effects are similar to what happens in Huntington's disease. Mogami *et al.* [28] discovered that the action of flutamide in male rats has a dual effect – significant reduction in the motor behavior induced by 3-NPA administration and the level of testosterone. Likewise, low concentrations of circulating testosterone have been associated with advanced age and neurodegenerative conditions [29]. These findings may have similitude with the present study where we found a decrease in the levels of 5α -reductase activity in prostate, hemispheres, and cerebellum/Medulla oblongata regions in animals treated with flutamide and 3-NPA.

In prostate gland cells, impairment of pro-oxidant-antioxidant has been found to affect the oxidative and steroid hormones status [30]. In this work, we found at least three steroid nucleic ring in the steroids used which are important for protection the correct function of the target tissues [31]. Previous studies indicate that androgen plays an important role in the regulation of redox status in prostate gland cell by regulating apoptosis and cell growth [32]. Dopamine levels decreased in the cerebellum/medulla oblongata regions of animals that received IBP. This result agrees with the finding of Bode *et al.* [33], who suggest that decreased striatal dopamine D1 receptor density in animal model of Huntington's disease (HD) offers a good amount of neuroprotective effect to sex hormones and so, opens new perspectives on HD therapy.

GSH levels increased in animal groups treated with flutamide in combination with 3-NPA or IBP plus 3-NPA in hemispheres regions. This increase in brain suggests a protective effect in brain of these animals for their ester group in C-3 position of the A ring, which improves its antioxidant status [34]. Likewise, H_2O_2 concentration increased in prostate and hemispheres regions in the presence of flutamide, except in cerebellum/Medulla oblongata of the animals treated with IBP which showed a very high hydro-

peroxidation effect in the brain due in part to accumulation of iron as shown by the levels of haemoglobin in this last experimental group.

The neuroprotective effect observed in the present work is similar to what was found by Behl *et al.* [35], who suggested that estrogenic neuroprotective effect depends on the presence of hydroxyl radical in the same position of the ring 8 and that iron is thought to participate or initiate oxidative stress *via* generation of reactive oxygen species (ROS) as hydroxyl radical [36]. Lipoperoxidation (TBARS) decreased in all brain regions of animals that received flutamide contrary to what happened with IBP steroids, which is expected to influence the activities of hypothalamus-adrenal and hypothalamus-gonadal axes as suggested by Markianos *et al.* [37], due to neuronal loss in several brain regions that characterizes the progression of Huntington's disease.

The antiandrogen activity of flutamide-OH can be completely explained by the ability of the pure antiandrogen to displace androgen from their specific receptor [38], in this adult animal model Brain ATPase activity dependent on calcium and magnesium increased in prostate and hemispheres regions of animals that received flutamide, and in cerebellum/medulla oblongata regions of those that received IBP. These effects are probably due to the changes in the affinity of the enzyme [39]. With respect to calcium levels, this biomarker decreased in prostate, cortex, and cerebellum/medulla oblongata regions of animals that received flutamide which may be due to the effect of diminished neurotoxicity on all tissues [9]. The results suggest that flutamide showed antiandrogenic activity and that the novel steroid - 3β -*p*-Iodobenzoyloxypregnan-4,16-diene-6,20-dione - is an androgenic drug, which may be a potent neuroprotector mediated in part by changes in oxidative stress biomarkers and may reveal common critical pathways leading to degeneration in the prostate and brain. Probably disequilibrium in steroid homeostasis could have altered dopamine and GSH metabolisms in Huntington's disease animal models. We synthesize 3β -*p*-Iodobenzoyloxypregnan-4,16-diene-6,20-dione

compound as a novel antiandrogen for the treatment of prostate cancer. However, we recommend that further studies investigating the possible relationship between this novel steroid, dopamine levels and the relationship between oxidative stress and Huntington's disease in different animal models be carried. This could be extrapolated to HD human model for the assessment of the beneficial effect of androgen substitution therapy.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- Le, H.T.; Schaldach, C.M.; Firestone, G.L.; Bjeldanes, L.F. Plant-derived 3,3'-Diindolylmethane is a strong androgen antagonist in human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 21136-21145.
- Flores, E.; Bratoeff, E.; Cabeza, M.; Ramírez, E.; Quiroz, A.; Heuze, I. Steroid 5alpha-reductase inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2003**, *3*, 225-237.
- Njar, V.C.; Kato, K.; Nnane, I.P.; Grigoryev, D.N.; Long, B.J.; Brodie, A.M. Novel 17-azolyl steroids, potent inhibitors of human cytochrome 17alpha-hydroxylase-C17,20-lyase (P450(17)alpha): Potential agents for the treatment of prostate cancer. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 902-912.
- Nnane, I.P.; Kato, K.; Liu, Y.; Lu, Q.; Wang, X.; Ling, Y.Z.; Brodie, A. Effects of some novel inhibitors of C17,20-lyase and 5alpha-reductase *in vitro* and *in vivo* and their potential role in the treatment of prostate cancer. *Cancer Res.*, **1998**, *58*, 3826-3832.
- Flores, E.; Cabeza, M.; Quiroz, A.; Bratoeff, E.; Garcia, G.; Ramirez, E. Effect of a novel steroid (PM-9) on the inhibition of 5alpha-reductase present in *Penicillium crustosum* broths. *Steroids*, **2003**, *68*, 271-275.
- Sharpley, C.F.; Bitsika, V.; Wootten, A.C.; Christie, D.R. Differences in major depressive disorder and generalized anxiety disorder symptomatology between prostate cancer patients receiving hormone therapy and those who are not. *Psychooncology*, **2014**.
- Bortolato, M.; Frau, R.; Godar, S.C.; Mosher, L.J.; Paba, S.; Marrosu, F.; Devoto, P. The implication of neuroactive steroids in Tourette syndrome pathogenesis: A role for 5alpha-reductase? *J. Neuroendocrinol.*, **2013**, *25*(11), 1196-208.
- Bratoeff, E.; Ramirez, E.; Murillo, E.; Flores, G.; Cabeza, M. Steroidal antiandrogens and 5alpha-reductase inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, **1999**, *6*, 1107-1123.
- Rami, A.; Ferger, D.; Krieglstein, J. Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci. Res.*, **1997**, *27*, 93-97.
- Aliev, G.; Obrenovich, M.E.; Tabrez, S.; Jabir, N.R.; Reddy, V.P.; Li, Y. Burnstock, G.; Cacabelos, R.; Kamal, M.A. Link between cancer and Alzheimer disease *via* oxidative stress induced by nitric oxide-dependent mitochondrial DNA overproliferation and deletion. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2013**, 962984. doi: 10.1155/2013/962984.
- Tariq, M.; Khan, H.A.; Elfaki, I.; Al Deeb, S.; Al Moutaery, K. Neuroprotective effect of nicotine against 3-nitropropionic acid (3-NP)-induced experimental Huntington's disease in rats. *Brain Res. Bull.*, **2005**, *67*(1-2), 161-168.
- Hogg, N.; Singh, R.J.; Kalyanaraman, B. The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett.*, **1996**, *382*, 223-228.
- Keromov, B.F. Glutathione-deficient state of nervous tissues in starved animals intensifies lipid peroxidation and oxidation of protein SH-groups. *Ukr. Biokhim. Zh.*, **2004**, *76*, 108-113.
- Beckman, J.S.; Beckman, T.W.; Chen, J.; Marshall, P.A.; Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 1624-1629.
- Gutteridge, J.M.; Halliwell, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, **1990**, *15*, 129-135.
- Swapna, I.; Sathya, K.V.; Murthy, C.R.; Senthilkumaran, B. Membrane alterations and fluidity changes in cerebral cortex during ammonia intoxication. *NeuroToxicology*, **2005**, *335*, 700-704.
- Stefanello, F.M.; Chiarani, F.; Kurek, A.G. Methionine alters Na⁺, K⁺ ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosc.*, **2005**, *23*, 651-656.
- Hernández, R.J. A serotonin agonist-antagonist reversible effect on Na⁺,K⁺ ATPase activity in the developing rat brain. *Dev. Neurosci.*, **1982**, *5*, 326-331.
- Rem, J.; Siggaard-Andersen, O.; Norgaard-Pedersen, B.; Sorensen, S. Hemoglobin pigments. Photometer for oxygen saturation, carboxyhemoglobin, and methemoglobin in capillary blood. *Clin. Chim. Acta*, **1972**, *42*(1), 101-108.
- Calderón, G.D.; Osnaya, B.N.; García, A.R.; Hernández, G.E.; Guillé, P.A. Levels of glutathione and some biogenic amines in the human brain putamen after traumatic death. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **2008**, *51*, 25-32.
- Beck, O.; Palmkog, G.; Hultman, E. Quantitative determination of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in body fluids by HPLC. *Clin. Chim. Acta*, **1977**, *79*, 149-154.
- Hissin, P.J.; Hilf, R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissue. *Anal. Biochem.*, **1974**, *4*, 214-226.
- Calderón-Guzmán, D.; Espitia-Vázquez, I.; López-Domínguez, A.; Hernández-García, E.; Huerta-Gertrudis, B.; Juárez-Olguín, H. Effect of toluene and nutritional status on serotonin, lipid peroxidation levels and Na⁺/K⁺ATPase in adult rat brain. *Neurochem. Res.*, **2005**, *30*, 619-624.
- Fiske, C.H.; Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **1925**, *66*, 375-400.
- Calderón, G.D.; Labra, R.N.; Hernández, I.J.; Rodríguez, P.R.; Barragán, M.G.; Castilla, S.L.; Bratoeff, E.; Ramírez, L.E. Evaluación farmacológica de dos nuevos compuestos esteroidales sintéticos, con posible actividad antiandrogénica (Estudio *in vivo*). *Rev. Mex. Cienc. Farmac.*, **1997**, *29*, 10-14.
- Asru, K.S. Colorimetric assay of catalase. *Anal. Biochem.*, **1972**, *47*, 389-394.
- Castilla-Serna, L. Manual Práctico de Estadística para las Ciencias de la Salud. Editorial Trillas. 1° Edición. México, D.F. **2011**.
- Mogami, M.; Hayashi, Y.; Masuda, T.; Kohri, K.; Nishino, H.; Hida, H. Altered striatal vulnerability to 3-nitropropionic acid in rats due to sex hormone levels during late phase of brain development. *Neurosci. Lett.*, **2008**, *436*(3), 321-325.
- Ransome, M.I. Androgen function in the pathophysiology and treatment of male Huntington's disease patients. *J. Neuroendocrinol.*, **2012**, *24*(10), 1275-1283.
- Tam, N.N.; Ghatak, S.; Ho, S.M. Sex hormone-induced alterations in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in the prostate of Noble rats. *Prostate*, **2003**, *55*, 1-8.
- Green, S.P.; Gordon, K.; Simpkins, J.W. Phenolic a ring requirement for the neuroprotective effects of steroids. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, **1997**, *63*, 229-235.
- Tam, N.; Gao, Y.; Leung, Y.; Ho, S. Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate. *Am. J. Pathol.*, **2003**, *163*, 2513-2522.
- Bode, F.J.; Stephan, M.; Suhling, H.; Pabst, R.; Straub, R.H.; Raber, K.A.; Bonin, M.; Nguyen, H.P.; Riess, O.; Bauer, A.; Sjöberg, C.; Petersén, A.; von Hörsten, S. Sex differences in a transgenic rat model of Huntington's disease: Decreased 17beta-estradiol levels correlate with reduced numbers of DARPP32+ neurons in males. *Hum. Mol. Genet.*, **2008**, *17*(17), 2595-2609.
- Calderón, G.D.; Bratoeff, E.; Ramirez, L.E.; Hernández, G.E.; Pierdant, R.F.; Osnaya, B.N.; Trujillo, J.F.; Barragán, M.G.; Juárez, O.H. Effect of flutamide and two novel synthetic steroid on GABA, Glutamine and some oxidative stress markers in rat brain and prostate. *Andrologia*, **2011**, *43*, 225-232.
- Behl, C.; Skutella, T.; Lezoualc'h, F.; Post, A.; Widmann, M.; Newton, C.J.; Holsboer, F. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: Structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.*, **1997**, *51*, 535-541.
- Youdim, M.B.; Fridkin, M.; Zheng, H. Novel bifunctional drugs targeting monoamine oxidase inhibition and iron chelation as an

- approach to neuroprotection in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *J. Neural. Transm.*, **2004**, *111*(10-11), 1455-1471.
- [37] Markianos, M.; Panas, M.; Kalfakis, N.; Vassilopoulos, D. Plasma testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and cortisol in female patients with Huntington's disease. *Neuro Endocrinol. Lett.*, **2007**, *28*(2), 199-203.
- [38] Simard, J.; Luthy, I.; Guay, J.; Bélanger, A.; Labrie, F. Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **1986**, *44*, 261-270.
- [39] Hoskins, B.; Ho, I.K.; Meydrech, E.F. Effects of aging and morphine administration on calmodulin and calmodulin-regulated enzymes in striata of mice. *J. Neurochem.*, **1985**, *44*(4), 1069-1073.

Received: June 03, 2014

Revised: August 15, 2014

Accepted: August 23, 2014