

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

“Actividad antiproliferativa en líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 de esteroides 6-metoxi-4,6-dien-3-ona”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

SAMUEL NÚÑEZ LÓPEZ

Director: Dr. Lemuel Pérez Picaso

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2019



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 04 de febrero de 2019 a las 12 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Actividad antiproliferativa en las líneas celulares MDA MB-231 y MCF-7 de esteroides 6-metoxi-4,6-dien-3-ona" presentada por el alumno Samuel Núñez López, con número de matrícula 12090288, aspirante al título de Licenciatura.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 04 de febrero de 2019

ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Lemuel Pérez Picaso
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis

Dra. Roxana Martínez Pascual
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dra. Alma Xochil Avila Alejandro
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Adolfo López Torres
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 04 de marzo de 2019
Oficio No. JCIB/002/04/2019

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Samuel Núñez López** titulado "**Actividad antiproliferativa en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 de esteroides 6-metoxi-4,6-dien-3-ona**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Presidente: Dra. Roxana Martínez Pascual
Vocal: Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Secretario: Dra. Alma Xochil Avila Alejandre
Primer Suplente: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Segundo Suplente: Dr. Adolfo López Torres

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente
Terra uberrima, mens aperta
Bau Lo-tama, chi ji jú



Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan



Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan
VICE RECTORIA
ACADEMICA

c.c.p. Dr. Lemuel Pérez Plasso, Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Samuel Núñez López, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Georgina y Gilberto por su inmenso apoyo en cada etapa de mi vida. Papa eres un ejemplo de vida, superaste cada obstáculo en tu camino, eso me enseñó a ser mejor cada día. Mama, siempre con las palabras adecuadas para ayudarme a entender mis emociones.

A mi hermana Gema, por ser uno de mis ejemplos a seguir, por esos regaños justificados que me impulsan a ser mejor.

A Liz por enseñarme algunos matices de la vida y traer al mundo a mi pequeño Gael.

Dr. Lemuel por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por los consejos extrema paciencia y por su disposición en cada momento.

Dr. Omar por el conocimiento transmitido e inmenso apoyo durante el proyecto, sin sus consejos y orientación no hubiésemos logrado los reconocimientos obtenidos en la tesis.

Dr. Peña por ayudarme en la parte biológica, uno de los personajes tras bambalinas.

Gracias a mis revisores Dra. Roxana Martínez Pascual, Dr. Miguel Ángel Peña Rico, Dra. Alma Xochil Avila Alejandre, Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa y al Dr. Adolfo López Torres, por sus observaciones y aportaciones para hacer de este un mejor trabajo.

Agradezco al Vicerrector M.C. Héctor López Arjona por su valioso apoyo, a la Lic. Yesenia Barrientos y a todo el personal de Servicios Escolares por su apoyo y amabilidad. A la química Lety y a Bety por su apoyo y facilitación para proporcionarme el material requerido para este trabajo.

A Yuno mi persona especial, por apoyarme en esta etapa de mi vida y por seguir siendo parte de este viaje. Te amo.

El presente trabajo se realizó en la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, bajo la dirección del Dr. Lemuel Pérez Picaso y colaboración del Dr. Omar Viñas Bravo en las instalaciones del Laboratorio de Química Orgánica, se agradece a LINAN-UNPA (INFRA-2015-01-252013). Las evaluaciones biológicas se realizaron en el laboratorio de LINAN-UNPA en colaboración con el Dr. Miguel Ángel Peña Rico y el ensayo de citometría se realizó en colaboración con la Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo, del Instituto Nacional de Pediatría.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
RESUMEN	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE ESQUEMA	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ABREVIATURAS	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Cáncer.	1
1.2. Importancia de los esteroides.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Tratamientos contra el cáncer.....	3
2.1.1. Terapia hormonal.....	3
2.1.2. Actividad de esteroides.....	4
2.1.2.1. Esteroles.....	5
2.1.2.2. Ácidos biliares.....	6
2.1.2.3. Vitamina D.....	6
2.1.2.4. Hormonas esteroidales.....	6
2.2. Nomenclatura de los esteroides.....	6
2.2.1. Esteroides fundamentales.....	7
2.3. Reactividad de los esteroides.....	8
2.3.1. Degradación de Marker.....	9
3. ANTECEDENTES.....	11

3.1. Actividad biológica de esteroides.	11
3.2. Modificaciones sintéticas en esteroides efectuadas por I ₂	15
4. JUSTIFICACIÓN.	18
5. HIPÓTESIS.	19
6. OBJETIVO PRINCIPAL.	20
7. OBJETIVOS SECUNDARIOS.	20
8. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
8.1. Preparación del reactivo de Jones.	21
8.1.1. Reactivo a una concentración de 2.19 M.	21
8.1.2. Reactivo a una concentración de 0.25 M.	22
8.2. Procedimiento para la obtención de 4-en-3,6-dionas esteroidales (57, 58, 59).....	22
8.3. Procedimiento para la obtención de los enol éteres (60, 61, 62).	22
8.2. Cromatografía en capa fina.....	24
8.3. Aislamiento y purificación.....	25
8.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	25
8.5. Disolventes y materias primas.	25
8.6. Ensayo MTT.	26
8.6.1. Procedimiento para evaluar la actividad antiproliferativa de los enol éteres (60, 61, 62).	26
8.6.2. Condiciones del medio.	26
8.6.3 Cultivo de células.....	26
8.6.5. Ensayo MTT: Determinación de la viabilidad celular.	27
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	28
9.1. Síntesis química.....	28
9.1.1. Materias primas.....	28

9.1.1.2. Ruta de síntesis.....	28
9.1.1. Obtención de 3,6-endionas.....	29
9.1.1.1. Síntesis de (25 <i>R</i>)-espirostan-4-en-3,6-diona (57).....	29
9.1.1.2. Síntesis de colestán-4-en-3,6-diona (58).....	32
9.1.1.3. Síntesis de pregnán-4,16-dien-3,6,20-triona (59).	34
9.1.2 Obtención de los enol éteres.	38
9.1.2.1. Síntesis de 6-metoxicolestan-4,6-dien-3-ona (60).	38
9.1.2.2. Análisis de los espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de 60	39
9.1.2.3. Síntesis (25 <i>R</i>)-6-metoxiespirostan-4,6-dien-3-ona (61).	42
9.1.2.1. Caracterización por RMN del (25 <i>R</i>)-6-metoxiespirostan-4,6-dien-3-ona (61)...	43
9.1.2.4. Síntesis de 6-metoxipregnan-4,6,16-en-3,17-diona (62).	47
9.2. Ensayos de viabilidad.....	51
9.2.1. Línea celular MCF-7.....	51
9.2.2 Línea celular MDA-MB231.....	52
9.3.3 Evaluación de la actividad antiproliferativa en las células sanas HEK-293.....	54
9.2.3. Discusión de la actividad antiproliferativa.	58
10. CONCLUSIONES.....	60
11. REFERENCIAS.....	61

RESUMEN

Se estableció una metodología regioselectiva novedosa para la obtención de los enol éteres; 6-metoxicolestan-4,6-dien-3-ona, (25*R*)-6-metoxiespirostan-4,6-dien-3-ona y 6-metoxipregnan-4,6,16-trien-3,17-diona, a partir de sistemas esteroidales 4-en-3,6-dionas de colesterol, diosgenina y 16-dehidropregnenolona mediante el empleo de I₂ y reflujo en metanol. A los tres enol éteres obtenidos se les evaluó la actividad antiproliferativa frente a líneas celulares de adenocarcinoma de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y células de fibroblasto de riñón (HEK-293) con el ensayo MTT, utilizando dos controles, uno con células sin tratamiento y el otro con células tratadas con doxorrubicina. Los enol éteres, 6-metoxicolestan-4,6-dien-3-ona y 6-metoxipregnan-4,6,16-trien-3,17-diona, tuvieron mayor actividad que las células tratadas con doxorrubicina, de forma dosis dependiente, siendo el compuesto 6-metoxicolestan-4,6-dien-3-ona el que mostró los mejores resultados con un IC₅₀ de 38 µg/mL para MDA-MB231, 18.8 µg/mL para MCF-7 y 71.7 µg/mL para las células HEK-293. Finalmente, con un ensayo preliminar de citometría se determinó que el enol éter 6-metoxipregnan-4,6,16-trien-3,17-diona, provoca la muerte celular por procesos necróticos.

ABSTRACT

The syntheses of 6-methoxycholestan-4,6-diene-3-one, (25*R*)-6-methoxyspirostan-4,6-diene-3-one and 6-methoxypregnan-4,6,16-triene-3,17-dione are reported. The products were prepared from cholesterol, diosgenin and 16-dehydropregnenolone in a two step-sequence, first, an oxidation of the starting materials with Jones reagent to obtain the corresponding 4-en-3-dione, then a novel regioselective methodology with I₂ in refluxing methanol. The antiproliferative activities of the products were determined *in vitro* against breast adenocarcinoma cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) and kidney fibroblast cells (HEK-293) by means of MTT assay. Two controls were used, one with cells without treatment and other with cells treated with doxorubicin. The enol ethers, 6-methoxycholestan-4,6-diene-3-one and 6-methoxypregnan-4,6,16-triene-3,17-dione exhibited higher activity than the cells treated with doxorubicin, in a dose-dependent manner. 6-methoxycholestan-4,6-diene-3-one showed the best results with IC₅₀ (μg/mL) values of 38 for MDA-MB-231, 18.8 for MCF-7 and 71.7 for cells HEK-293. Finally, with a preliminary cytometry test, it was determined that the enol ether 6-methoxypregnan-4,6,16-triene-3,17-dione caused cell death by a necrotic processes.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esteroides usados en terapias hormonales en cáncer de mama, dexametasona (1), exemestano (2), fulvestrant (3), formestano (4) y tamoxifeno (5).	4
Figura 2. Estructuras representativas de las principales familias de esteroides.	5
Figura 3. Numeración de los carbonos en esteroides.....	6
Figura 4. Estereoquímica del anillo esteroidal en el carbono 5.	7
Figura 5. Estructuras básicas de los núcleos esteroidales.....	8
Figura 6. Derivados esteroidales con el sistema 6-hidroximino-4-en-3-ona.	11
Figura 7. Oximas esteroidales derivadas de colesterol (37), estigmasterol (38) y β -sitosterol (39).	12
Figura 8. Derivados de fulvestrant.	12
Figura 9. Derivados esteroidales de 5β -androstano (41) y ergostano (42).....	12
Figura 10. Acetato de nomegestrol (43) y la progestina (44).....	13
Figura 11. Derivados esteroidales de androstan-1,4-dien-3,17-diona.....	14
Figura 12. 24-epibrassinolido (46) y 28-homocastasterona (47).	14
Figura 13. Comparación de los espectros de RMN de ^{13}C a) diosgenina (30) y b) endiona esteroidal (57).....	30
Figura 14. Espectros de RMN de ^{13}C de a) endiona 58 y b) colesterol (6).	33
Figura 15. Espectros de RMN de ^{13}C a) endiona 59 y b) 16-dehidropregnenolona (33).....	36
Figura 16. Espectros de RMN de ^{13}C del a) enol éter 60 y b) endiona 57.	40
Figura 17. Espectro de <i>g</i> HMBC del compuesto 60.	41
Figura 18. Comparación entre los espectros de RMN de ^{13}C del a) enol éter 61 y b) endiona 57.	45
Figura 19. Espectro de <i>g</i> HMBC del compuesto 61.	46
Figura 20. Espectros de RMN de ^{13}C del a) enol éter 62 y b) endiona 59.	49
Figura 21. Espectro de <i>g</i> HMBC del compuesto 62.	50
Figura 22. Actividad antiproliferativa de los esteroides 60, 61 y 62 frente a las células de cáncer de mama MCF-7.....	51
Figura 23. Actividad antiproliferativa de los esteroides 60 y 62 frente a las células MDA-231 vs control.....	52

Figura 24. Actividad antiproliferativa de los esteroides 60 y 62 frente a las células MDA-231 y el control positivo.	53
Figura 25. Comparación de la actividad antiproliferativa entre las líneas celulares MDA-231 y MCF-7.....	53
Figura 26. Actividad antiproliferativa de los esteroides 60 y 62 con HEK-293.....	54
Figura 27. Actividad antiproliferativa de los esteroides 60 y 62 en la línea celular HEK-293 y el control positivo (doxorubicina).	55
Figura 28. Actividad antiproliferativa de los esteroides 60 y 62	56
Figura 29. Actividad antiproliferativa de los esteroides 60 y 62 . Prueba de Tukey.....	56
Figura 30. Ensayo preliminar de Anexina/IP medido por citometría.....	57

ÍNDICE DE ESQUEMA

Esquema 1. Reacciones que sufren los esteroides.	9
Esquema 2. Degradación de Marker.	10
Esquema 3. Desprotección de cetales con I ₂	16
Esquema 4. Reacción de deshidrogenación de la testosterona (12) con I ₂	16
Esquema 5. a) Aromatización del arilciclohexanol (53) y b) mecanismo de reacción para la obtención de 54	17
Esquema 6. Estrategia experimental para la síntesis y evaluación antiproliferativa de esteroides 3,6-sustituídos.	21
Esquema 7. Reacciones utilizando como catalizador I ₂ molecular.	28
Esquema 8. Síntesis para la formación de endionas esteroidales.	29
Esquema 9. Obtención del (25 <i>R</i>)-espirostan-4-en-3,6-diona (57).	29
Esquema 10. Obtención del colestán-4-en-3,6-diona (58).	32
Esquema 11. Obtención de pregnán-4,16-dien-3,6,20-triona (59).	34
Esquema 12. Síntesis de 6-metoxicolestán-4,6-dien-3-ona (60).	38
Esquema 13. Reacción para obtener (25 <i>R</i>)-metoxiespirostan-4,6-dien-3-ona (61).	42
Esquema 14. Reacción para obtener 6-metoxipregnan-4,6-dien-3-ona (62).	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones para la síntesis de (25 <i>R</i>)-espirostan-4-en-3,6-diona (57).....	30
Tabla 2. Comparación de los δ (ppm) representativos de la diosgenina (30) y su endiona (57)..	31
Tabla 3. Condiciones para la síntesis de colestán-4-en-3,6-diona (58).....	32
Tabla 4. Comparación de los δ (ppm) representativos del colesterol (6) y su endiona 58	34
Tabla 5. Condiciones para la síntesis del pregnan-4,16-dien-3,6,20-triona (59).....	35
Tabla 6. Comparación de los δ (ppm) representativos de la 16-dehidropregnenolona (33) y su endiona 59	37
Tabla 7. Condiciones para la síntesis del enol éter 60	38
Tabla 8. Comparación de los δ (ppm) representativos de la endiona 58 y el enol éter 60	39
Tabla 9. Condiciones para la síntesis del enol éter 61	43
Tabla 10. Comparación de los δ (ppm) representativos de la endiona 57 y el enol éter 61	44
Tabla 11. Condiciones para la síntesis del enol éter 62	47
Tabla 12. Comparación de los δ (ppm) representativos de la endiona 59 y enol éter 62	48

ABREVIATURAS

CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CCF	Cromatografía en capa fina
δ	Desplazamiento químico
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0] undec-7-eno
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>g</i> HMBC	Gradiente heteronuclear múltiple de correlación de enlace (por sus siglas en inglés)
<i>g</i> HSQC	Gradiente heteronuclear simple de carencia cuántica (por sus siglas en inglés)
HEK-293	Células de fibroblasto de riñón sanas
MCF-7	Células de adenocarcinoma de mama
MDA-MB231	Células de adenocarcinoma de mama hormono-independientes
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
ppm	Partes por millón
RMN 1D	Resonancia magnética en una dimensión
RMN 2D	Resonancia magnética en dos dimensiones
RMN ¹³ C	Resonancia magnética de carbono-13
RMN ¹ H	Resonancia magnética de protón
Rx	Reacción
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Cáncer.

El cáncer se caracteriza por un crecimiento tisular descontrolado provocado por células anormales con capacidad de invadir y destruir diferentes tejidos, se clasifica en función del tejido y célula de origen, puede iniciar a partir de cualquier tipo de célula. Esta enfermedad es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, ocasiona aproximadamente nueve millones de defunciones por año, lo que representa el 12% del total de las muertes en el mundo (Cancer Today, 2018). En México, el cáncer mamario es considerado como un problema de salud pública; es la segunda causa de muerte en la población femenina mayor de 25 años. El cáncer de mama consiste en la proliferación descontrolada de las células epiteliales que revisten los conductos mamarios. Esta patología es una enfermedad clonal, en donde una célula individual sufre mutaciones somáticas hasta expresar estas alteraciones en las células vecinas (Hedenfalk I. *et al.*, 2001). Este tipo de neoplasia, junto con el cáncer de próstata y el cervicouterino son denominadas hormono-dependientes, de acuerdo al tejido de procedencia (Instituto Nacional del Cáncer, 2018).

El tratamiento de este tipo de padecimiento se realiza de forma multidisciplinaria y se basa principalmente en tres técnicas que son, la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia; en esta última, se emplean fármacos de tipo esteroidal de forma exitosa (Medioni J., 2016).

1.2. Importancia de los esteroides.

Los esteroides son una clase de biomoléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran presentes en forma de metabolitos secundarios en plantas y animales. Estos compuestos tienen diversas actividades biológicas en los organismos como: reguladores de la reproducción animal, promotores del crecimiento vegetal, precursores de hormonas sexuales (testosterona y estrógeno), además son una pieza fundamental para recubrir y regular la permeabilidad de las paredes celulares (Moss, 1989). El empleo de esteroides en la industria farmacéutica ha sido de gran interés por su intervención en los procesos regulatorios de la reproducción, aplicándolos como agentes anticonceptivos, además se utilizan para la producción

de hormonas sexuales o son empleados en la quimioterapia para tratar a pacientes con cáncer del tipo hormono-dependiente (Herruzo I., 2002). Además, estas moléculas por sus estructuras privilegiadas y potencial bioactivo, son considerados como piezas fundamentales para el diseño de nuevos compuestos que puedan ser aplicados en un futuro como terapia en pacientes diagnosticados con cáncer.

En este trabajo se realizó la síntesis regioselectiva de sistemas esteroidales 6-metoxi-4,6-dien-3-ona derivadas de colesterol, diosgenina y 16-dehidropregnenolona obtenidas a partir de endionas esteroidales (**57**, **58** y **59**) y se evaluó la actividad antiproliferativa con el ensayo MTT en dos líneas celulares de adenocarcinoma de mama (MCF-7, MDA-MB-231) y en una línea celular normal (HEK-293).

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Tratamientos contra el cáncer.

Los tratamientos en el cáncer se basan de acuerdo al tipo y la etapa de desarrollo de la enfermedad, en general se utilizan tres técnicas de forma multidisciplinaria, estas se basan en la aplicación de cirugía, radioterapia y quimioterapia. En la cirugía se extirpa el área afectada y se realiza en conjunto con la radioterapia o quimioterapia, administrándolas antes o después de la operación. La radioterapia afecta el proceso de replicación de las células cancerosas, impidiendo el desarrollo del tumor y la quimioterapia se basa en la administración de fármacos para detener el crecimiento y reducir el riesgo de que el cáncer vuelva a desarrollarse. Estos fármacos se pueden agrupar de acuerdo a su actividad, los que inhiben la proliferación celular y los que provocan muerte celular por necrosis o apoptosis (Martínez-Mata, 2013).

2.1.1. Terapia hormonal.

En la actualidad, las opciones de tratamiento para el cáncer incluyen el uso de la hormonoterapia. Los fármacos cuyo principio activo son esteroides, son ampliamente usados para tratar células cancerígenas dependientes de hormonas, como son: dexametasona (1), exemestano (2) y formestano (4) (Scherbakov M. *et al.* 2018; Figura 1). Estos fármacos se agrupan como; inhibidores de la aromatasa (IA), moduladores selectivos de receptores a estrógenos (MSRE) y antagonistas de receptores a estrógenos (ARE), este tratamiento ha demostrado su eficacia en los tipos de cáncer que expresan receptores a estrógeno y progesterona. La terapia hormonal disminuye los niveles de estas hormonas e impide que actúen en las células cancerosas, evitando así que el área afectada se expanda en otras partes del cuerpo (Herruzo I., 2002).

Los medicamentos más representativos en la terapia hormonal (Figura 1) son el exemestano (2), el fulvestrant (3) y el tamoxifeno (5), el primero actúa como un MSRE en las células del seno; esto quiere decir que bloquea los efectos del estrógeno en el tejido mamario, uniéndose a los receptores de esta hormona impidiendo su inserción en la célula, por lo que las células no reciben la señal que les indica que crezcan y se multipliquen. El tamoxifeno (5) al ser un MSRE bloquea la acción del estrógeno en las mamas, pero actúa como estrogénico en otros tejidos como el útero, por lo que es posible el desarrollo de tumores en el endometrio (Medioni J., 2016).

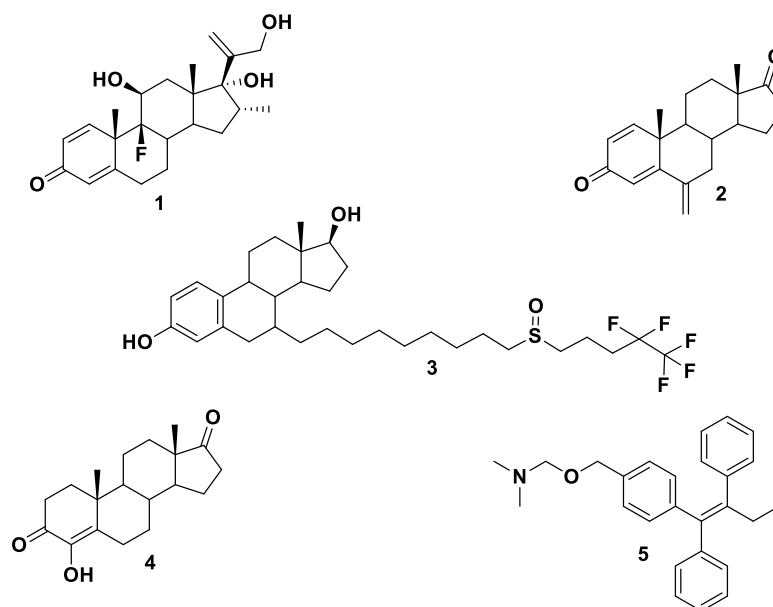


Figura 1. Esteroides usados en terapias hormonales en cáncer de mama, dexametasona (1), exemestano (2), fulvestrant (3), formestano (4) y tamoxifeno (5).

El fulvestrant (3) es un esteroide ARE en células del seno, actúa de una forma similar al tamoxifeno, pero a diferencia de este fármaco no provoca el efecto estrogénico en otros tejidos, además se utiliza cuando los pacientes presentan resistencia a MSRE (Medioni J., 2016).

El exemestano (2) al ser un IA suprime de forma reversible el complejo enzimático aromatasa que se encarga de la biosíntesis de la androstenediona a estrógenos, su función es bajar los niveles de estrógenos en el organismo lo que provoca que las células no reciban más suministro de esta hormona, por lo que se detiene el crecimiento del área afectada por el cáncer.

2.1.2. Actividad de esteroides.

Los esteroides son uno de los metabolitos secundarios más importantes, debido a las actividades biológicas que tienen en los seres vivos. Una de las funciones más conocidas de estos compuestos es que favorecen el crecimiento muscular.

Los cuatro grupos más importantes de los esteroides son: esteroides (6), ácidos biliares (7), vitaminas esteroidales (8-9) y las hormonas esteroidales (10-14) (Escribano, 2010; Figura 2).

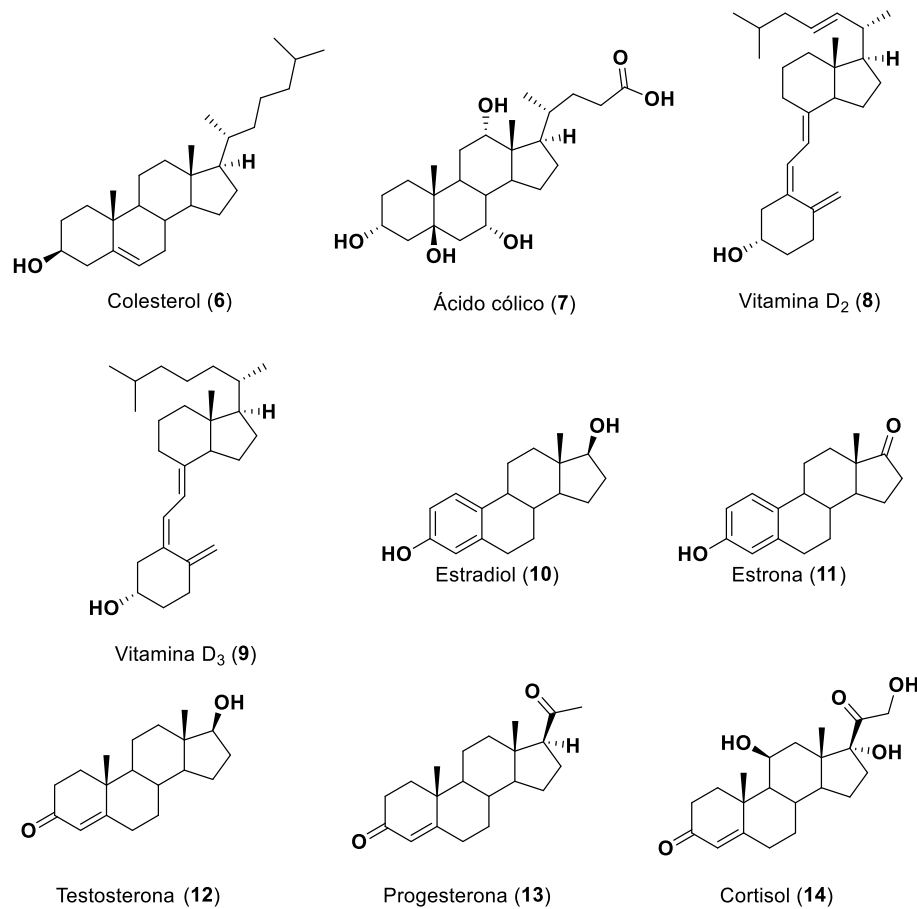


Figura 2. Estructuras representativas de las principales familias de esteroides.

2.1.2.1. Esteroles.

Los esteroides son esteroides que presentan un grupo hidroxilo en la posición β del C-3 y dobles enlaces en el anillo B y en la cadena lateral (López, 2014). El colesterol (6) es el esteroide más común, realiza funciones biológicas importantes en los organismos vivos; en primera instancia da permeabilidad a las membranas celulares manteniendo los orgánulos dentro de la célula, impidiendo el intercambio de fluidos de forma libre entre células vecinas. En segundo lugar, actúa como precursor de sustancias con actividades biológicas como: hormonas sexuales (estradiol 10, testosterona 12, y progesterona 13), hormonas adrenocorticales (aldosterona y cortisol 14), ácidos biliares (7) y vitamina D (8-9) (Koolman *et. al.*, 2005).

2.1.2.2. Ácidos biliares.

Se forman en el hígado a partir del colesterol, son considerados derivados estructurales del colano, se caracterizan por tener una cadena alifática ramificada en C-17, un grupo carboxilo en C-24 y grupos hidroxilo en su núcleo, el ácido cólico (**7**) es un ejemplo de este tipo de esteroides. Su función es favorecer la degradación de lípidos en el intestino delgado (Koolman *et. al.*, 2005; Escribano, 2010).

2.1.2.3. Vitamina D.

Su presencia en la dieta no es esencial, ya que sólo con exponerse a los rayos solares es suficiente para cubrir la demanda de esta vitamina, su función principal es la regulación y equilibrio metabólico del calcio y fósforo, esto promueve la formación normal de huesos, siendo el 1,25-dihidroxicolecalciferol la forma activa de la vitamina D₃ (**9**) (Escribano, 2010).

2.1.2.4. Hormonas esteroidales.

Son sustancias que se biosintetizan en la glándula endocrina a partir del colesterol, estas se encargan de regular las características sexuales femeninas y masculinas (estradiol **10**, testosterona **12** y progesterona **13**). Por último, las hormonas suprarrenales (cortisol **14**), actúan en el metabolismo de los glúcidos regulando la síntesis de glucógeno (Koolman *et. al.*, 2005).

2.2. Nomenclatura de los esteroides.

Los esteroides son compuestos que están conformados por el esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno (**15**), donde a cada uno de los anillos se les asigna una letra A, B, C y D iniciando de izquierda a derecha. La numeración de los carbonos sigue un orden ascendente iniciando en el anillo A y finalizando en el anillo D (Figura 3).

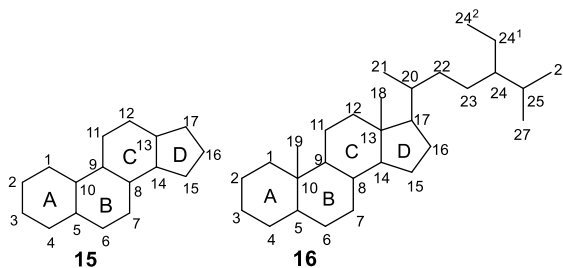


Figura 3. Numeración de los carbonos en esteroides.

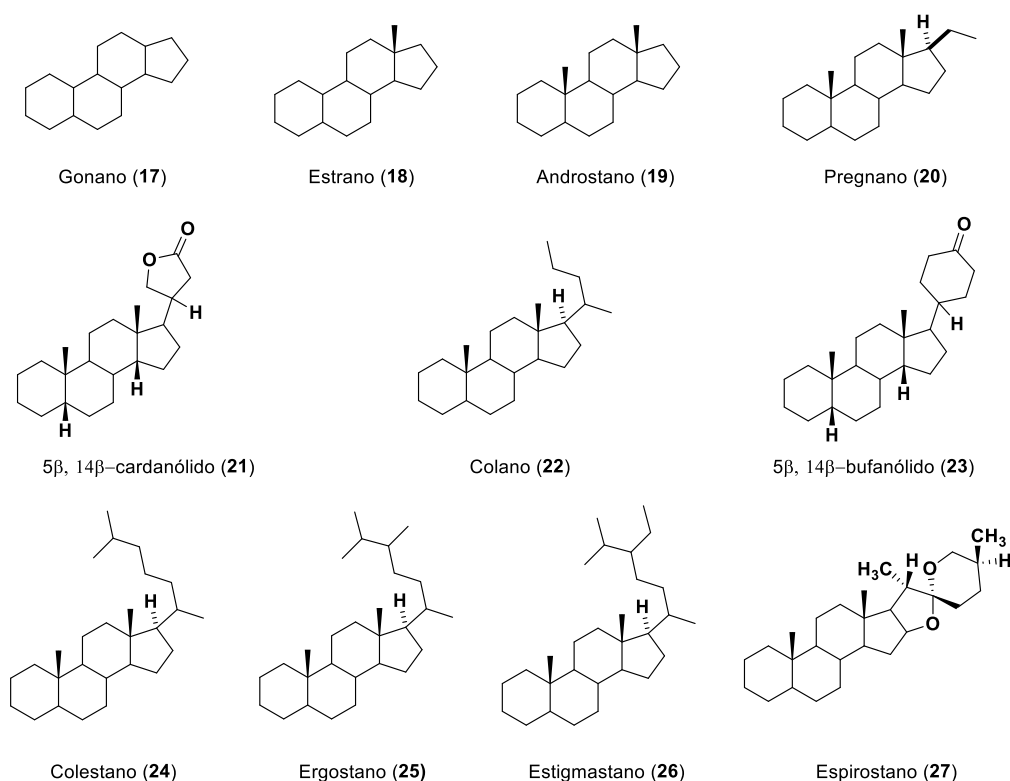
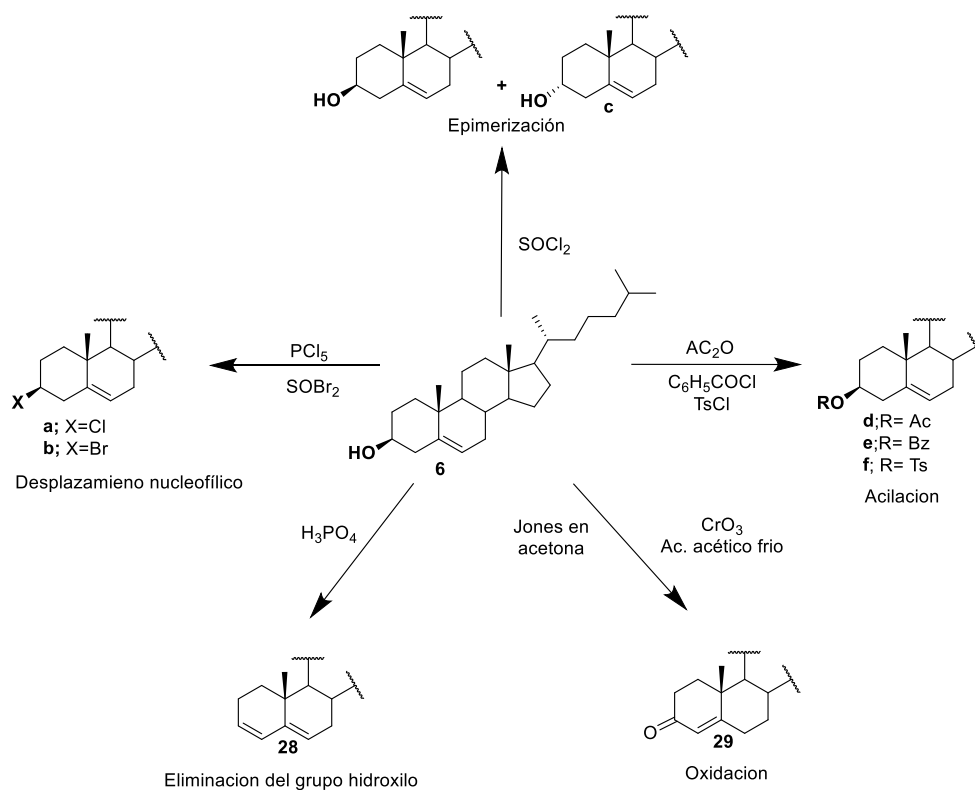


Figura 5. Estructuras básicas de los núcleos esteroidales.

2.3. Reactividad de los esteroides.

Los esteroides por su naturaleza bioactiva en los seres vivos son considerados como una fuente importante de materias primas para obtener derivados con una mayor actividad biológica y mayor selectividad.

En síntesis orgánica, las reacciones químicas más importantes en sistemas esteroidales se llevan a cabo por lo regular en los anillos A y B (Esquema 1), además otro sitio de interés es la reactividad que presenta la cadena lateral, por ejemplo, en la posición C-3 de los esteroides como el colesterol hay un grupo hidroxilo, el cual se ha modificado mediante reacciones de esterificación, oxidación, desplazamiento nucleofílico, eliminación y epimerización, entre otras reacciones (Bhat S. *et al.*, 2005).



Esquema 1. Reacciones que sufren los esteroides.

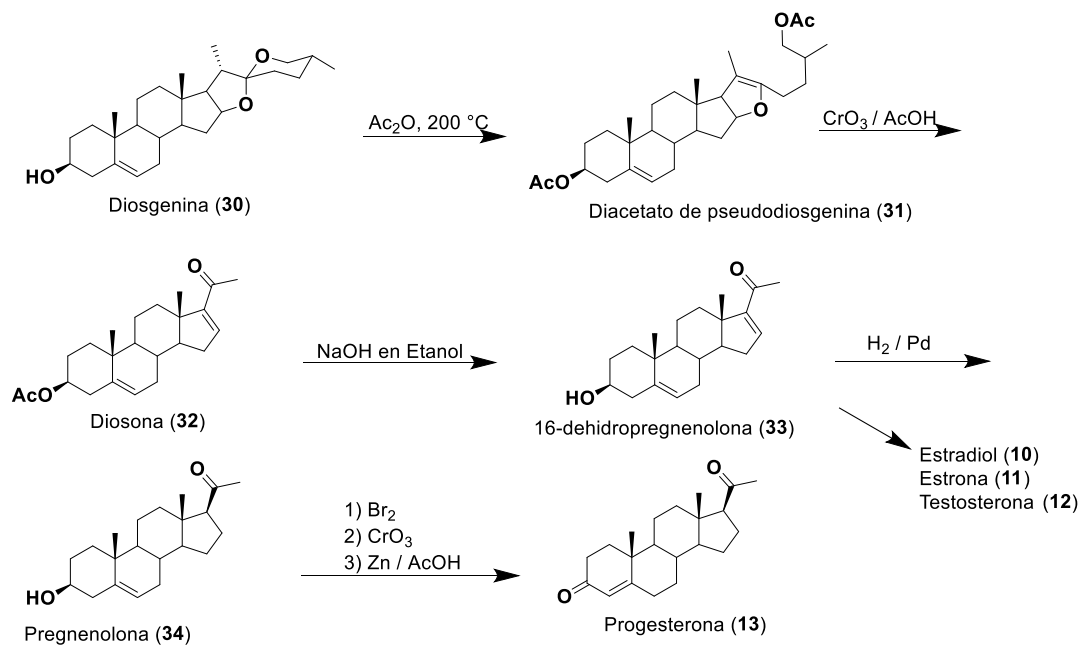
Es común en los esteroides la presencia de dobles enlaces, estos pueden ser blanco de reacciones como: hidrogenación catalítica, adición, además de reacciones en la posición alílica, en cuanto a los sustituyentes en C-17 dependiendo de los grupos funcionales presentes son las reacciones que se pueden realizar para la modificación del esteroide (Pickering, 1980).

Un ejemplo representativo del uso de un esteroide para la obtención de un compuesto comercial es la síntesis de progesterona (**13**) mediante la degradación de Marker.

2.3.1. Degradación de Marker.

La degradación de Marker es una ruta sintética donde se obtienen hormonas esteroideas a partir de sapogeninas naturales, utilizando como materia prima, la raíz de Dioscorea, que es una especie de ñame conocida como "cabeza de negro" que crece en zonas de Veracruz. Esta reacción se realiza en varias etapas (Esquema 2). La primera consiste en la apertura del anillo F que se realiza tratando a la diosgenina (**30**) con anhídrido acético a 200°C, lo cual provoca la esterificación de los alcoholes C-3 y C-26, formando el diacetato de pseudodiosgenina (**31**). La oxidación de **31** rompe la doble ligadura entre C-20 y C-22 y forma la diosona (**32**), posteriormente es hidrolizada

en medio básico para obtener la 16-dehidropregnenolona (**33**). La hidrogenación catalítica de **33** produce **34**, cuya bromación del doble enlace, seguido de una oxidación del grupo hidroxilo del C-3 y subsecuente reducción se obtiene la progesterona (**13**; Miramontes, 2001).



Esquema 2. Degradación de Marker.

3. ANTECEDENTES.

3.1. Actividad biológica de esteroides.

Recientes investigaciones, han demostrado que esteroides naturales o sintéticos han mostrado actividad antiproliferativa frente a diversas líneas celulares. Dentro de este tipo de compuestos se encuentran algunos fármacos en actual uso clínico. A continuación, se describen algunos estudios efectuados en esta área.

En 1997, Rodríguez J. *et al.*, aislaron de dos especies de esponjas marinas de *Cinachyrella* (*C. alloclada* y *C. apion*) dos nuevos derivados esteroidales con el sistema 6-hidroximino-4-en-3-ona (Figura 6): (6*E*)-colestán-6-hidroximino-4-en-3-ona (**35**) y (24*R*,6*E*)-24-etilcolestán-6-hidroximino-4-en-3-ona (**36**) (Rodríguez J. *et al.*, 1997). Posteriormente en el 2001 realizaron la síntesis y evaluación antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer (P-388, A-549, HT-29 y MEL-28) con valores de IC₅₀ expresados en µg/mL, para **35** con valores de 1.25, 1.25, 1.25 y 2.5 respectivamente, mientras que para **36** los valores de IC₅₀ fueron de 10 µg/mL en todas las líneas celulares (Rodríguez J. *et al.*, 2001).

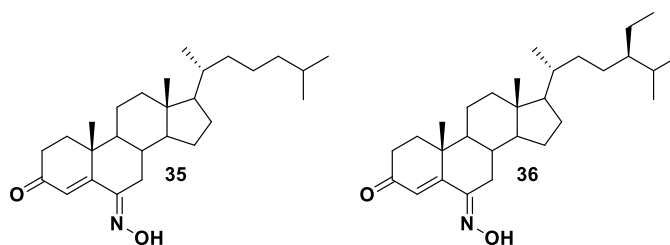


Figura 6. Derivados esteroidales con el sistema 6-hidroximino-4-en-3-ona.

Cui J. *et al.*, en el 2009 sintetizaron oximas esteroidales derivadas de colesterol (**37**), estigmasterol (**38**) y β-sitosterol (**39**) añadiendo el grupo oxima en el anillo A, B o en ambos anillos (Figura 7). Estos compuestos mostraron actividad citotóxica en distintas líneas celulares de cáncer (Sk-Hep-1, H-292, PC-3 y Hey-1B), indicando que existe una relación entre la actividad de los compuestos y la cadena lateral situada en el carbono 17, debido a que los que tuvieron mayor efecto en la actividad antiproliferativa fueron los derivados del colesterol, siendo el más activo la dioxima de colesterol (**37**) con valores de IC₅₀ de 24, 33, 36 y 37 µg/mL para cada línea celular respectivamente (Cui J. *et al.*, 2009).

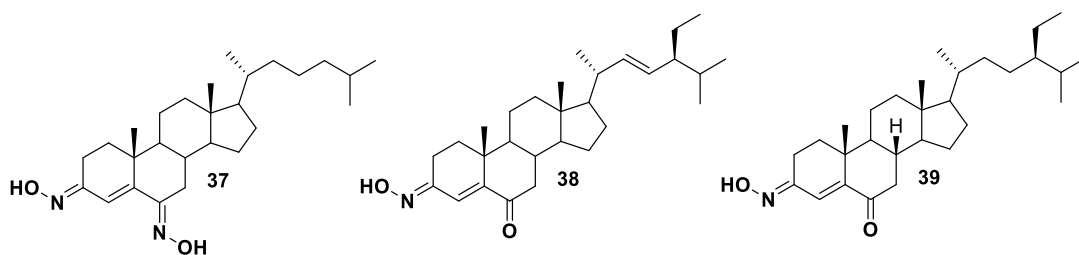


Figura 7. Oximas esteroidales derivadas de colesterol (**37**), estigmasterol (**38**) y β -sitosterol (**39**).

Agouridas V. *et al.*, en el 2009 describen la síntesis de nuevos esteroides 11β sustituidos, utilizando como núcleo al fulvestrant (**3**; Figura 8), posteriormente evaluaron la concentración de hormonas (estradiol) en las células de adenocarcinoma de mama (MCF-7), observando que los nuevos esteroides bajan los niveles hormonales en las células y relacionan esta baja concentración de estradiol (**10**) con la actividad antiproliferativa, concluyendo que los derivados sintetizados de fulvestrant tienen potencial como agentes antagonistas de receptores a estrógenos (Agouridas V. *et al.*, 2009).

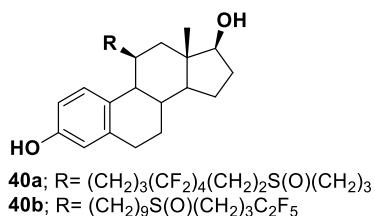


Figura 8. Derivados de fulvestrant.

En las pruebas de citotoxicidad de los derivados esteroidales de 5β -androstano y ergostano (**41**, **42**; Figura 9) en líneas celulares de cáncer (MCF-7 y RPMI-8226) y células de fibroblasto humano (BJ), utilizando como control 28-homocastasterona, se observaron que los derivados de ergostano (**41** y **42**), tuvieron mayor actividad que los derivados correspondientes de androstano. El compuesto **41** presentó valores de IC_{50} de $25.7 \pm 4.3 \mu M$ para MCF-7 y $23.5 \pm 3.5 \mu M$ para RPMI-8226, mientras que para **42** los valores fueron de $40.4 \pm 3.9 \mu M$ para MCF-7 y $27.0 \pm 0.04 \mu M$ para RPMI-8226. (Slavikova V. *et al.*, 2008).

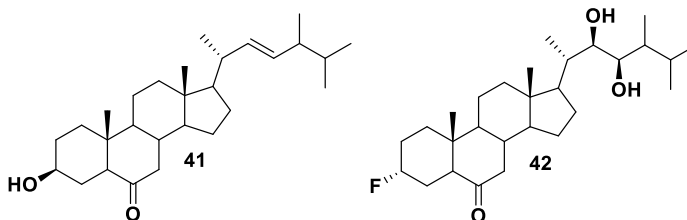


Figura 9. Derivados esteroidales ergostano (**41**, **42**).

En 1996, se evaluó el efecto del acetato de nomegestrol (**43**) y la progestina (**44**; Figura 10), sobre las enzimas estrona sulfatasa y el 17 β -hidroxiesteroide, en células de cáncer de mama MCF-7 y T-4D7, para ello utilizaron dosis fisiológicas de sulfato de estrona como control. El acetato de nomegestrol (**43**) bloqueó de forma eficaz la actividad de las enzimas, impidiendo la biosíntesis de estrógenos a estradiol (**10**). Con esto llegaron a la conclusión que el nomegestrol (**43**) reduce los niveles de estrógenos en el organismo, por lo que existe la posibilidad de realizar terapias clínicas con este compuesto (Chetrite G. *et al.*, 1996).

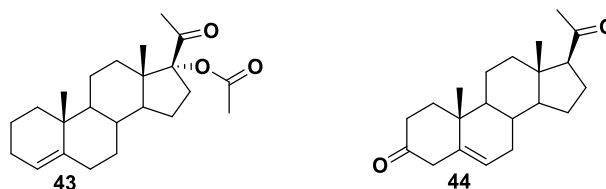


Figura 10. Acetato de nomegestrol (**43**) y la progestina (**44**).

He Z. *et al.*, en el 2014, realizaron experimentos *in vitro* para investigar la actividad de la diosgenina (**30**) en el proceso de migración de las células MDA-MB-231, mediante un ensayo de Transwell. Los resultados demostraron que la diosgenina tiene un impacto en el comportamiento migratorio de las células MDA-MB-231 que no depende de la concentración. Además, encontraron que la diosgenina inhibe la polimerización, la fosforilación de Vav2 y la activación de Cdc42, esto es atribuido al potencial antimetastático de la diosgenina, por lo que estos resultados vislumbran el potencial terapéutico de este compuesto en el tratamiento del cáncer de mama (He Z. *et al.*, 2014).

En el 2001 Moalic S. *et al.*, realizaron una investigación sobre el efecto de la diosgenina (**30**) en la proliferación de las células de osteosarcoma humano 1547, probando los efectos de este esteroide en las ciclooxygenasas; los tratamientos con diosgenina causaron una inhibición en la proliferación de las células cancerígenas, deteniendo el ciclo celular en la fase G1, provocando muerte celular por procesos apoptóticos (Moalic S. *et al.*, 2001).

Ghosh D. *et al.*, en el 2012 obtuvieron derivados esteroidales 6 β -alcoxi sustituidos a partir de androstan-1,4-dien-3,17-diona (Figura 11). La actividad antiproliferativa de los nuevos derivados se realizó en células de cáncer de mama MCF-7 utilizando como controles al letrozol, exemestano

(2) y formestano (4). Todos los derivados de androsta-1,4-dien-3,17-diona tuvieron mayor actividad antiproliferativa que los controles 2 y 4 (IC_{50} de 50.01 y 48.6 nM, respectivamente), de los cuales los esteroides 45a y 45b fueron los que mostraron mayor actividad con valores de IC_{50} de 12 y 20 nM, respectivamente (Ghosh D. *et al.*, 2012).

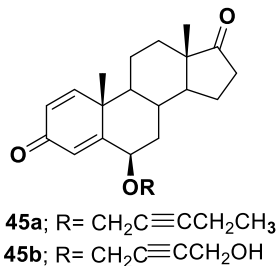


Figura 11. Derivados esteroidales de androsta-1,4-dien-3,17-diona.

Los efectos de los brasinoesteroides (Figura 12); 24-epibrasinólido (46; IC_{50} de 60 ± 3.1 para LNCaP y 65 ± 0.9 μM para DU-145) y 28-homocastasterona (47; IC_{50} de 45 ± 2.3 para LNCaP y 45 ± 2.8 μM para DU-145) se evaluaron en líneas celulares de cáncer de próstata humano sensibles a hormonas e insensibles a ellas (LNCaP y DU-145, respectivamente), mediante citometría de flujo y ensayos de inmunofluorescencia, los estudios indicaron que estos esteroides naturales inhiben el crecimiento celular en la fase G1 en las células LNCaP, lo que sugiere que el proceso de muerte celular es mediante apoptosis (Steigerová J. *et al.*, 2012).

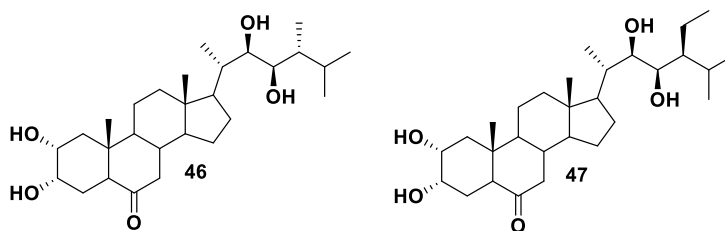


Figura 12. 24-epibrasinólido (46) y 28-homocastasterona (47).

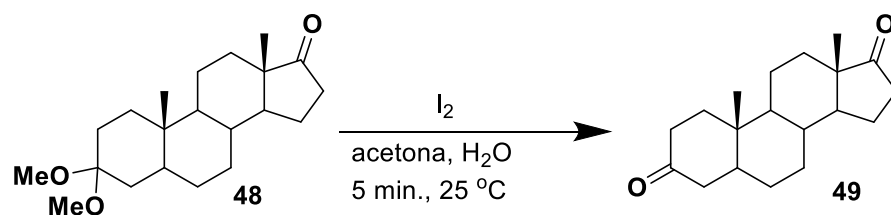
3.2. Modificaciones sintéticas en esteroides efectuadas por I₂.

La transformación selectiva de los grupos funcionales en las moléculas para obtener los compuestos deseados, es una de las tareas más importantes para la síntesis orgánica debido a que permiten obtener moléculas con actividades biológicas importantes (Jereb *et al.*, 2011). El interés de la industria farmacéutica en las aplicaciones de los esteroides, ha llevado a desarrollar estrategias de síntesis que permitan la obtención de este tipo de compuestos.

El empleo de yodo molecular en la modificación estructural de diversos tipos de compuestos orgánicos en reacciones de oxidación, hidrólisis, cicloadición, reducción, etc., ha abierto una ruta para que se aplique en los esqueletos esteroideos permitiendo así, una mayor diversidad estructural en este tipo de compuestos. El yodo es un reactivo que se encuentra con frecuencia en productos naturales, fármacos, materiales funcionales y productos agroquímicos, es el oxidante más débil de los halógenos, es poco electrofílico y a menudo necesita de la presencia de un ácido fuerte o un oxidante (Banerjee *et al.*, 2006).

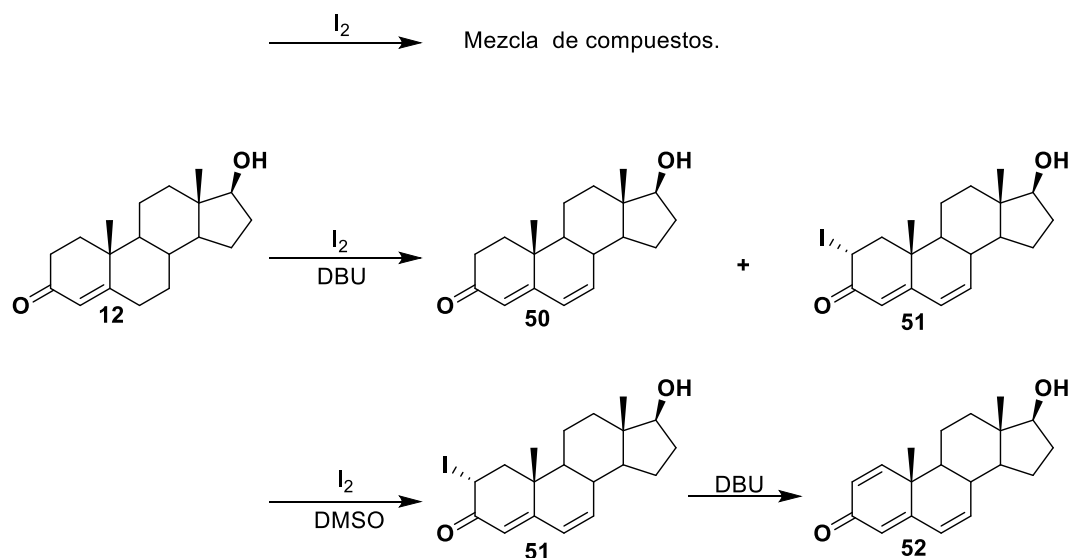
Es soluble en disolventes orgánicos y tiene poca solubilidad en agua, una de las características más notables de esta molécula es su capacidad para formar asociados como iones yoduros o triyoduros. Una de sus características es que presenta ventajas sobre catalizadores como los ácidos de Lewis y en especial ante los catalizadores metálicos, su actividad catalítica es amplia, siendo tolerante al agua, relativamente barato y es amigable con el medio ambiente (Sun *et al.*, 2014). Algunas de las reacciones donde se ha empleado el yodo molecular en esteroides son en desprotecciones, deshidrogenaciones y aromatización.

Se ha descrito en la literatura que la desprotección del cetal de la androstan-3,17-diona (**49**), empleando cantidades catalíticas de yodo molecular (10 moles %) en condiciones neutras utilizando acetona como disolvente (Esquema 3). De una serie de distintos compuestos orgánicos se observó que los dobles enlaces del grupo acetato y el grupo hidroxilo no sufren modificaciones bajo estas condiciones (Kottawar *et al.*, 2013).



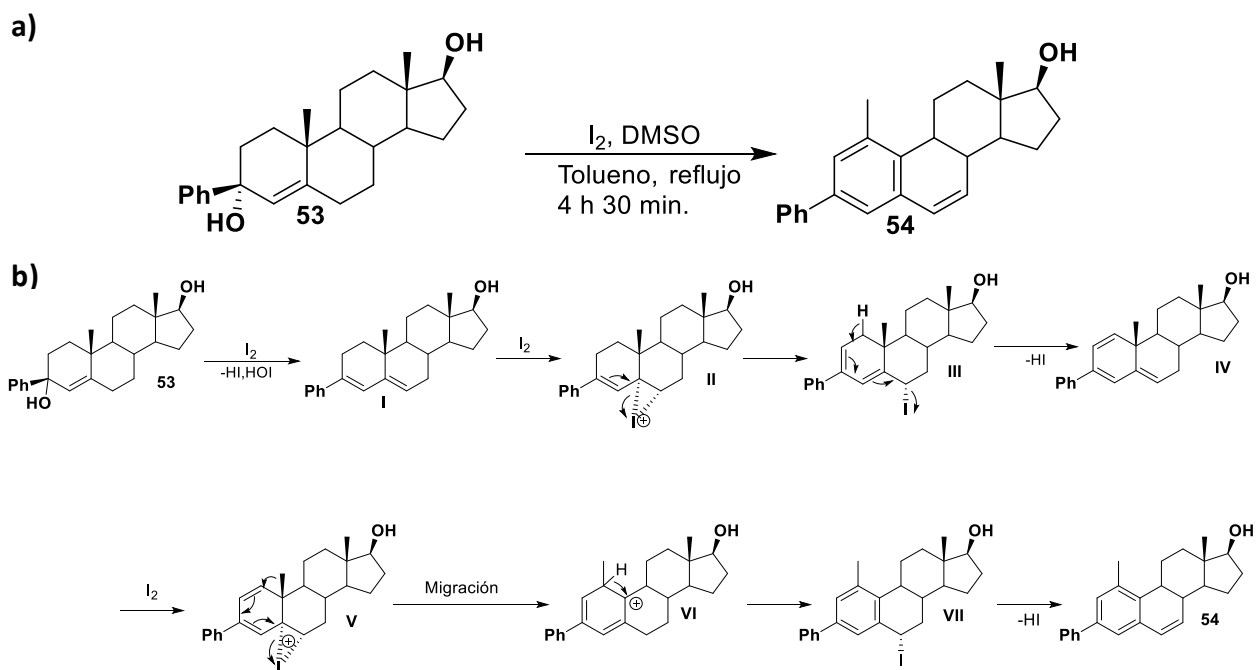
Esquema 3. Desprotección de cetales con I₂.

En el grupo de investigación de Sun *et al.*, realizaron una reacción con testosterona (**12**), empleando I₂ lo que propició la formación de múltiples productos, sin embargo, mostró selectividad hacia la obtención de productos deshidrogenados (**50** y **51**) al cambiar de disolvente y variar los equivalentes de I₂. El tratamiento del compuesto **51** con diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU), produjo el complejo 1, 4,6-trienona **52** (Sun *et al.*, 2004; Esquema 4).



Esquema 4. Reacción de deshidrogenación de la testosterona (**12**) con I₂.

En otro proyecto Sun *et al.*, realizaron la aromatización del arilciclohexenol derivado de testosterona (**12**; Esquema 5a), empleando I₂ en presencia de DMSO como agente oxidante. La síntesis inicia con la deshidratación del alcohol terciario por la acción del I₂, formando el dieno **1** (Esquema 5b), la subsecuente adición de otra molécula de I₂, genera dos deshidrogenaciones y ocasiona la migración del metilo del C-10 al C-1, para formar el bifenil **54** (Sun *et al.*, 2004).



Esquema 5. a) Aromatización del arilciclohexanol (**53**) y b) mecanismo de reacción para la obtención de **54**.

4. JUSTIFICACIÓN.

Actualmente se conoce que los esteroides presentan por si solos importantes actividades biológicas, tal es el caso de la diosgenina que inhibe la proliferación celular y causa muerte por procesos apoptóticos en líneas celulares cancerígenas (Moalic S., *et al.*, 2001). Además, se han descrito esteroides 3,6 disustituidos con actividad antiproliferativa como el exemestano y (6E)-hidroximino-24-etilcoleston-4-en-3-ona (Medioni J., 2016; Cui J., *et al.*, 2008). Por lo que la funcionalización de estructuras esteroideas mediante síntesis orgánica puede proporcionar nuevos compuestos con alto potencial biológico que pueden ser utilizados como agentes con actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer.

5. HIPÓTESIS.

Los esteroides 6-metoxi-4,6-dien-3-ona sintetizados presentarán actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares de cáncer de adenocarcinoma de mama, MCF-7 y MDA-MB-231.

6. OBJETIVO PRINCIPAL.

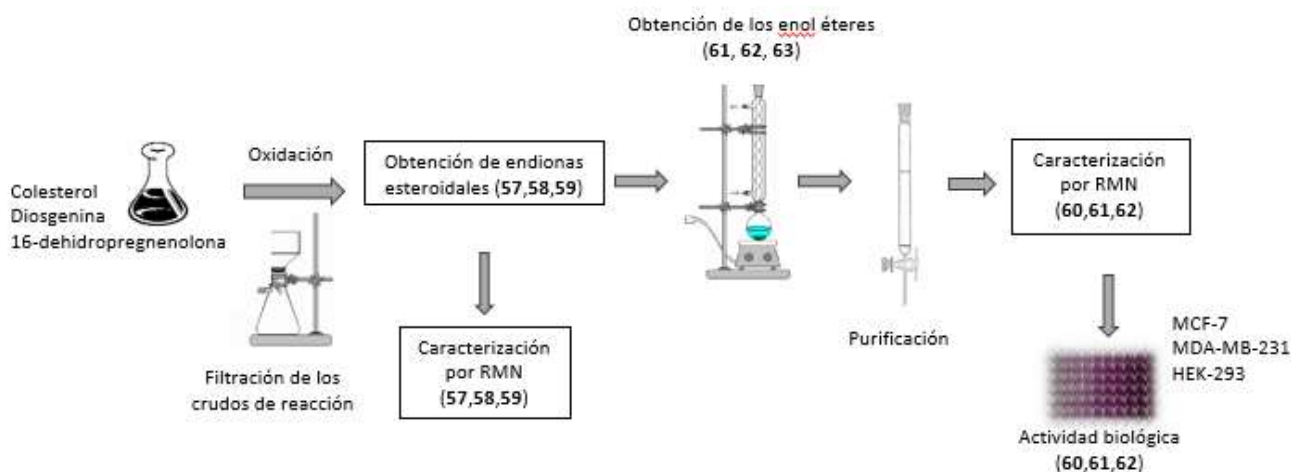
Evaluar la actividad antiproliferativa de los esteroides 6-metoxi-4,6-dien-3-ona, en dos líneas celulares de cáncer de mama.

7. OBJETIVOS SECUNDARIOS.

- Síntesis de esteroides enol éteres a partir de las endionas de colesterol, diosgenina y 16-dehidropregnenolona.
- Realizar la caracterización química de los compuestos obtenidos.
- Efectuar la evaluación antiproliferativa de los esteroides enol éteres sintetizados.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

La metodología que se siguió para efectuar la evaluación de la actividad antiproliferativa de los sistemas esteroideos 3,6-sustituídos (**60**, **61**, **62**) se dividió en síntesis y evaluación biológica (Esquema 6). La síntesis inició con la oxidación de las materias primas (**6**, **30**, **33**) con el reactivo de Jones y se caracterizaron los crudos de reacción de los esteroides (**57**, **58** y **59**), posteriormente se trataron los sistemas 4-en-3,6-dionas esteroideos con I₂ para obtener los enol éteres (**60**, **61** y **62**) y se caracterizaron mediante RMN. Finalmente, se evaluó la actividad antiproliferativa de los esteroides **60**, **61** y **62**, con el ensayo MTT en dos líneas celulares de adenocarcinoma de mama (MCF-7, MDA-MB-231) y una de células de fibroblasto de riñón (HEK-293), utilizando como control positivo células tratadas con doxorubicina.



Esquema 6. Estrategia experimental para la síntesis y evaluación anti proliferativa de esteroides 3,6-sustituídos.

8.1. Preparación del reactivo de Jones.

8.1.1. Reactivo a una concentración de 2.19 M.

En un vaso de precipitado provisto de agitación magnética, se colocó 1 g de CrO₃ y se adicionó con mucha precaución gota a gota 0.86 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla del ácido y CrO₃ se diluyó con H₂O destilada a un volumen final de 3.7 mL manteniendo el vaso de precipitado en un baño de hielo por un tiempo de 30 min.

8.1.2. Reactivo a una concentración de 0.25 M.

En un vaso de precipitado provisto de agitación magnética, se colocó 6.7 g de CrO_3 y se adicionó con mucha precaución gota a gota 5.8 mL de H_2SO_4 concentrado. La mezcla del ácido y CrO_3 se diluyó con H_2O destilada a un volumen final de 19.2 mL manteniendo el vaso de precipitado en un baño de hielo por un tiempo de 30 min.

8.2. Procedimiento para la obtención de 4-en-3,6-dionas esteroidales (57, 58, 59).

En un matraz balón de 50 mL provisto de agitación magnética a temperatura ambiente, se disolvió diosgenina (**30**, 1 g, 2.41 mmol), colesterol (**6**, 1 g, 2.58 mmol) o 16-dehidropregnenolona (**33**, 1 g, 3.18 mmol), en una mezcla de CH_2Cl_2 (10 mL)/acetona (15 mL), cuando el esteroide no se disolvió adecuadamente se agregó una cantidad adicional de CH_2Cl_2 hasta tener una mezcla traslúcida (*Shirini et al.*, 2005; *Mphahlele*, 2009; *Hunter, A. et al.*, 2006)

A la disolución del esteroide se le añadió el reactivo de Jones recién preparado gota a gota (4.56 mL). La reacción se monitoreó cada 10 min. con ayuda de CCF utilizando una mezcla de disolventes Hexano/AcOEt (7:3), hasta observar por placa que el esteroide se consumió por completo. Para inactivar la reacción se añadió isopropanol poco a poco hasta que ocurrió un cambio de coloración en la reacción, de naranja a verde.

La mezcla de reacción, se filtró al vacío empleando un matraz Kitazato y un embudo Büchner que contenía celita como fase estacionaria. La endiona se arrastró con ayuda de CH_2Cl_2 destilado.

Por último, en un matraz balón previamente pesado se retiró el exceso de disolvente con ayuda de un rotavapor, el residuo se analizó por RMN y se sometió a la siguiente reacción sin previa purificación.

8.3. Procedimiento para la obtención de los enol éteres (60, 61, 62).

En un matraz bola de dos bocas provisto de agitación magnética se colocaron las 4-en-3,6-dionas esteroidales derivadas de diosgenina (**57**, 0.4 g, 0.942 mmol), colesterol (**58**, 0.4 g, 1.002 mmol) y 16-dehidropregnenolona (**59**, 0.4 g, 1.22 mmol), y se disolvieron en MeOH (50 mL); se agregó cuidadosamente cantidades catalíticas de I_2 (10% mol). La reacción se mantuvo a reflujo, y se monitoreó por CCF cada 30 min. hasta que se observó el consumo total de la materia prima. La

reacción se detuvo agregando una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2 cristales de reactivo en 10 mL de H_2O destilada) poco a poco hasta que se observó un cambio en la coloración.

A la mezcla de reacción se le realizaron extracciones con CH_2Cl_2 (2 x 30 mL) y la fase orgánica se lavó con salmuera y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente el sistema Hexano/ AcOEt (8:2) obteniéndose 134.2 mg para el compuesto **60**, 200 mg para el compuesto **61**, y 75 mg para el compuesto **62**, con rendimientos del 50%, 67.1% y 37.5 % respectivamente para cada esteroide.

6-metoxicolestan-4,6-dien-3-ona (60):

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.24 (1H, s, H-4), 5.16 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7), 3.58 (3H, s, H-6'), 2.54 (1H, ddd, $J = 17.91, 14.4, 5.3$ Hz, H-2 β), 1.11 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.87 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-26), 0.86 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-27), 0.76 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 199.8 (C-3), 159.4 (C-5), 149.9 (C-6), 119.3 (C-4), 109.1 (C-7), 56.1 (C-17), 54.5 (C-6'), 54.3 (C-14), 51.0 (C-9), 43.2 (C-13), 39.5 (C-24), 39.4 (C-12), 36.3 (C-10), 36.0 (C-22), 35.7 (C-20), 35.4 (C-8), 34.14 (C-1), 33.6 (C-2), 28.1 (C-16), 27.9 (C-25), 23.8 (C-15), 23.8 (C-23), 22. (C-26), 22.5 (C-27), 20.6 (C-11), 18.6 (C-21), 16.4 (C-19), 12.0 (C-18).

(25R)-6-metoxiespirostan-4,6-dien-3-ona (61):

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.24 (1H, s, H-4), 5.12 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-22), 4.44 (1H, ddd, $J = 7.5$ Hz, H-16), 3.59 (1H, s, H-6'), 3.38 (3H, dd, $J = 10.89$, H-26), 2.54 (1H, ddd, $J = 17.91, 14.4, 5.3$ Hz, H-2 β), 1.13 (1H, s, H-19), 0.98 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-21), 0.88 (1H, s, H-18), 0.80 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-27).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 199.7 (C-3), 159.0 (C-5), 150.6 (C-6), 119.5 (C-4), 109.2 (C-22), 108.3 (C-7), 80.4 (C-16), 66.9 (C-26), 62.1 (C-17), 54.7 (C-6'), 54.2 (C-14), 51.1 (C-9), 41.6 (C-20), 41.3 (C-13), 39.6 (C-12), 36.4 (C-10), 35.0 (C-8), 34.2 (C-1), 33.6 (C-2), 31.4 (C-23), 31.3 (C-15), 30.2 (C-25), 28.8 (C-24), 20.4 (C-11), 17.1 (C-27), 16.5 (C-19), 16.3 (C-18), 14.5 (C-21).

6-metoxipregnan-4,6,16-trien-3,20-diona (62):

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.75 (1H, dd, *J*= 1.83, 1.86, 3.41 Hz, H-16), 6.24 (1H, s, H-4), 5.12 (1H, d, *J*= 2.24 Hz, H-7), 3.60 (1H, s, H-6'), 2.54 (1H, ddd, *J*= 17.91, 14.4, 5.3 Hz, H-2β), 2.27 (1H, s, H-21), 1.13 (1H, s, H-19), 0.97 (1H, s, H-18).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: 199.7 (C-3), 196.6 (C-20), 159.0 (C-5), 155.1 (C-17), 150.4 (C-6), 143.7 (C-16), 119.7 (C-4), 107.8 (C-7), 54.7 (C-6'), 54.5 (C-14), 51.5 (C-9), 46.8 (C-13), 36.5 (C-10), 34.4 (C-1), 34.0 (C-12), 33.7 (C-8), 33.6 (C-2), 31.9 (C-15), 27.1 (C-21), 20.5 (C-11), 16.3 (C-19), 15.9 (C-18).

8.2. Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas precortadas provistas de fase estacionaria de gel de sílice (SiO₂) grado 60 de 0.2 mm de espesor ALUGRAM Xtra SIL G/UV254 de Macherey-Nagel. Como la fase móvil, se utilizó el sistema de disolventes Hexano/AcOEt que permitió obtener el mejor sistema para predecir el comportamiento de los nuevos esteroides en una columna cromatográfica para su aislamiento y purificación.

Para el revelado de las placas se utilizó luz ultravioleta de onda corta y de onda larga (254 nm y 365 nm, respectivamente, lámpara UVG-11); inmersión en H₂SO₄ al 50% para posteriormente someterlas a una parrilla de calentamiento a 100°C durante 5-10 minutos; inmersión en una solución de KMnO₄ al 0.74% y calentamiento durante 5-10 minutos.

Para la determinación del factor de retención (R_f) de los productos de reacción, se utilizó la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

8.3. Aislamiento y purificación.

Para la obtención de las endionas esteroidales se utilizó un sistema que constaba de un embudo buchner y un matraz kitasato al vacío, empleando como fase estacionaria celita y como fase móvil CH_2Cl_2 destilado.

En cuanto a la purificación de los enol éteres, se empleó como fase estacionaria gel de sílice de 230-400 mallas MN Kieselgel 60 de Macherey-Nagel y como fase móvil se utilizaron los sistemas de disolventes obtenidos en CCF para los diferentes crudos de reacción. Para la recolección de las fracciones de cada columna se utilizaron tubos de ensaye.

8.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de RMN se obtuvieron con un equipo VARIAN 400MR, a 400 MHz para los espectros de ^1H y a 100 MHz para los de ^{13}C . Como disolvente se utilizó CDCl_3 (99.8% D, Aldrich) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Se agregaron de 4-20 mg de la muestra en un vial pequeño, se añadieron de 0.5-0.7 mL de CDCl_3 (99.8% D), se mezcló en el vial y se transfirió la solución a un tubo de RMN con ayuda de una pipeta pasteur, se comprobó el nivel de la muestra en el tubo y cuando fue necesario, se agregaron gotas de disolvente para llevar la disolución al nivel recomendado para el análisis en el equipo. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm, las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales en ^1H están definidas como; "s" para una señal simple, "d" para una señal doble, "dd" para una señal doble de dobles, "ddd" para una señal doble de doble de dobles. La manipulación de los FIDs (Free Induction Decay) se realizó en el software MestReNova versión 9.0.1.

8.5. Disolventes y materias primas.

Los reactivos fueron grado analítico. Los disolventes de grado técnico se destilaron para su posterior uso.

8.6. Ensayo MTT.

El ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), es una técnica cuantificable y colorimétrica, en el cual se utiliza un lector de placas a 545 nm, usualmente es implementada en ensayos de citotoxicidad y proliferación celular, la cual se basa en la reducción de una sal de tetrazolio por acción de las enzimas mitocondriales succinato-deshidrogenasa a cristales de formazano, un compuesto de tonalidad azul (la cantidad de células teñidas es igual a los cristales de formazano formados), únicamente las células que no han sido dañadas realizan la reducción del MTT, esta técnica permite observar la actividad mitocondrial, así como la viabilidad celular (Mosmann T. 1983).

8.6.1. Procedimiento para evaluar la actividad antiproliferativa de los enol éteres (60, 61, 62).

Se realizó la evaluación de la actividad anticancerígena de los esteroides 6-metoxi-4,6-dien-3-ona (60, 61 y 62) a través del ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) con las líneas celulares de adenocarcinoma de mama MCF-7 y MDA-MB-231 y para las células normales HEK-293 (Mosmann, 1983; Darzynkiewicz *et al.*, 2001).

8.6.2. Condiciones del medio.

Con la finalidad de obtener mejores resultados y proporcionar durante el ensayo de MTT las mejores condiciones a las células se les adicionó: medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), antibiótico (penicilina/estreptomicina) al 1% (m/v) y L-glutamina al 1% (v/v).

8.6.3 Cultivo de células.

1. En una caja petri con 10 mL de medio se colocaron las células crioconservadas en DMSO, se dejaron reposar por cuatro horas y se cambió el medio por uno nuevo para eliminar el DMSO de las células, posteriormente se incubaron las células durante 24 h a 37°C con un 5% de CO₂ y una humedad del 92%.
2. Se retiró el medio de la caja petri con ayuda de una pipeta automática, se lavó la superficie de la caja con ayuda de medio normal y posteriormente se agregó 1 mL de tripsina para despegar las células. Las células se observaron al microscopio para corroborar que se

realizó el levantamiento con éxito, se agregaron 5 mL de medio completo para inactivar el efecto de la enzima, se trasvaso el contenido de la caja petri a un tubo falcon y se llevó a la centrifuga en condiciones de 1000 rpm a 4°C durante 10 min.

3. Una vez obtenido el botón de células se decantó el medio y se homogenizó en 1 mL de DMEM. El conteo de la densidad celular se realizó en una cámara de Neubauer.

8.6.5. Ensayo MTT: Determinación de la viabilidad celular.

1. En una placa de 6 pocillos se colocaron 1500 μ L del medio DMEM que contuviera el equivalente a 40,000 células. Se sometió la placa a incubación a una temperatura de 37°C, con CO₂ al 5% y humedad del 92% durante 24 h.
2. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron el medio de cultivo con el compuesto a evaluar (de acuerdo a la concentración determinada). Cada ensayo se acompañó de por lo menos tres controles y se incubaron en las condiciones descritas anteriormente.
3. Posteriormente, se retiró el medio de la placa y se adicionaron 10 μ L del reactivo MTT por cada 200 μ L de medio, y se incubó nuevamente entre 4-6 horas a 37°C, con 5% de CO₂ y 92% de humedad.
4. Transcurrido el tiempo se retiró el medio y se dejó secar el exceso de líquido por lo menos 24 h.
5. Finalmente se midió la absorbancia que presentó la muestra a 570 nm, disolviendo los cristales de formazano con ayuda de isopropanol a un volumen final de 2 mL en cada celda.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

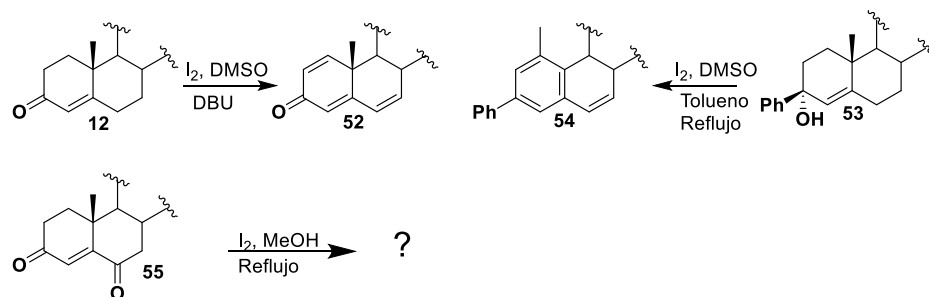
9.1. Síntesis química.

9.1.1. Materias primas

El colesterol (**6**), está asociado a problemas de salud en el sistema circulatorio, provocando enfermedades como las enfermedades cardiovasculares, por otro lado, también es un esteroide muy importante en el metabolismo de los mamíferos ya que es materia prima para la formación de hormonas esteroidales (testosterona **12** y estrógenos) y es crucial en el funcionamiento celular dando rigidez a las membranas celulares, por lo que evita la destrucción de las mismas. La diosgenina (**30**) es un esteroide que se halla en forma de glicósido en los tubérculos del ñame del género dioscorea y es un precursor importante en la industria para la obtención de varios productos como: anticonceptivos orales, hormonas sexuales y fármacos del tipo cortisona. Por último, el compuesto 16-dehidropregnenolona (**33**) es un intermediario para la síntesis de progesterona. (Olivares F.,2001; Saavedra O. M. *et al.*, 2012).

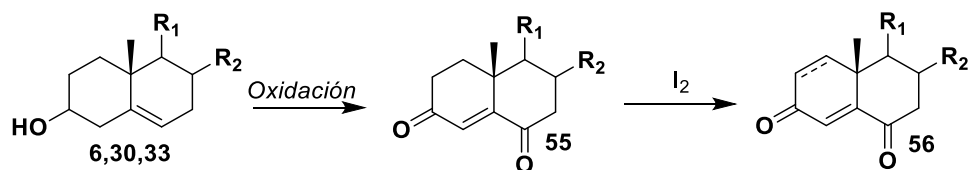
9.1.1.2. Ruta de síntesis.

Las reacciones de deshidrogenación de la enona de testosterona (**12**) (Sun *et al.*, 2004) y la aromatización del fenilciclohexenol (**53**) (Kottawar *et al.*, 2013) derivado de testosterona, usando iodo molecular, son un área de oportunidad para efectuar nuevas modificaciones en la estructura de un esteroide (Esquema 7). En este trabajo se exploró la reactividad de sistemas 4-en-3,6-dionas (**55**) usando I₂ molecular como catalizador de la reacción.



Esquema 7. Reacciones utilizando como catalizador I₂ molecular.

La ruta de síntesis, se inició con la oxidación del esteroide respectivo (colesterol **6**, diosgenina **30** o 16-dehidropregnenolona **33**; Esquema 8), con el reactivo de Jones para la obtención de la endiona esteroidal. La reactividad del sistema 4-en-3,6-diona (**55**) presente en estos derivados se evaluó frente a I₂ molecular con la finalidad de obtener los sistemas deshidrogenados en el anillo A o B.

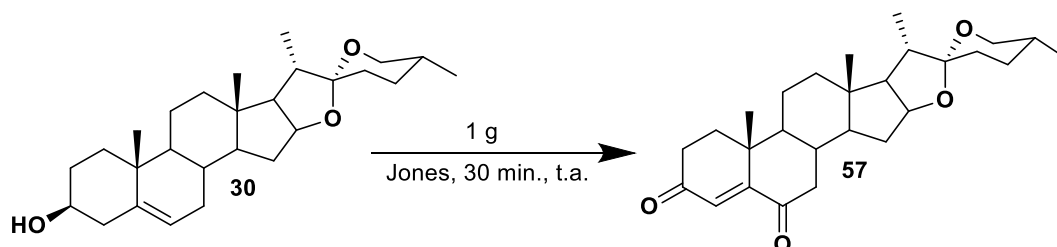


Esquema 8. Síntesis para la formación de endionas esteroidales.

En la elucidación de los productos de síntesis obtenidos se emplearon experimentos de RMN en 1D y 2D para observar las modificaciones que sufre la estructura esteroidal comparando los espectros de las materias primas con los espectros de los productos obtenidos.

9.1.1. Obtención de 3,6-endionas.

9.1.1.1. Síntesis de (25*R*)-espirostan-4-en-3,6-diona (**57**).



Esquema 9. Obtención del (25*R*)-espirostan-4-en-3,6-diona (**57**).

La oxidación de la diosgenina (**30**) para formar la endiona esteroidal (**57**; Esquema 9), se efectuó con el método de oxidación con reactivo de Jones con la metodología de Farhad Shirini con algunas modificaciones y se obtuvo una baja conversión de la materia prima (aprox. 10 %), el compuesto purificado se observó por CCF como una mezcla de compuestos (Tabla 1, experimento 1). Este resultado se mejoró al poner como reactivo en exceso al ácido crómico, obteniendo una conversión completa de la materia prima a la endiona esteroidal (**57**) en un menor tiempo (Tabla 1, experimento 2). El crudo de la segunda reacción se analizó con RMN de ¹H y ¹³C y se corroboró la formación completa a la endiona esteroidal (**57**) que se utilizó sin previa purificación en la siguiente reacción. Para entender de forma adecuada el comportamiento de la diosgenina (**30**)

en la reacción de oxidación, se compararon los espectros de ^{13}C de la materia prima y el producto de reacción (Figura 13).

Tabla 1. Condiciones para la síntesis de (25*R*)-espirostan-4-en-3,6-diona (**57**).

Experimento	1	2
Diosgenina	5 g (12.06 mmol)	1 g (2.41 mmol)
Disolventes	CH_2Cl_2 /acetona	CH_2Cl_2 /acetona
Jones	1.5 mL (0.375 mmol) ¹	4.56 mL (9.98 mmol) ²
Temperatura	Ambiente	Ambiente
Tiempo	3 h	30 min.
Conversión	10%	100%

Reactivo 1, Reactivo 2

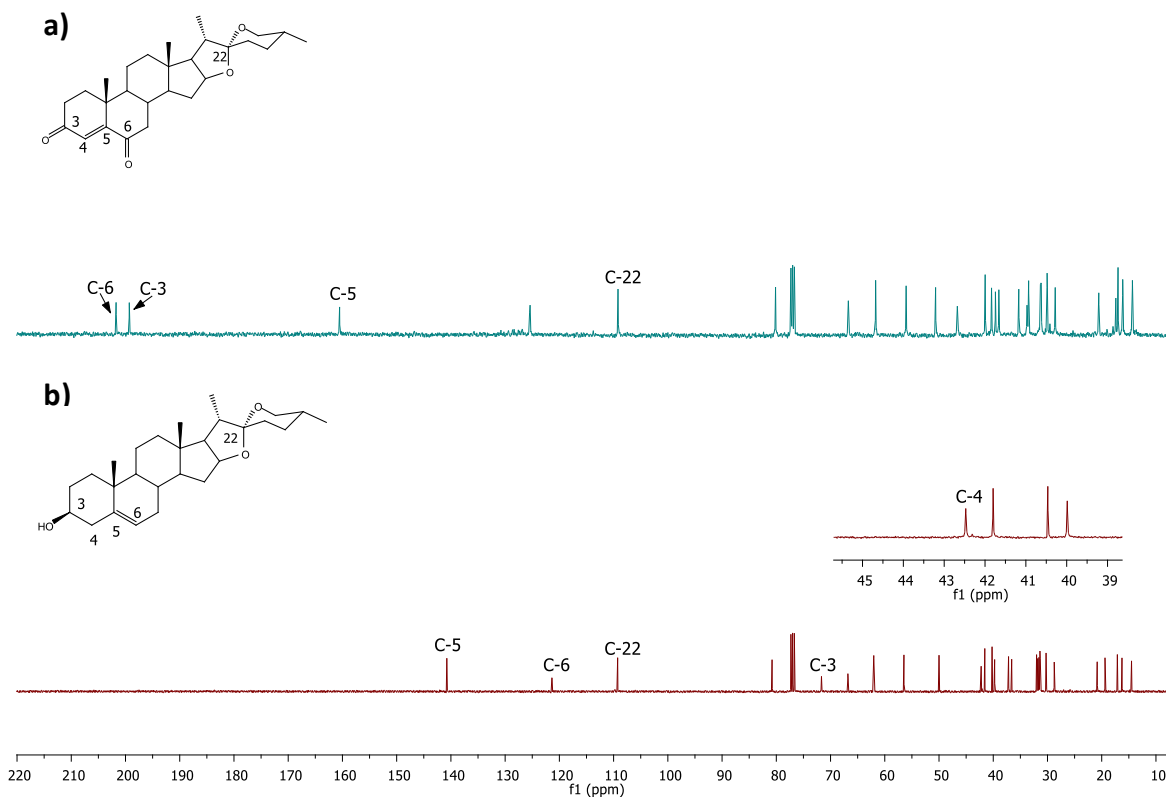
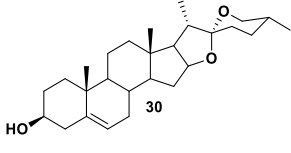
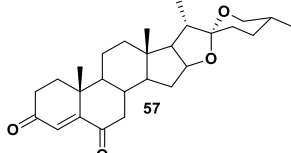


Figura 13. Comparación de los espectros de RMN de ^{13}C a) diosgenina (**30**) y b) endiona esteroidea (**57**).

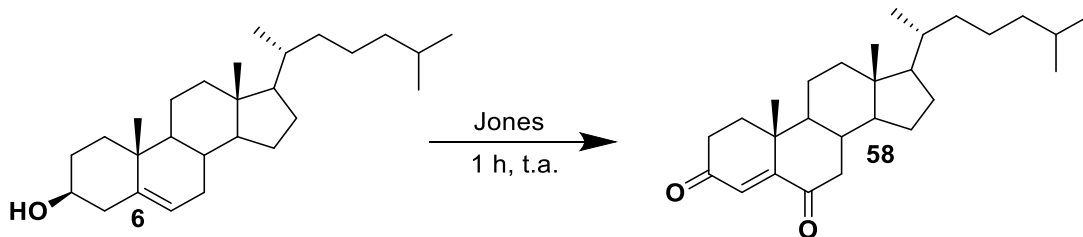
Con respecto al experimento de ^{13}C se observó que la única parte de la estructura que sufre un cambio estructural eran los anillos A y B. Primero se compararon los carbonos unidos a oxígeno, observando que las posiciones C-16 y C-22 no presentaron un cambio significativo en los

desplazamientos químicos, para C-16 y C-22 se observó un δ 81.02 y 109.49 en la materia prima contra δ 80.73 y 109.43 en el producto. Sin embargo, los desplazamientos químicos de C-3 y C-6 variaron significativamente al pasar de la diosgenina a la endiona, de 71.91 y 121.73 ppm contra 199.69 y 202.67 ppm en el producto, con lo cual se corroboró que estas posiciones sufrieron una oxidación hacia cetonas. Al comparar los desplazamientos químicos de los metilos de las posiciones C-18, C-19, C-21 y C-22, no se observaron diferencias significativas entre los espectros de la materia prima y el producto (Tabla 2), así mismo, la señal asignada a C-4 mostró cambios significativos entre la materia prima y el producto (42.47 ppm vs 119.54 ppm).

Tabla 2. Comparación de los δ (ppm) representativos de la diosgenina (**30**) y su endiona (**57**).

Posición de carbono	Diosgenina	Endiona
		
3	71.9	199.7
4	42.5	119.5
5	141.0	159.0
6	121.7	202.7
16	81.0	80.4
18	16.5	16.3
19	17.4	16.5
21	14.7	14.5
22	109.5	109.2
27	19.6	17.1

9.1.1.2. Síntesis de colestan-4-en-3,6-diona (58).



Esquema 10. Obtención del colestan-4-en-3,6-diona (58).

En un primer ensayo (Esquema 10), se oxidaron 5 g de colesterol (6) con 0.03 equivalentes de ácido crómico por 3 h, sin embargo, por CCF se observó una transformación parcial de la materia prima. En un segundo ensayo, se utilizaron 3.9 equivalentes la materia prima y en exceso ácido crómico (1 equivalente; Tabla 3, experimento 2), con lo cual se logró la conversión completa, lo cual se corroboró mediante experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C .

Tabla 3. Condiciones para la síntesis de colestan-4-en-3,6-diona (58).

Experimento	1	2
Colesterol	5 g (12.9 mmol)	1 g (2.58 mmol)
Disolventes	CH_2Cl_2 /acetona	CH_2Cl_2 /acetona
Jones	1.5 mL (0.375 mmol) ¹	4.56 mL (9.98 mmol) ²
Temperatura	Ambiente	Ambiente
Tiempo	3 h	1 h
Conversión	46%	100%

Reactivo 1, Reactivo 2

Mediante RMN de ^{13}C se verificó la obtención de la endiona derivada de colesterol (**58**; Figura 14).

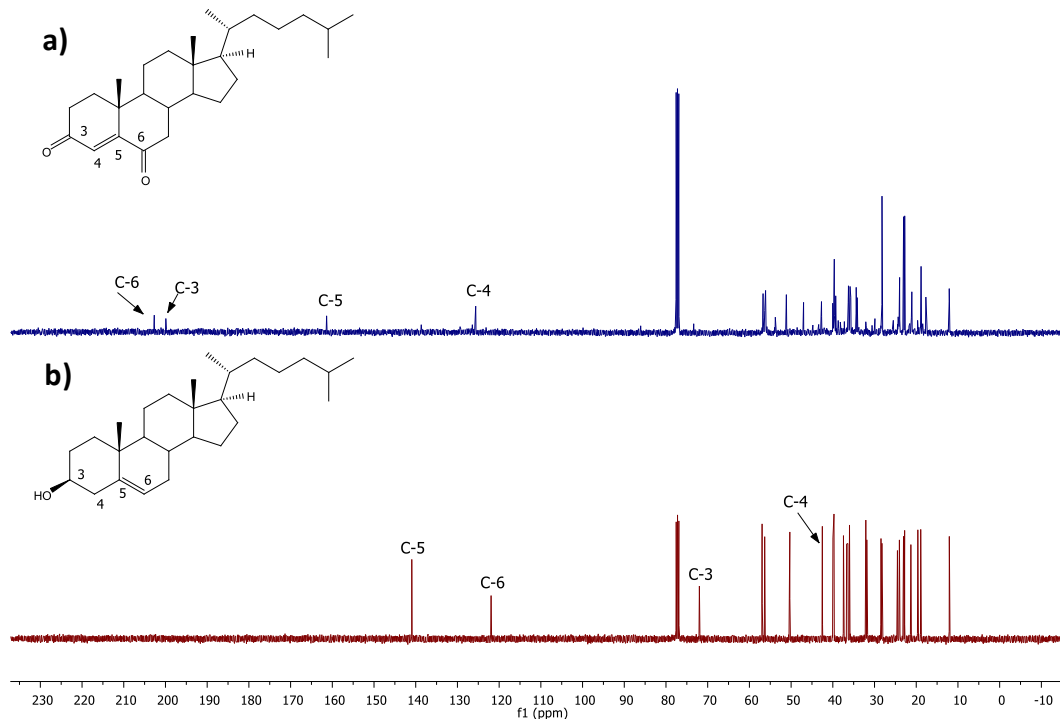
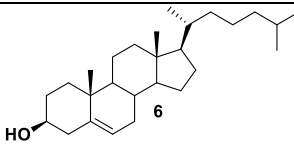
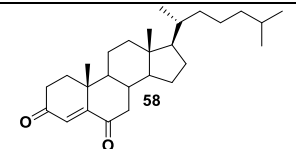


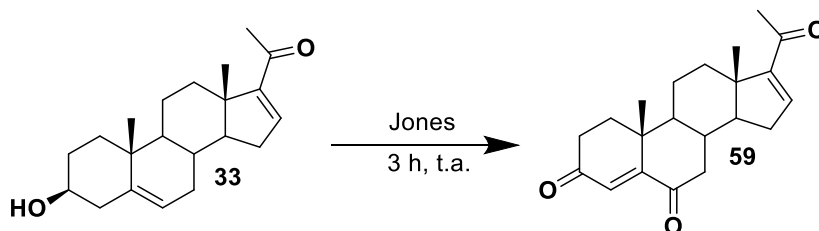
Figura 14. Espectros de RMN de ^{13}C de a) endiona **58** y b) colesterol (**6**).

En el espectro de ^{13}C de **58**, se observaron dos señales características pertenecientes a cetonas, en 199.90 y 202.67 ppm que confirmó la formación de una dicetona en la estructura. Además, el desplazamiento químico del carbono C-4 varió significativamente de 42.51 ppm para la materia prima a 125.61 ppm en la endiona **58**, debido al cambio de grupo funcional en esta posición (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de los δ (ppm) representativos del colesterol (**6**) y su endiona **58**.

Posición de carbono	Colesterol	Endiona
		
3	72.0	199.9
4	42.5	125.6
5	140.9	161.3
6	121.9	202.7
7	32.1	47.0
17	56.3	56.1
18	12.0	12.1
19	19.6	17.7

9.1.1.3. Síntesis de pregnan-4,16-dien-3,6,20-triona (**59**).



Esquema 11. Obtención de pregnan-4,16-dien-3,6,20-triona (**59**).

La obtención de la endiona esteroidal (**59**) a partir de 16-dehidropregnenolona (**33**; Esquema 11), se realizó con 0.12 equivalentes de reactivo de Jones y 1 equivalente de 16-dehidropregnenolona (**33**), obteniendo una baja transformación del esteroide (aproximado del 15%), por CCF se observó una mezcla de dos compuestos (Tabla 5, experimento 1). Para mejorar el rendimiento en la síntesis de la endiona (**59**), se incrementó el tiempo de reacción utilizando la misma cantidad de **33** y el agente oxidante en exceso. La reacción se monitoreó revelando con UV (254 y 365 nm) y con una solución de KMnO_4 al 0.75%, con lo cual se determinó que la materia prima no se consumió en su totalidad (conversión aproximada del 20%, Tabla 5, experimento 2).

Tabla 5. Condiciones para la síntesis del pregnan-4,16-dien-3,6,20-triona (**59**).

Experimento	1	2
16-dehidropregnenolona	1 g (3.18 mmol)	1 g (3.18 mmol)
Disolventes	CH ₂ Cl ₂ /acetona	CH ₂ Cl ₂ /acetona
Jones	1.5 mL (0.375 mmol) ¹	4.56 mL (9.98 mmol) ²
Temperatura	Ambiente	Ambiente
Tiempo	1 h	3 h
Conversión	15%	20%

Reactivo 1, Reactivo 2

En el análisis de la reacción de oxidación con el reactivo de Jones de la 16-dehidropregnenolona (**33**) se compararon los espectros de RMN de ¹³C entre el esteroide y el producto de oxidación, se observó el mismo patrón de señales en cuanto a los protones y carbonos que sufrieron cambios en grupos funcionales o ambientes químicos, similares a los observados en los derivados de diosgenina (**57**) y colesterol (**58**).

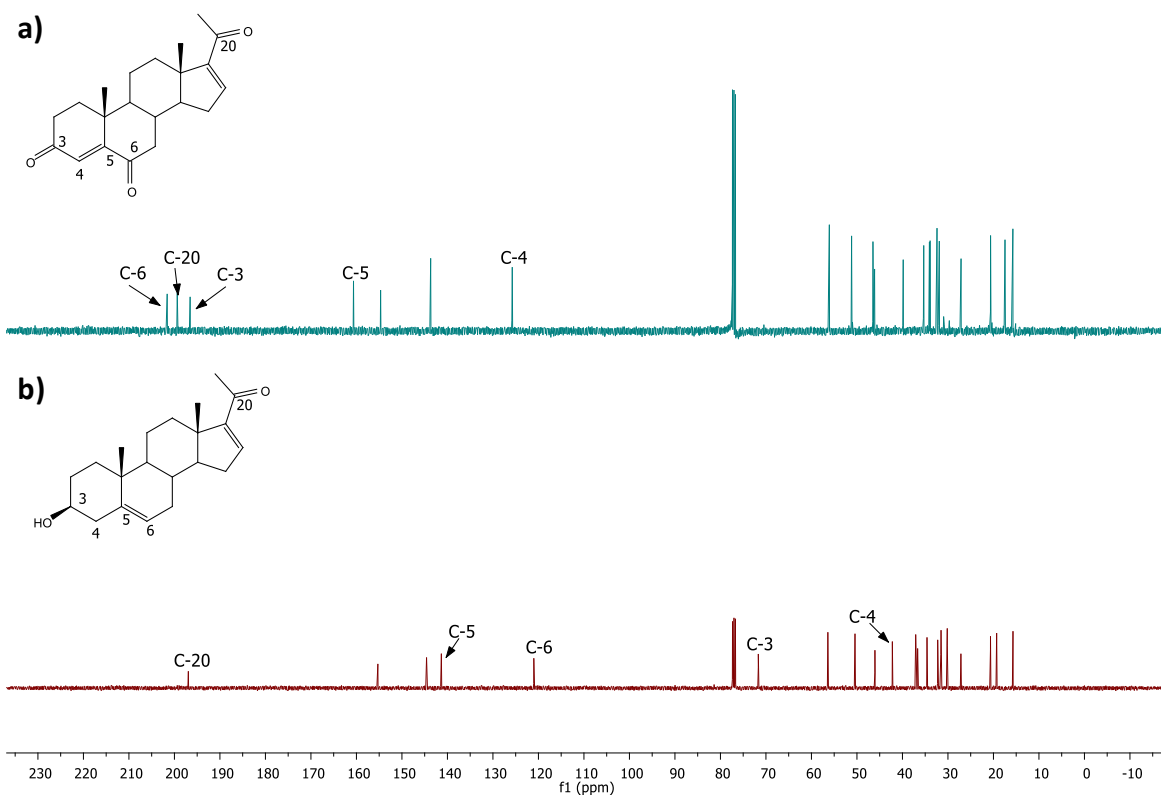
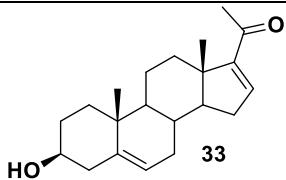


Figura 15. Espectros de RMN de ^{13}C a) endiona **59** y b) 16-dehidropregnenolona (**33**).

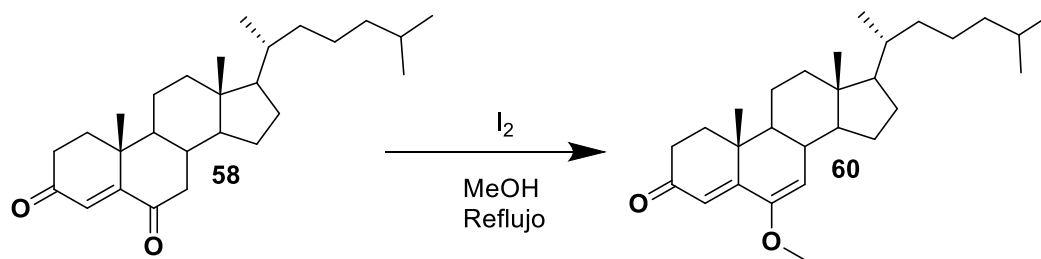
Al realizar el análisis en el espectro de ^{13}C de RMN entre la materia prima y el esteroide obtenido en la reacción de oxidación, se confirmó la presencia de una doble ligadura en el C-4 debido a los picos observados en 125.95 y 160.84 ppm, asignados a C-4 y C-5, respectivamente (Figura 15). Las señales en 199.58 y 201.79 ppm corroboraron la presencia de dos grupos cetonas, confirmando así la oxidación de las posiciones C-3 y C-6. El desplazamiento químico de C-4 varió considerablemente con respecto al espectro de la materia prima pasando de 46.25 ppm a 125.95 ppm, mientras que el pico asignado a C-5 se desplazó de 141.54 ppm a 160.84 ppm (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de los δ (ppm) representativos de la 16-dehidropregnenolona (**33**) y su endiona **59**.

Posición de carbono	16-dehidropregnenolona	Endiona
		 <chem>CC(=O)C1=CC=C2[C@@]1(CC[C@H]3[C@H]2CC=C4[C@@]3(CC[C@@H](C4)O)C)C</chem>
3	71.8	199.6
4	46.3	126.0
5	141.5	160.8
6	121.2	201.8
7	32.5	46.7
17	155.5	154.9
18	15.9	15.9
19	19.5	17.7
20	197.1	196.8

9.1.2 Obtención de los enol éteres.

9.1.2.1. Síntesis de 6-metoxicolestan-4,6-dien-3-ona (60).



Esquema 12. Síntesis de 6-metoxicolestan-4,6-dien-3-ona (60).

En la síntesis de 6-metoxicolestan-4,6-dien-3-ona (60) se realizaron 2 experimentos, en la primera reacción se utilizó 1 equivalente de la endiona esteroidal y 0.12 equivalentes de I₂, (Esquema 12), se monitoreó la reacción cada 30 min y se reveló mediante UV (254 y 365 nm) y con una solución al 0.75% de KMnO₄. Al revelar la placa con KMnO₄ se pensó que la reacción no se había llevado con éxito, ya que únicamente se observaba la endiona de colesterol, pero al revelar a 365 nm se observó que el producto y la materia prima tenían el mismo R_f. En esta longitud de onda únicamente se podía observar el producto (Tabla 7, experimento 1) mientras que la endiona no fluorescía. En el segundo experimento se utilizó como disolvente AcOH glacial concentrado (20 mL), 1 equivalente de la endiona y 0.24 equivalentes de I₂, se monitoreó con CCF la reacción, observándose la formación de un compuesto nuevo sin la presencia de materia prima (Tabla 7, experimento 2). Para corroborar que se tenía efectivamente el esteroide de interés se realizaron experimentos de RMN de ¹H y ¹³C.

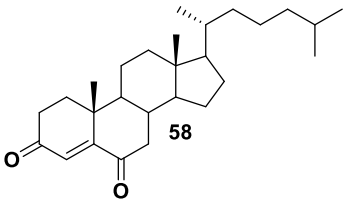
Tabla 7. Condiciones para la síntesis del enol éter 60.

Experimento	1	2
58	0.4 g (1.004 mmol)	0.2 g (0.502 mmol)
Disolvente	MeOH (50 mL)	MeOH (25 mL)
I ₂	0.03 g (0.1181 mmol)	0.03 g (0.1181 mmol)
Reflujo	Presente	Presente
Tiempo de Rx.	2 h 20 min.	3 h 20 min.
Rendimiento	-----	67.1%

9.1.2.2. Análisis de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **60**.

Al comparar los espectros de la materia prima y el producto se observaron algunos cambios significativos, la señal asignada al C-6 en el producto se ubicó en 149.9 ppm contra 202.7 ppm de la materia prima, lo que indicó que la cetona del C-6 sufrió una transformación. Además, se observó una nueva señal a 54.6 ppm, que indicaba que se habían obtenido resultados semejantes a lo observado en la reacción anterior donde los carbonos de los anillos C y D no eran afectados por el I_2 , además se seguía conservando la cetona en el anillo A en 199.69 ppm del C-3 por lo que la estructura del nuevo esteroide deshidrogenado solo presentó cambios en el anillo B. Además, se observó que la cetona en 201.98 ppm se desplazó hasta 54.67 ppm señal característica a un OMe (Tabla 8, Figura 16).

Tabla 8. Comparación de los δ (ppm) representativos de la endiona **58** y el enol éter **60**.

Posición de carbono	Endiona 58	6-metoxicolestan-4,6-dien-3-ona
		
3	199.9	199.8
4	125.6	119.3
5	161.3	159.4
6	202.7	149.9
7	47.0	109.1
6'	-----	54.5
17	56.1	56.1
18	12.1	12.0
19	17.7	16.4

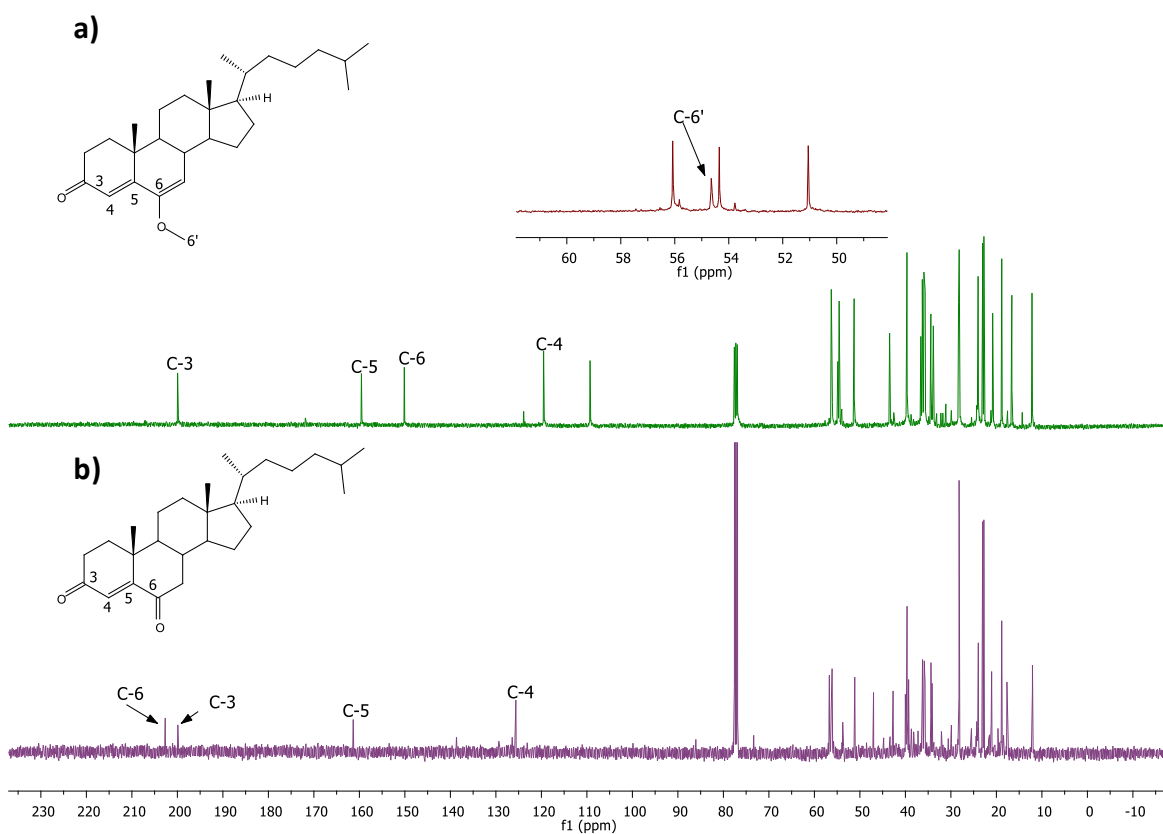


Figura 16. Espectros de RMN de ^{13}C del a) enol éter **60** y b) endiona **58**.

En el experimento de *g*HMBC de 6-metoxicolestano-4,6-dien-3-ona (**60**) se observó la correlación entre el protón H-6' y el carbono C-6, debido a la naturaleza de la estructura el protón de H-6' solo puede asociar a C-6, de esta forma se corroboró que el enol está ubicado en esa posición. Se analizó con un mayor énfasis los anillos A y B ya que es la región donde el colesterol sufrió todas las modificaciones durante la oxidación y posterior tratamiento con I_2 . Otra correlación importante para la caracterización inequívoca del producto fue la observada entre H-4 y los carbonos C-6 y C-10, así como la correlación que existe entre el protón de H-7 y los carbonos de C-6, C-5 y C-9 (Figura 17).

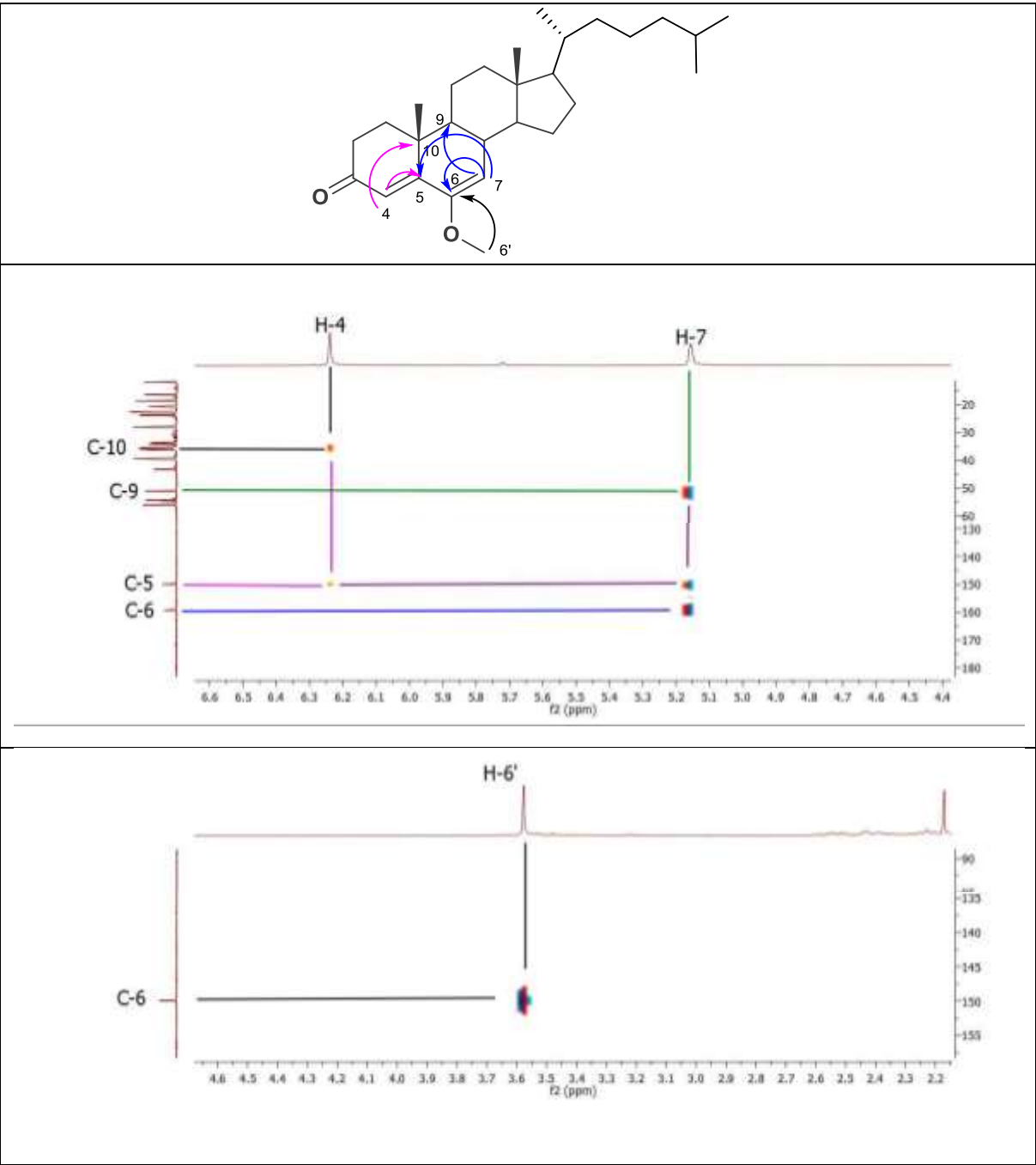
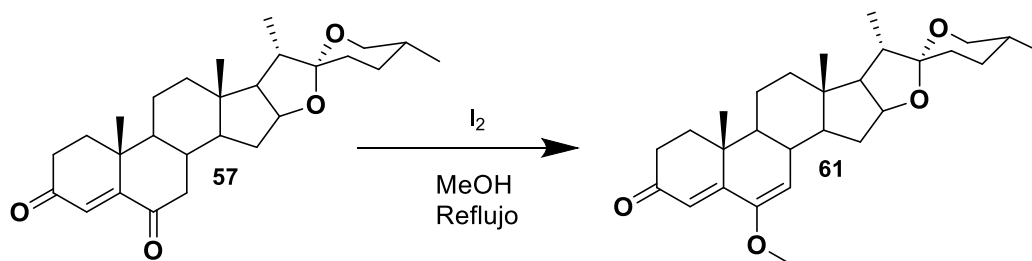


Figura 17. Espectro de gHMBC del compuesto 60.

9.1.2.3. Síntesis (25R)-6-metoxiespirostan-4,6-dien-3-ona (61).



Esquema 13. Reacción para obtener (25R)-metoxiespirostan-4,6-dien-3-ona (61).

En la reacción del (25R)-espirostan-4-en-3,6-diona (**57**), se realizaron 3 experimentos (Esquema 13). En un primer ensayo se utilizaron 1 equivalente de la endiona y 0.17 equivalentes I₂, en MeOH como disolvente. La reacción se monitoreó con CCF cada hora, visualizando las placas en una lámpara de UV (254 y 365 nm) y revelándolas con una solución al 0.75% de KMnO₄, con lo cual se determinó la formación de un nuevo producto (Tabla 9, experimento 1).

En un segundo ensayo se utilizaron las mismas condiciones con respecto al primero a excepción del tolueno como disolvente, esperando que el alto punto de ebullición favoreciera una mayor conversión. La reacción se monitoreó con CCF dando como resultado que la endiona esteroideal no sufrió ninguna modificación en su estructura. Para forzar la reacción a la formación de un compuesto diferente se adicionaron 20 mL de ácido acético glacial, sin embargo, no se observaron resultados favorecedores (Tabla 9, Experimento 2).

En el tercer experimento se utilizaron 1 equivalente de la endiona (**57**) y 0.13 equivalentes de I₂, la reacción se monitoreó con CCF observando que la materia prima se había consumido por completo (Tabla 9, experimento 3). Una vez purificados los compuestos se procedió a su análisis por RMN en 1 y 2D.

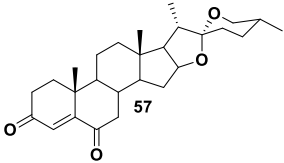
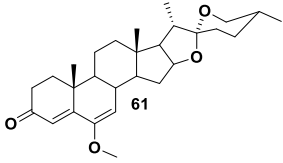
Tabla 9. Condiciones para la síntesis del enol éter **61**.

Experimento	1	2	3
57	0.1 g (0.235 mmol)	0.1 g (0.235 mmol)	0.4 g (0.938 mmol)
Disolvente	MeOH (50 mL)	Tolueno (50 mL)	MeOH (50 mL)
I ₂	0.01 g (0.039 mmol)	0.01 g (0.039 mmol)	0.03 g (0.1181 mmol)
Tiempo de Rx.	4 h 20 min.	4 h	2 h
Rendimiento	-----	-----	50%

9.1.2.1. Caracterización por RMN del (25*R*)-6-metoxiespirostan-4,6-dien-3-ona (61).

El espectro de ¹³C permitió confirmar que el carbonilo del C-3 no sufrió modificación química ya que el desplazamiento químico no varió significativamente (Figura 18). Este mismo comportamiento se observó con los carbonos vinílicos de C-4 y C-5. Sin embargo, el pico asignado al carbono 6 cambió significativamente de 201.98 ppm a 150.64 ppm. Además, se observaron dos señales nuevas en el espectro del producto en 150.64 y 108.34 ppm correspondientes a los carbonos C-6 y C-7 respectivamente, los cuales corresponden a un carbono cuaternario y a un metino (determinado por un experimento DEPT), aunado a ello se observó una señal simple a 54.67 ppm que corresponde a un metilo lo que sugirió la formación de un enol éter que podía estar entre los carbonos C-6 y C-7 (Tabla 10). Para asegurar que efectivamente se tenía la formación de un sistema enol éter, se realizaron experimentos de 2D (*g*HSQC y *g*HMBC).

Tabla 10. Comparación de los δ (ppm) representativos de la endiona **57** y el enol éter **61**.

Posición de carbono	Endiona	Enol éter
		
3	199.6	199.7
4	125.7	119.5
5	160.8	159.0
6	202.0	150.6
6'	-----	54.7
7	46.9	108.3
16	80.7	80.4
18	16.4	16.3
19	17.2	16.5
21	14.6	14.5
22	109.4	109.2
27	17.6	17.1

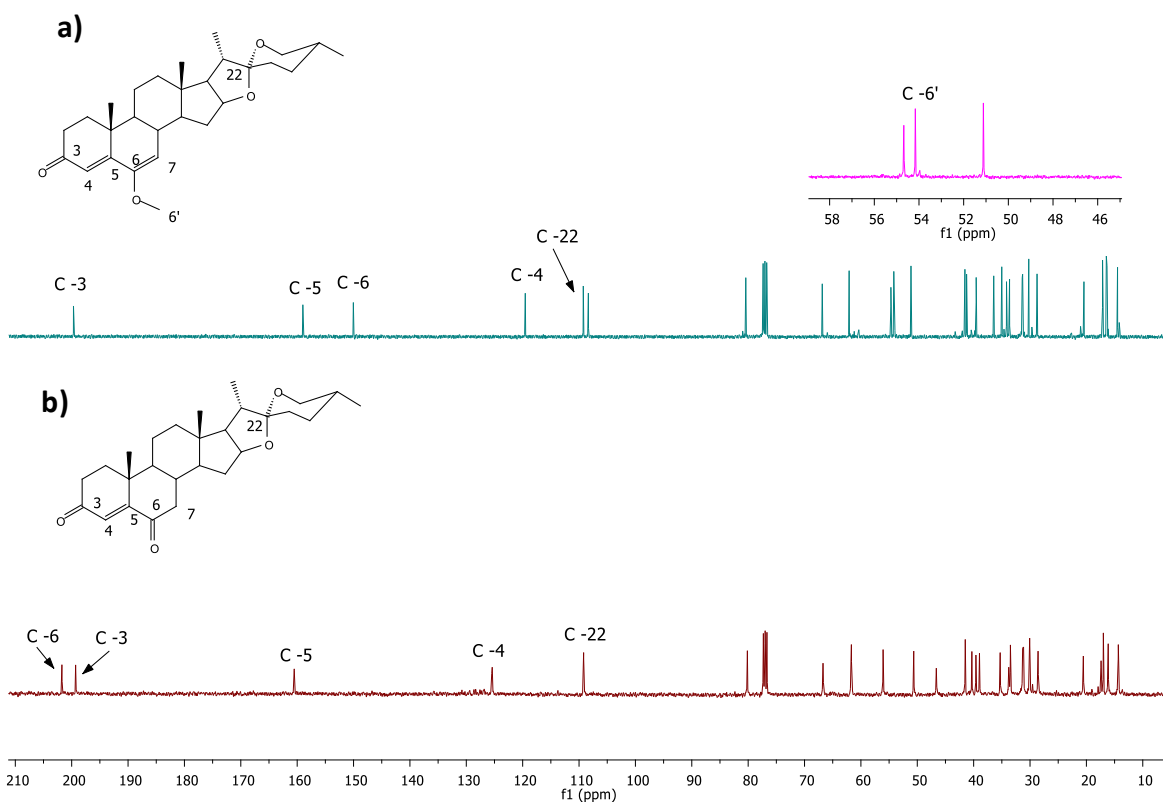


Figura 18. Comparación entre los espectros de RMN de ^{13}C del a) enol éter **61** y b) endiona **57**.

En el experimento de *g*HMBC de **61** se observa la correlación entre el protón de H-6' y el carbono de C-6, debido a la naturaleza de la estructura el protón de H-6' sólo se puede observar al C-6, de esta forma se corroboró que el enol está ubicado en esa posición (Figura 19). Se analizó más en detalle este experimento dando un mayor énfasis en los anillos A y B ya que es la región del esteroide donde se han presentado todas las modificaciones. Esta deducción se argumentó mejor a partir de las correlaciones entre H-4 con los carbonos C-5 y C-10, así como la correlación entre el protón H-7 con C-6, C-5, C-9 y C-14 (Figura 19).

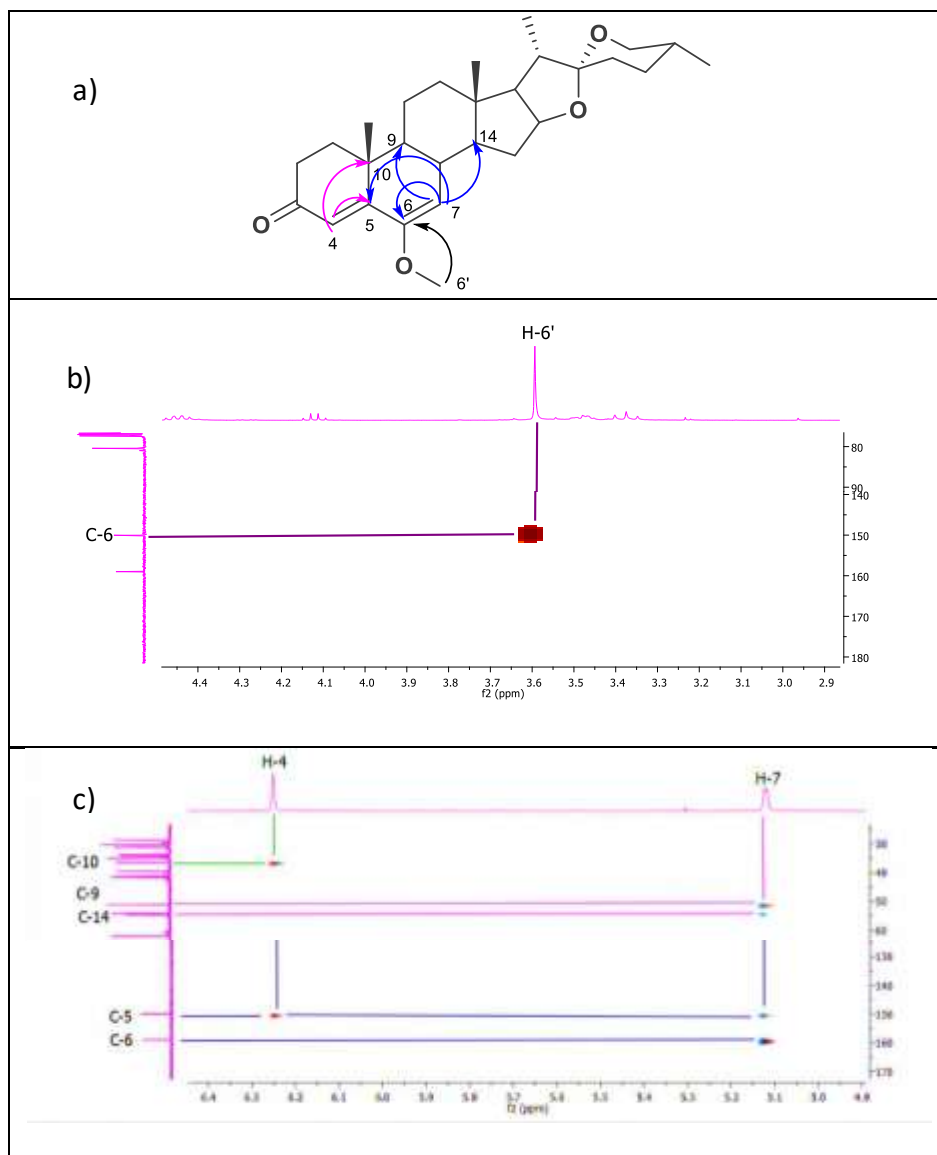
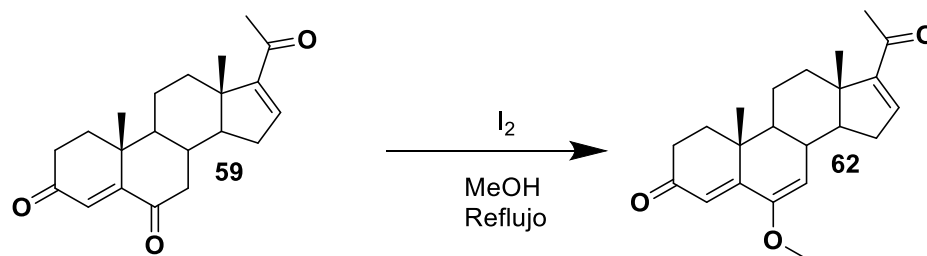


Figura 19. Espectro de gHMBC del compuesto 61.

9.1.2.4. Síntesis de 6-metoxipregnan-4,6,16-en-3,17-diona (62).



Esquema 14. Reacción para obtener 6-metoxipregnan-4,6-dien-3-ona (62).

En la primera reacción planteada se pusieron a reaccionar 0.15 g (1 equivalente) de pregnan-4,16-dien-3,6,20-triona (59) en presencia de 0.02 g (0.17 equivalentes) de I₂. La reacción (Esquema 14), se monitoreó con ayuda de CCF utilizando los mismos reveladores que en las reacciones anteriores, dando como resultado una mezcla de materia prima y un producto nuevo (Tabla 11, experimento 1).

Para corroborar que la endiona esteroideal sufrió un cambio en su estructura durante la reacción, se realizaron experimentos de RMN de ¹H y ¹³C en RMN. En un segundo ensayo se utilizaron las mismas condiciones aumentando las cantidades de pregnan-4,16-dien-3,6,20-triona a 0.200 g (1 equivalente) y de I₂ a 0.03 g (0.19 equivalentes), la reacción se monitoreó con CCF observándose la formación de dos productos y el consumo de la materia prima. Se realizó el análisis de RMN del compuesto purificado para contrastarlos con los espectros obtenidos de los productos de las reacciones anteriores, observando que se tenían los mismos desplazamientos en los primeros dos anillos del esteroide (Tabla 11, experimento 2).

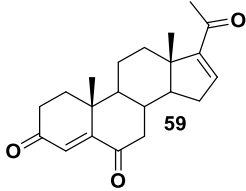
Tabla 11. Condiciones para la síntesis del enol éter 62.

Experimento	1	2
59	0.15 g (0.4599 mmol)	0.2 g (0.6131 mmol)
Disolvente	MeOH (50 mL)	MeOH (50 mL)
I ₂	0.02 g (0.07873 mmol)	0.03 g (0.1181 mmol)
Tiempo de Rx.	2 h 30 min.	3 h 30 min.
Rendimiento	-----	37.5%

Después de realizar los experimentos con I₂ molecular se compararon los espectros de RMN de ¹H y ¹³C de la endiona con 6-metoxipregnan-4,6,16-trien-3-ona (Tabla 12). El anillo A del nuevo

esteroide en comparación con la endiona, no mostró cambios en su estructura, conservando tanto la cetona del carbono C-3 a 199.87 ppm y el carbono vinílico de C-4. Nuevamente, la señal del C-6 de la materia prima se modificó considerablemente en el espectro de ^{13}C del producto (201.79 vs 150.01 ppm) lo que sugirió que el C-6 sufrió un cambio de grupo funcional de cetona a alqueno (Figura 20).

Tabla 12. Comparación de los δ (ppm) representativos de la endiona **59** y enol éter **62**.

Posición de carbono	Endiona 59	Enol éter 62
		
3	199.6	199.7
4	126.0	119.7
5	160.8	159.0
6	201.8	150.4
6'	-----	54.7
7	46.7	107.8
16	143.9	143.7
17	154.9	155.1
18	15.9	15.9
19	17.7	16.3
20	196.8	196.6

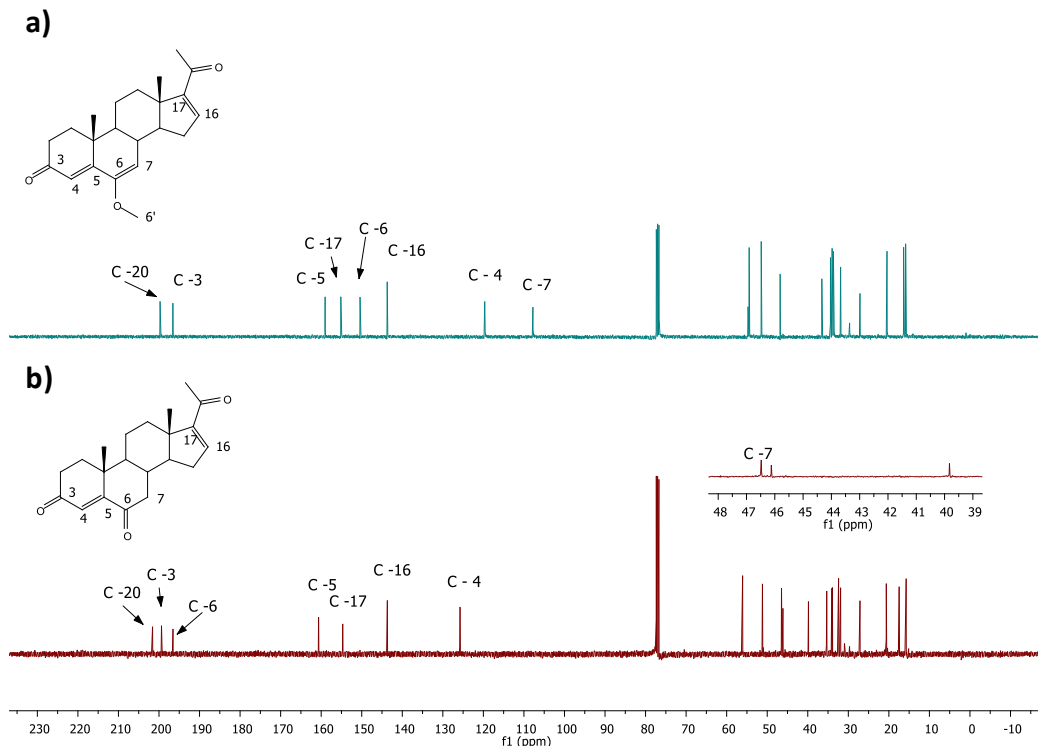


Figura 20. Espectros de RMN de ^{13}C del a) enol éter **62** y b) endiona **59**.

El espectro de *g*HMBC se utiliza para observar correlaciones entre protón y carbono a dos y tres enlaces, en este compuesto en particular se analizó la correlación entre los protones H-6, H-6', H-7 y H-4 con los carbonos ubicados en los anillos A y B, se observó que H-6' correlacionó con el C-6, corroborándose que el enol éter se ubicó en el anillo B, al igual que en los otros casos antes mencionados (Figura 21). Además, se analizó el experimento con mayor detalle en los anillos A y B ya que es donde la materia prima ha sufrido todas las modificaciones durante las reacciones de oxidación y las realizadas con I_2 , donde al igual que los compuestos anteriores se observan las mismas correlaciones. (Figura 21).

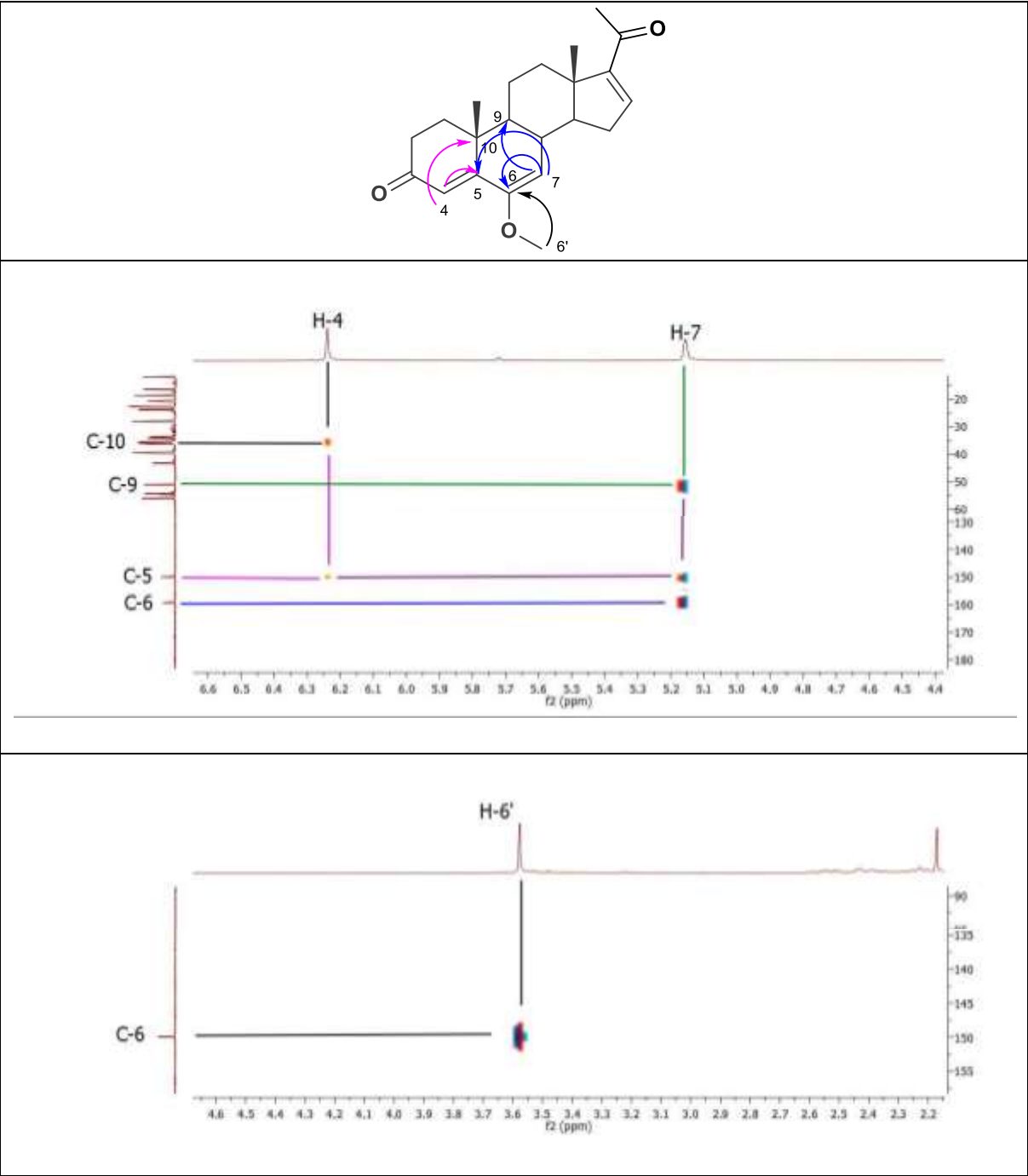


Figura 21. Espectro de gHMBC del compuesto 62.

9.2. Ensayos de viabilidad.

9.2.1. Línea celular MCF-7.

Los compuestos 6-metoxicolestan-4,6-dien-3-ona (**60**), (25R)-metoxiestrostan-4,6-dien-3-ona (**61**) y 6-metoxipregnan-4,6,16-trien-3-ona (**62**), se probaron inicialmente frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7, con la finalidad de evaluar su actividad antiproliferativa. El ensayo de MTT fue usado para determinar la actividad biológica, empleando diferentes concentraciones de los compuestos (100, 33.3, 11.1, 3.7, 1.2, 0.4, 0.13, 0.045 $\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizando como grupo control células sin tratamiento de la misma línea celular. Los resultados mostraron (Figura 22) que el esteroide **61** inhibió de manera dosis dependiente, es decir a mayor concentración menor porcentaje de células vivas, siendo significativo a partir de las dosis 0.4, 1.2, 3.7, 11.1 y 33.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P=****P<0.0001$), siendo la dosis de 33.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la que mostró menor supervivencia celular (80% aproximadamente), además el derivado esteroide **60** también inhibió de forma exitosa la proliferación de las células cancerígenas MCF-7, mostrando una diferencia significativa a partir de las concentraciones de 0.4 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde presentó la menor supervivencia celular en su dosis máxima (80% aproximadamente). El compuesto **62** también presentó actividad antiproliferativa, observándose su mejor actividad a una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ afectando al porcentaje de supervivencia en valores del 50% aproximadamente.

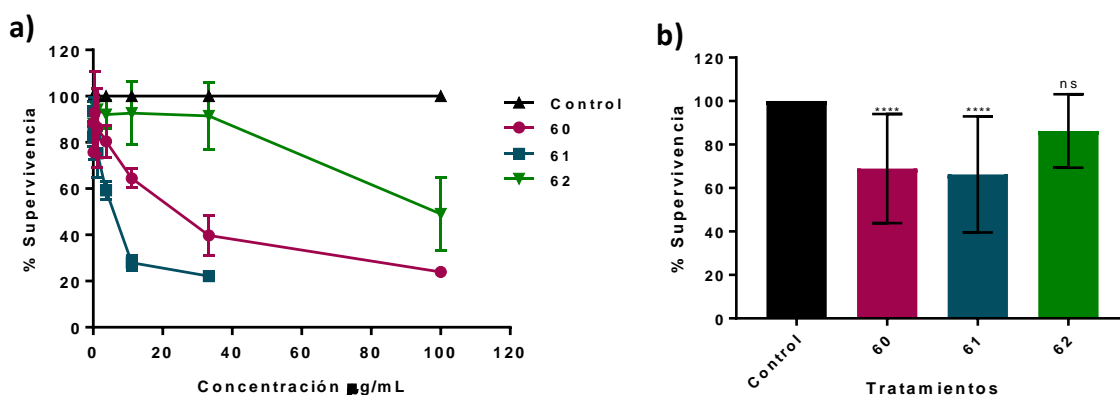


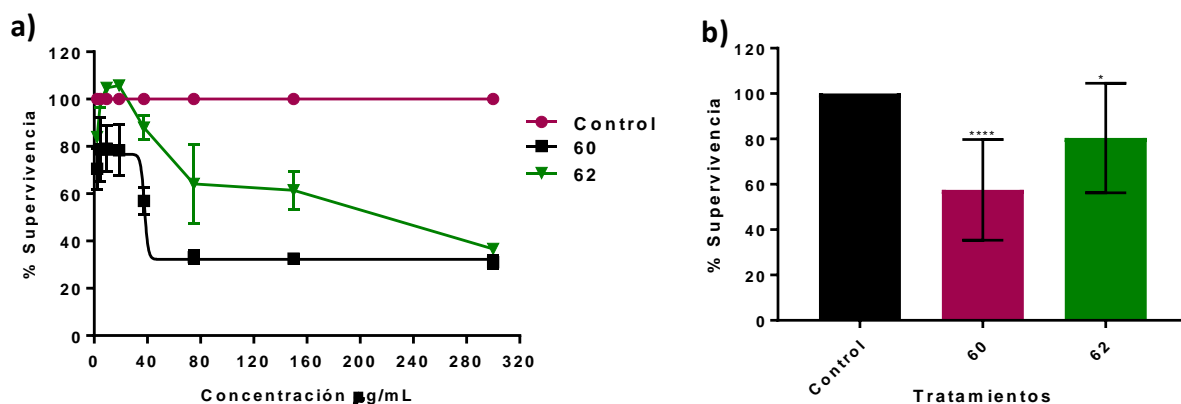
Figura 22. Actividad antiproliferativa de los esteroides **60**, **61** y **62** frente a las células de cáncer de mama MCF-7.

Los datos son expresados como la media \pm SD con una $P=0.0001$

**** $P<0.0001$, ns = no significativo. a) Prueba de Tukey, b) ANOVA.

9.2.2 Línea celular MDA-MB-231.

Una vez realizadas las pruebas preliminares en los cuales se observó que los esteroides **60**, **61** y **62** mostraron buena actividad antiproliferativa contra las células MCF-7, se evaluaron nuevamente con el ensayo de MTT utilizando las células de cáncer de mama MDA-MB-231, que es una línea celular altamente resistente a los tratamientos anticancerígenos, y se empleó el fármaco doxorrubicina como control positivo, así mismo se modificaron las dosis iniciales quedando de la siguiente manera (300, 150, 75, 37.5, 18.8, 9.4, 4.7, 2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$).



Los resultados mostraron que el esteroide **60** inhibió de forma efectiva el crecimiento de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, observando que a mayor concentración menor era el porcentaje de células vivas (Figura 23), teniendo diferencia significativa a partir de las dosis 0.04 hasta 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la que mostró mayor afectación en la proliferación de las células (aproximadamente 70%), mientras que el compuesto **62**, no tuvo diferencia significativa, además de mostrar inhibición dosis dependiente, en donde la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue la que logró tener efecto sobre la supervivencia en la línea MDA-MB-231 con una afectación aproximada del 60% (Figura 23).

Posteriormente se realizó un análisis comparativo utilizando el control positivo doxorrubicina, donde el esteroide **60** no presentó diferencia significativa con el grupo de células tratadas con el fármaco, teniendo actividad biológica en todas las concentraciones. Mostrando la misma tendencia de dosis dependiente de inhibición, lo que significa que a mayor concentración la

actividad antiproliferativa aumentó, siendo la dosis de 300 µg/mL la que afectó más a las células, aproximadamente en un 70%, mientras el compuesto **62** tuvo menor actividad antiproliferativa al compararlo con el grupo tratado con el fármaco, sin embargo este compuesto inhibió la proliferación de las células cancerígenas MDA-MB-231 únicamente con la dosis 300 µg/mL aproximadamente en un 60% (Figura 24).

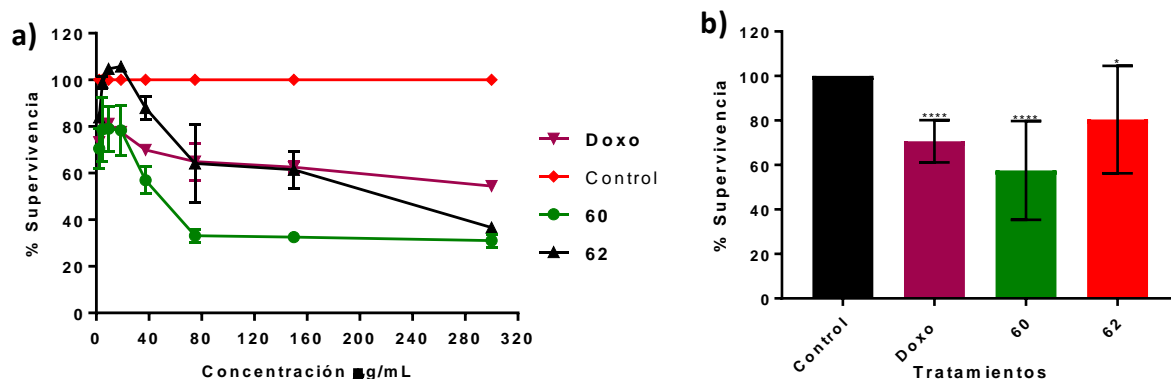


Figura 24. Actividad antiproliferativa de los esteroides **60** y **62** frente a las células MDA-231 y el control positivo. Los datos son expresados como la media \pm SD con una * $P < 0.005$, **** $P < 0.0001$. a) Prueba de Tukey, b) ANOVA.

Al comparar los datos obtenidos en los ensayos en las células MFC-7 contra lo observado en las células MDA-MB231, es de destacar que la actividad antiproliferativa es ligeramente mayor en la línea celular MCF-7 y que los esteroides tienen mayor actividad antiproliferativa que el fármaco doxorubicina. Al igual que en los otros ensayos existe una inhibición del crecimiento celular dosis dependiente sobresaliendo el compuesto **60** (Figura 25).

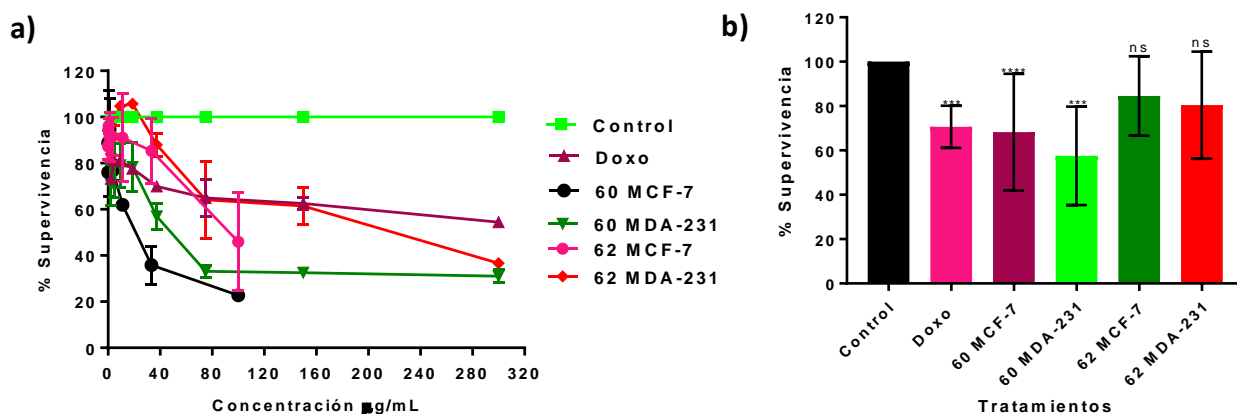


Figura 25. Comparación de la actividad antiproliferativa entre las líneas celulares MDA-231 y MCF-7. Los datos son expresados como la media \pm SD con una $P =$ *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$, ns = no significativo. a) Prueba de Tukey, b) ANOVA.

9.3.3 Evaluación de la actividad antiproliferativa en las células sanas HEK-293.

Una vez comprobada la actividad antiproliferativa frente a líneas celulares de cáncer, MCF-7 y MDA-MB-231, se evaluó la selectividad de los sistemas esteroidales **60** y **62**, así como la comparación de dicho efecto contra un fármaco de referencia (control positivo). Los resultados mostraron mayor actividad de los sistemas esteroidales **60** y **62** en comparación con el fármaco de referencia, y una tendencia de que a mayor dosis de compuesto aumenta la efectividad biológica en las células cancerígenas. Por lo cual la siguiente evaluación debía realizarse con células normales (HEK-293) cultivándolas bajo las mismas condiciones, utilizando el control positivo y el grupo de células sin tratamiento, para ver si los esteroides eran selectivos con el tipo de células, dañando a las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, sin afectar a las células normales HEK-293, esperando incluso que el control positivo tuviera mayor actividad antiproliferativa que los sistemas esteroidales **60** y **62** (Figura 26).

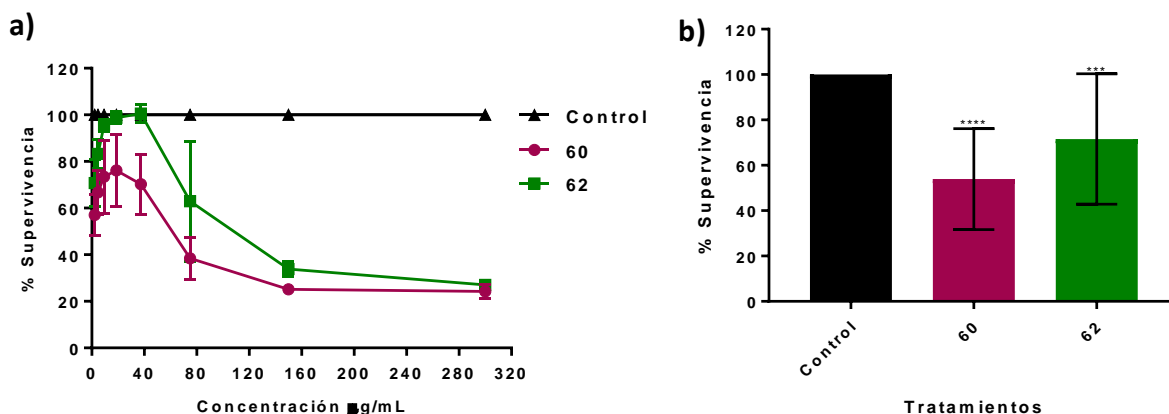


Figura 26. Actividad antiproliferativa de los esteroides **60** y **62** con HEK-293.

Los datos son expresados como la media \pm SD con una $P=0.0001$ * $P<0.005$ ** $P<0.001$, *** $P<0.0005$, **** $P<0.0001$, ns = no significativo. a) Prueba de Tukey, b) ANOVA.

En la evaluación de los compuestos **60** y **62** se observó que la actividad antiproliferativa en las células HEK-293 es de manera dosis dependiente (Figura 26), lo cual corresponde al comportamiento observado en los tratamientos realizados en las células cancerígenas. Los resultados mostraron que para las células normales de fibroblastos de riñón fue necesario una mayor concentración de los compuestos para afectar al porcentaje de supervivencia, con valores de IC_{50} de $54.4 \mu\text{g/mL}$ para **60** y $204.4 \mu\text{g/mL}$ para el derivado **62**, mientras que en las células

cancerígenas los valores de IC_{50} para el compuesto **60** fueron de 46.2 y 18.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente y para el esteroide **62** de 139 y 118 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente; estos resultados indican que los nuevos compuestos son selectivos para las células de adenocarcinoma de mama.

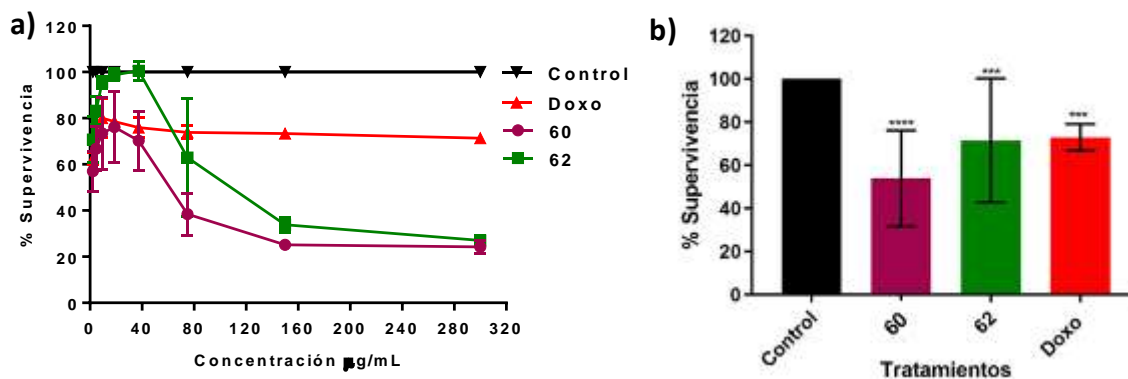


Figura 27. Actividad antiproliferativa de los esteroides **60** y **62** en la línea celular HEK-293 y el control positivo (doxorubicina). Los datos son expresados como la media \pm SD con una P= ***P<0.0005, ****P<0.0001. a) Prueba de Tukey, b) ANOVA.

En el ensayo de las células normales empleando el compuesto **60** utilizando el control positivo (doxorubicina), se observó un comportamiento similar a lo descrito previamente, es decir las células HEK-293 se vieron afectadas a dosis mayores a lo observado con el fármaco control positivo, afectando un 30% aproximadamente, siendo la concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del esteroide **60**, la de mayor efectividad que inhibió el crecimiento de las células hasta en un 80% aproximadamente lo que indicó que este esteroide era el doble de efectivo contra estas células (Figura 27). Posteriormente se analizó el compuesto **62** contra el grupo control positivo, el cual no mostró diferencia significativa, además se observó la misma tendencia que en los ensayos anteriores de inhibición dosis respuesta donde sólo las células normales se afectaban a medida que las dosis aumentaban, siendo la concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la que tuvo los mejores resultados, afectando de forma negativa al crecimiento celular hasta en un 50% en relación con el control positivo, además en algunas dosis este porcentaje está por encima del grupo control positivo.

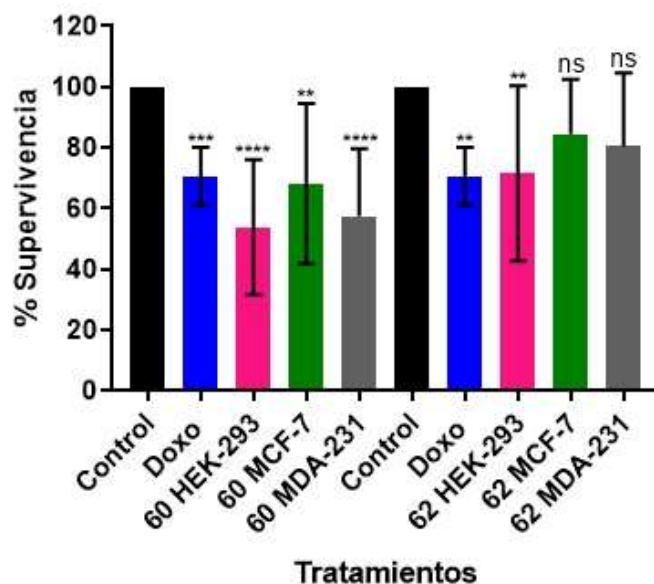


Figura 28. Actividad antiproliferativa de los esteroides 60 y 62. Los datos son expresados como la media \pm SD con una $P = **P < 0.001$, $***P < 0.0005$, $****P < 0.0001$, ns = no significativo. ANOVA.

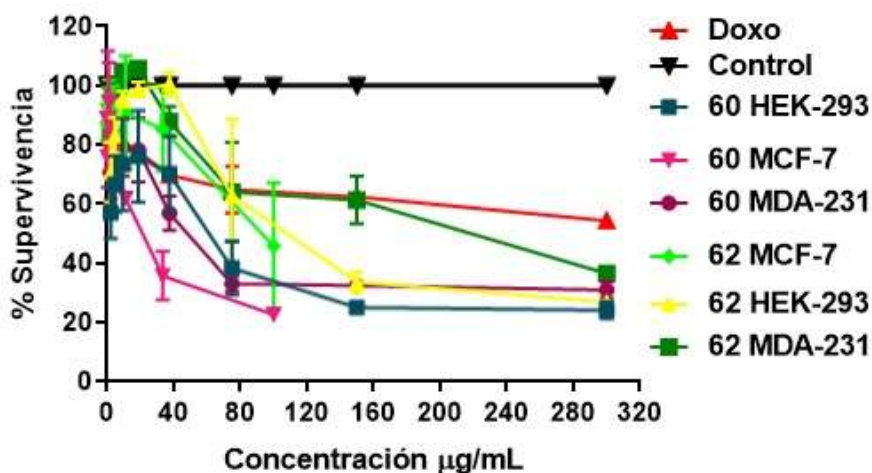


Figura 29. Actividad antiproliferativa de los esteroides 60 y 62. Prueba de Tukey.

Los resultados obtenidos en el ensayo MTT indican que el esteroide 60 afecta más a las células HEK-293 que a las líneas celulares cancerígenas MDA-MB231 y MCF-7. De las dos líneas celulares de cáncer la que sufrió mayores efectos en su porcentaje de supervivencia fueron las células MCF-7, además los compuestos tuvieron más actividad antiproliferativa que el control positivo, observándose en todos los ensayos la inhibición dosis respuesta en las tres líneas celulares empleadas, teniendo como mayor dosis efectiva la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$, afectando más

a las células que el fármaco empleado en el control positivo, lo que indica que estos esteroides podrían ser utilizados como tratamiento para líneas de células cancerígenas más agresivas donde los compuestos no provocan efecto en la actividad antiproliferativa de las células (Figura 28, 29).

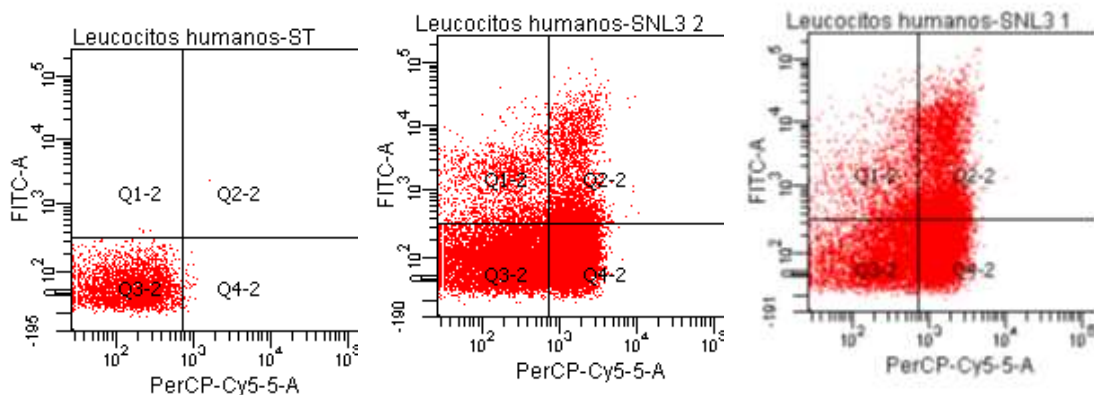


Figura 30. Ensayo preliminar de Anexina/IP medido por citometría.

Por último, en colaboración con la Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo del Instituto Nacional de Pediatría, se realizó un ensayo preliminar de Anexina/IP que fue desarrollado y medido por citometría (Hedley B., *et al.*, 2013), permitiendo entender de mejor forma el modo de acción de los compuestos sobre la célula y saber el tipo de muerte que provocan los esteroides. En este estudio se realizaron dos ensayos; uno con una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en donde se observa que las células sufren tanto procesos apoptóticos como necróticos, esta última condición fue la que predominó en el ensayo. A una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó la muerte de las células por procesos apoptóticos y en mayor proporción por procesos necróticos (Figura 30).

9.2.3. Discusión de la actividad antiproliferativa.

Diversos estudios han demostrado que la diosgenina disminuye la tasa de proliferación celular en la línea celular de osteosarcoma humano 1547, induciendo la muerte por apoptosis, deteniendo el ciclo celular en la fase G1 (Shawakfen, K. *et. al.*, 2008) Además, un derivado: la dioxima de diosgenina es un compuesto que presenta actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo, no citotóxicos, inductores de apoptosis con acción selectiva (Moalic, S. *et. al.*, 2001) En otros estudios realizados se ha observado que las células cancerígenas son afectadas por procesos apoptóticos aun cuando existe una modificación de la diosgenina añadiendo a su estructura oximas en los carbonos C-3 y C-6, lo cual sugiere que la muerte celular por procesos apoptóticos podría estar ligada nuevamente con el tipo de funcionalización de la diosgenina. De igual forma 4 oximas esteroidales aisladas de esponjas marinas presentaron fuerte actividad biológica demostrando que los compuestos con el sustituyente ramificado de colesterol en C-17 también tienen gran potencial como compuestos líderes para ser desarrollados contra algunos tipos de cáncer (Martinez, S. *et. al.*, 2013).

En el presente trabajo se observó que el compuesto **61** presentó la mayor actividad anti proliferativa en comparación a los esteroides **60** y **62** en la prueba preliminar de MTT frente a las células cancerígenas MCF-7. Esto posiblemente se deba al tipo de sustituyente en el carbono 17 de los esteroides y a las modificaciones estructurales realizadas por síntesis química, pero al analizar los esteroides se observa que la tasa de proliferación celular disminuye o aumenta, al cambiar el tipo de núcleo esteroidal donde se observa que el compuesto **62** presentó la menor actividad antiproliferativa que el resto de los esteroides aun teniendo las modificaciones realizadas, esto no quiere decir que los cambios realizados a los esteroides no tengan un papel importante en la actividad biológica, sino que potencian o modulan la actividad antiproliferativa a las estructuras utilizadas en el presente trabajo. Los resultados obtenidos indicaron que el derivado esteroidal de colesterol **60** (IC_{50} en $\mu\text{g/mL}$, 46.2 MDA-MB-231, 18.8 MCF-7) fue el que tuvo los mejores resultados en la actividad antiproliferativa incluso por encima del fármaco doxorubicina (IC_{50} en $\mu\text{g/mL}$, 186 MDA-MB-231, 133 MCF-7) frente a las líneas celulares de cáncer de mama, además afectó la tasa de proliferación celular de las células normales HEK-93. En dicha actividad se muestra una relación dosis dependiente entre los esteroides y las líneas

celulares de cáncer y las células normales, en donde el tipo de esteroide y la modificación de los anillos A y B son esenciales para la actividad. El análisis preliminar por citometría indica que el mecanismo de muerte de estos derivados esteroideos se lleva a cabo en las células por procesos apoptóticos.

Al analizar estos resultados, se podría especular que el sistema α,β -insaturados en los anillos A y B sea el responsable de los procesos apoptóticos tanto en las células cancerígenas como en normales y que el porcentaje de células afectadas por el esteroide está directamente ligado al tipo de núcleo esteroidal donde al ser más complejo se aumente la actividad antiproliferativa, además las especies químicas agregadas al núcleo esteroidal incrementen o le confieran la actividad a los compuestos. A pesar de que los esteroides afectaron también a las células normales, se considera que pueden ser compuestos líderes para el desarrollo de fármacos que puedan ser utilizados en el tratamiento de aquellos tipos de cáncer que son altamente resistentes a los medicamentos comerciales.

10. CONCLUSIONES.

Se estableció una metodología regioselectiva novedosa para la obtención de esteroides 6-metoxi-4,6-dien-3-ona (**60**, **61**, **62**) a partir de los sistemas esteroidales 4-en-3,6-dionas de colesterol, diosgenina y 16-dehidropregnenolona mediante el empleo de I_2 y reflujo en metanol, con rendimientos del 67.7%, 50% y 37.5% para los esteroides **60**, **61** y **62**, respectivamente. Los tres compuestos sintetizados no han sido descritos en la literatura.

Los enol éteres presentaron una mayor inhibición de la proliferación celular en células de cáncer de mama que las tratadas con el fármaco de referencia, la citotoxicidad observada en valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) en la actividad antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer de mama fueron superiores a doxorubicina; en el compuesto **60** las IC_{50} fueron de 18.8 (MCF-7) y 46.2 (MDA-MB-231), mientras que en el compuesto **62** las IC_{50} fueron de 118.8 (MCF-7) y 139 (MDA-MB-231); para las células normales (HEK-293) es necesaria una mayor concentración (IC_{50} de 54.4 y 204 $\mu\text{g/mL}$ para **60** y **62** respectivamente) de los enol éteres, que en las células cancerígenas, esto indicó que los derivados esteroidales son más activos en las células de cáncer de mama.

El ensayo de anexína/IP por citometría de flujo para determinar el tipo de muerte celular, en el esteroide **62**, indicó que la posible causa de muerte en las células cancerígenas es en mayor proporción realizada por procesos necróticos.

En este estudio se demostró que los enol éteres **60**, **61** y **62** derivados de colesterol, diosgenina y 16-drehidropropegnolona presentan actividad antiproliferativa, se debe agregar que existe una relación entre el sustituyente en el C-17 y la actividad antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer, siendo el derivado colestánico (**60**) el más activo, por otra parte, los compuestos sintetizados pueden ser desarrollados como posibles estructuras para el diseño de un compuesto bioactivo con potencial actividad en el tratamiento de cánceres del tipo hormono-dependiente.

11. REFERENCIAS.

1. Agouridas, V., Magnier, E., Blazejewski, J. C., Laios, I., Cleeren, A., Nonclercq, D., Laurent, G. y Leclercq, G. (2009). Effect of fluorination on the pharmacological profile of 11 β isomers of fulvestrant in breast carcinoma cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(3), 883–887.
2. Banerjee, A., Vera, W., Mora, H., Laya, M. S., Bedoya, L. y Cabrera, E. V. (2006). Iodine in organic synthesis. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 65, 293–308.
3. Bhat, S., Nagasampagi, A. y Sivakumar, M. (2005). *Chemistry of Natural Products*. India: Narosa.
4. Cancer Today (2018). Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2018, 25/12/2018. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/today/home>.
5. Chetrite, G., Paris, J., Botella, J. y Pasqualini, J. R. (1996). Effect of nomegestrol acetate on estrone-sulfatase and 17 β -hydroxy steroid dehydrogenase activities in human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 58(5-6), 525–531.
6. Cui, J., Fan, L., Huang, L., Liu, H. y Zhou, A. (2009). Synthesis and evaluation of some steroidal oximes as cytotoxic agents: Structure/activity studies (I). *Steroids*, 74(1), 62–72.
7. Cui, J., Huang, L., Fan, L. y Zhou, A. (2008). A facile and efficient synthesis of some (6E)-hydroximino-4-en-3-one steroids, steroidal oximes from *Cinachyrella* spp. sponges. *Steroids*, 73(3), 252–256.
8. Darzynkiewicz, Z., Bedner, E. y Traganos, F. (2001). Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis. *Methods in Cell Biology*, 63, 52–46.
9. Escribano, J. A. (2010). *Síntesis de esteroides de alta actividad* (Tesis de doctoral). Universidad de Salamanca.
10. Ghosh, D., Lo, J., Morton, D., Valette, D., Xi, J., Griswold, J., Hubbell, S., Egbuta, C., Jiang, W., An, J. y Davies, H. M. L. (2012). Novel aromatase inhibitors by structure-guided design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(19), 8464–8476.
11. Gonzáles, F. (1991). *Nomenclatura de Química Orgánica* (1ª ed.). España: Universidad de Murcia.

12. He, Z., Chen, H., Li, G., Zhu, H., Gao, Y., Zhang, L. y Sun, J. (2014). Diosgenin inhibits the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells by suppressing Vav2 activity. *Phytomedicine*, 21(6), 871–876.
13. Hedenfalk, I., Duggan, D., Yidong, C., Radmacher, M., Bittner, M., Simon, R., Meltzer, P., Gusterson, B., Esteller, M., Wilfond, B., Borg, B. y Trent, J. (2001). Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *Journal of Medicine*, 344, 539–548.
14. Hedley, B. y Keeney, M., (2013). Technical issues: Flow cytometry and rare event analysis. *International Journal of Laboratory Hematology*, 35, 344–350.
15. Herruzo, I. (2002). Terapia hormonal del cáncer de mama. *Seminars in Oncology*, 1, 61–73.
16. Hunter, A. C. y Priest, S. M. (2006). An efficient one-pot synthesis generating 4-ene-3,6-dione functionalised steroids from steroidal 5-en-3 β -ols using a modified Jones oxidation methodology, *Steroids*, 71(1), 30–33.
17. Instituto Nacional del Cáncer (2018). Estadísticas del cáncer. 03/01/2019. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas>.
18. Jereb, M., Vrazic, D. y Zupan, M. (2011). Iodine-catalyzed transformation of molecules containing oxygen functional groups. *Tetrahedron*, 67(7), 1355–1387.
19. Koolman, J. y Röhm, K. H. (2005). *Bioquímica humana: Texto y atlas*. (3ª ed.). España: Médica Panamericana.
20. Kottawar, S. S., Siddiqui, S. A., Pandalwar, S. S., Jadhav, W. N. y Bhusare, S. R. (2013). Molecular iodine catalyzed coupling reactions of indole with 1,3-dicarbonyl compounds. *Research on Chemical Intermediates*, 40(8), 2929–2934.
21. López Martínez, J. E. (2014). *Oxidación electroquímica de la pregnelona a progesterona empleando el sistema Br₂ como oxidante* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
22. Martínez Mata, S. I. (2013). Efecto antitumoral del fitoesteroide diosgenina-3-glu en líneas celulares de cáncer cervicouterino: HeLa, CaSki y ViBo (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
23. Medioni, J. (2016). *Terapia antiestrogénica en los cánceres de mama*, *Ginecología-Obstetricia*, 52(3), 1–7.

24. Miramontes, L. E. (2001). La industria de esteroides en México y un descubrimiento que cambiaría el mundo. *Revista de la Sociedad Química de México*, 45(3), 102–104.
25. Moalic, S., Liagre, B., Corbiere, C., Bianchi, A., Dauça, M., Bordji, K. y Beneytout, J. L. (2001). A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. *FEBS Letters*, 506(3), 225–230.
26. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.
27. Moss, G. P. (1989). Nomenclature of steroids. *Pure and Applied Chemistry*, 61(10), 1783–1822.
28. Mphahlele, M. J. (2009). Molecular iodine -an expedient reagent for oxidative aromatization reactions of α,β -unsaturated cyclic compounds. *Molecules*, 14(12), 5308–5322.
29. Olivares, F. (2001). El origen de Syntex, una enseñanza histórica en el contexto de ciencia, tecnología y sociedad. *Revista de la Sociedad Química de México*, 45(2), 93–96.
30. Pickering, W. F. (1980). *Química analítica moderna*. (1ª ed.) Barcelona, España: Reverte.
31. Rodríguez, J., Deive, N. y Jiménez, C. (2001). Synthesis of cytotoxic 6E-hydroximino-4-ene steroids: Structure/activity studies. *Journal Medicinal Chemistry*, 44(16), 2612–2618.
32. Rodríguez, J., Núñez, L., Peixinho, S. y Jiménez, C. (1997). Isolation and synthesis of the first natural 6-hydroximino-4-en-3-one steroids from the sponges *Cinachyrella* spp. *Tetrahedron Letters*, 38(10), 1833–1836.
33. Saavedra, O. M., Sánchez, I., García Sánchez, J. R., Ceballos Reyes, G. R. y Bolaina Méndez, E. (2012). Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(2), 7–22.
34. Scherbakov, A. M. y Zavarzin, I. V. (2018). Synthesis and evaluation of the antiproliferative activity of benzylidenes of 16- dehydroprogesterone series. *Steroids*, 138, 91–101.
35. Shawakfeh, K. Q., Al-Said, N. H. y Al-Zoubi, R. M. (2008). Synthesis of bis-diosgenin pyrazine dimers: New cephalostatin analogs. *Steroids*, 73(6), 579–584.
36. Shirini, F., Zolfigol, M. A. y Torabi, S. (2005). Chromium trioxide supported on $\text{NaHSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: Simple oxidation of alcohols in solution and solvent free conditions. *Letters in Organic Chemistry*, 2(6), 544–546.

37. Slavikova, B., Kohout, L., Budesinsky, M., Swaczynova, J. y Kasal, A. (2008). Brassino-steroids synthesis and activity of some fluoro analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(13), 3979–3984.
38. Steigerova, J., Rarova, L., Oklestkova, J., Krizova, K., Levkova, M., Svachova, M., Kolar, Z. y Strnad, M. (2012). Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis of prostate cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4068–4076.
39. Sun, J., Dong, Y., Cao, L., Wang, X., Wang, S. y Hu, Y. (2004). Highly efficient chemoselective desprotection of *O,O*-acetals and *O,O*-ketals catalyzed by molecular iodine in acetone. *Journal of Organic Chemistry*, 69(25), 8932–8934.