

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Síntesis de oximas y lactamas esteroidales con
potencial actividad antiproliferativa

T E S I S

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

Thalía Lissette Mora Medina

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Roxana Martínez Pascual

CODIRECTOR DE TESIS

Dra. Hermenegilda Moreno Díaz

San Juan Bautista Tuxtepec, 2021



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO	DEP2020/MCQ/038
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 5 de diciembre de 2020

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas de la C. **Thalia Lisette Mora Medina**, matrícula **17130001**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Síntesis de oximas y lactamas esteroideas con potencial actividad antiproliferativa**", para su posterior presentación y defensa por parte de la sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

tema iharrissa, asos aqorta
Bou Lo-tama, chi ji ja



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Thalia Lisette Mora Medina – Estudiante
C.c.p. Dra. Roxana Martínez Pascual – Directora de Tesis
C.c.p. Dr. Aurelio Ramírez Hernández – Coordinador de la Maestría en Ciencias Químicas
C.c.p. M.E. Yessenia Barrantes Arenal – Jefa de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial,
C.P. 6800, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(281)6729240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria,
C.P. 6800, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)6729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO	DEP/2020/MCQ/018
ASUNTO	Asignación de jurado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 10 de noviembre de 2020

C. THALIA LISSETTE MORA MEDINA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Lemuel Pérez Picaso	Universidad del Papaloapan	Presidente
Dra. Roxana Martínez Pascual	Universidad del Papaloapan	Secretario
Dr. Emanuel Hernández Núñez	Cátedra CONACyT CINVESTAV unidad Mérida	Vocal
Dra. Alma Xóchil Ávila Alejandre	Universidad del Papaloapan	1er Suplente
Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín	Universidad del Papaloapan	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

sera uberrima, mens aperta
Bou Lo-cous, chi ji ju



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



C.c.p. Dr. Amelito Ramírez Hernández - Coordinador de la Maestría en Ciencias Químicas
C.c.p. L. P. Yesenia Damián Arenal - Jefe de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo

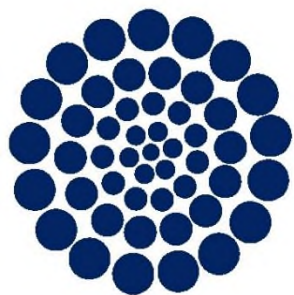
CAMPUS TUXTEPEC
C. Circunvalar No. 202, Col. Parque Industrial,
C.P. 68301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)679020

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LIMA BONITA
Av. Benito Juárez, Ciudad Universitaria,
C.P. 68400, Lima Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729200

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN LA UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC ESPECÍFICAMENTE EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA
ORGÁNICA Y PRODUCTOS NATURALES Y ÁREA DE CULTIVO CELULAR DEL
LINAN, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ROXANA MARTÍNEZ PASCUAL Y LA
DRA. HERMENEGILDA MORENO DÍAZ.

LA INVESTIGACIÓN SE FINANCIÓ POR MEDIO DE LA BECA **CONACYT** CON
NÚMERO DE REGISTRO Y/O CVU **866869** (NO. DE BECARIO: **638418**)
PERTENECIENTE AL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON
REGISTRO PNPC **002517** Y MEDIANTE LA BECA DE MOVILIDAD 2018 NACIONAL
OTORGADA.



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

DEDICATORIAS

A mí amada hija *A la personita que ha venido a iluminar mi vida, mi mundo entero y razón de existir, te amo Zafiro. Desde que te vi por primera vez a través de una pantalla supe que tu llegada sería una de grandes cambios, retos pero también de grandes bendiciones. Fuiste, eres y siempre serás lo más importante de mi vida.*

A mi madre

El solo hecho de haberme dado la vida y criado sola te hace merecedora de todo mi respeto y admiración. Te amo por sobre todas las cosas y si algún día me faltaras, mi corazón se rompería en mil pedazos.

A Valentín Mora Medina

Siempre esperaré por una noticia tuya o razón de tu paradero, te extraño y te amo. Este trabajo y todo lo que hago es para dedicártelo y que donde quiera que estés siempre recuerdes que te espero con los brazos abiertos.

A mi Abuela Gelacia

Siempre te recordaré y siempre te estaré agradecida por todo lo que me diste. Un beso hasta el cielo.

A Dios

Todo lo que soy te lo debo a ti, nunca me he sentido sola porque siempre estás presente en mi corazón, tu presencia hace que siga con los pies sobre la tierra.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Papaloapan por ser una casa de estudios comprometida con la educación de los jóvenes mexicanos y con muchas ganas de lograr cosas importantes. Así como al personal que labora en ésta, cada uno de ellos aporta su granito de arena para una educación de calidad.

Sin lugar a dudas fueron muchas las personas que contribuyeron a la culminación de este trabajo de investigación. En primer lugar, quiero agradecer a la **Dra. Roxana Martínez Pascual** por ser parte clave en este trabajo, por aceptarme en su grupo de trabajo y por tolerar muchas de mis faltas. Sin aunar más, no me alcanzará la vida para agradecerle todo lo que ha hecho por mí (aún sin conocerme), siempre tendrá en mí a una ex alumna amiga. En esta universidad aprendí que existen muchas personas con gran calidad humana y sin duda alguna **Dra. Hermenegilda Moreno Díaz**, usted en una de ellas.

Las experiencias en el ámbito estudiantil son formidables y aún más cuando nos topamos con personas gratas, sencillas y con un gran compromiso por la docencia y la investigación. Por todo eso y más, quiero agradecer al **Dr. Emanuel Hernández Núñez**, muchas gracias por lo mucho que me enseñó en tan poco tiempo.

A la **Dra. Alma Xóchil**, al **Dr. Daniel**, al **Dr. Lemuel** y al **Dr. Abelardo**, quienes formaron parte de mi comité tutorial y a quienes les agradezco sus consejos y comentarios forjados con respecto a este trabajo. Al **Dr. Miguel Peña Rico** y al **Dr. Diego Borin** por haberme facilitado todo el proceso biológico llevado a cabo de manera *in vitro* y además por ayudarme a entender todos los conceptos relacionados con éste, GRACIAS INFINITAS!!!.

A los profesores que aportaron sus conocimientos durante esta etapa de maestría, específicamente, al **Dr. Omar Viñas Bravo**, al **Dr. Mario Valera Zaragoza**, al **Dr. Miguel Ángel García**, a la **Dra. Nelda X. Martínez Galero** y al **Dr. Fabricio González Soriano**.

En esta vida, hasta los hermanos se pelean y en esta etapa de maestría no fue la excepción. No obstante, me quedo con los buenos momentos y risas sin parar, con cariño para **Nuria**, **Antonio**, **Silvia** (alias chivis), **María Fernanda**, **Dulce**, **Mitzy**, **Jerely**, **Sosa**, **Alán**, **Guadalupe**, **Misael** y **Beatriz**. En resumen, GRACIAS a todos!!!!

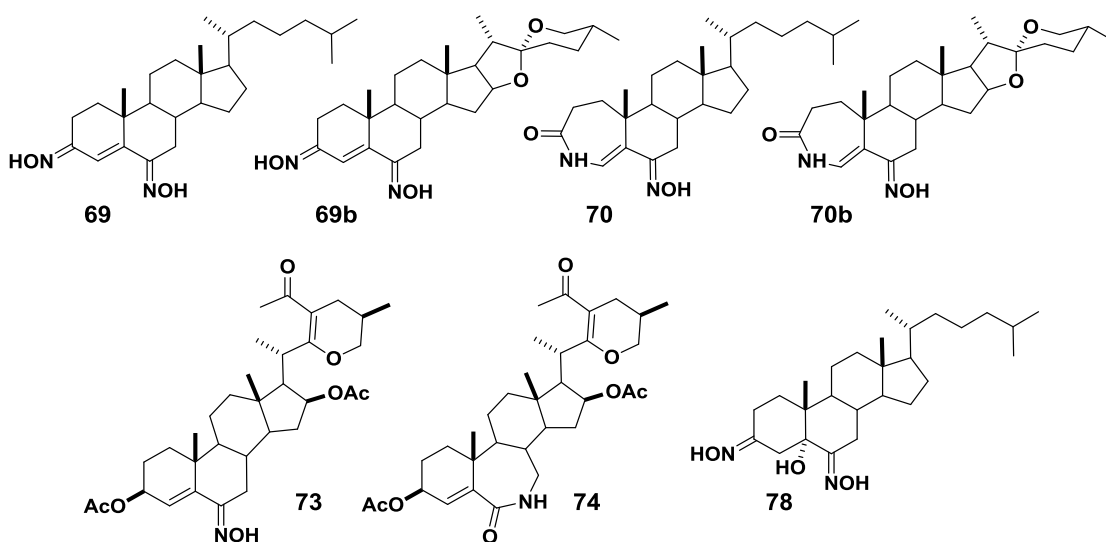
CONTENIDO

I	Resumen.....	i
II	Abstract.....	ii
III	Lista de abreviaturas y símbolos.....	iii
IV	Lista de figuras.....	v
V	Lista de tablas.....	xi
1.	Introducción.....	1
2.	Antecedentes.....	5
2.1	Azaesteroides.....	5
2.2	Oximas esteroidales.....	6
2.3	Azahomoesteroides.....	6
2.4	Síntesis de azahomoesteroides.....	10
2.5	Modelado molecular.....	18
2.6	Enzimas relacionadas con el cáncer hormonalmente dependiente...	18
3.	Justificación.....	24
4.	Hipótesis.....	25
5.	Objetivos.....	26
5.1	Objetivo general.....	26
5.2	Objetivos específicos.....	27
6.	Metodología.....	28
6.1	Reactivos y disolventes.....	28
6.2	Síntesis y caracterización de compuestos oxima y lactama esteroidales.....	28
6.3	Evaluación biológica de los compuestos oxima y lactama.....	31
6.4	Análisis computacional enzima-ligando.....	34
7.	Discusión de resultados.....	37
7.1	Síntesis química y análisis estructural de los compuestos azaesteroidales.....	37

7.2	Evaluación biológica mediante el ensayo por MTT.....	68
7.3	Análisis de acoplamiento molecular.....	80
8.	Parte experimental	115
8.1	Procedimiento para generar al colest-4-en-3,6-diona (43).....	115
8.2	Procedimiento para generar al (3 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-3,6-dihidroxiiminocolest-4-eno (69).....	116
8.3	Procedimiento para generar al 3-aza-3-oxo-6-hidroxiimino-A-homocolest-4-eno (70).....	117
8.4	Procedimiento para generar al (25 <i>R</i>)-espirost-4-en-3,6-diona (43b)..	118
8.5	Procedimiento para generar al (3 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-3,6-dihidroxiiminoespirost-4-eno (69b).....	119
8.6	Procedimiento para generar al 3-aza-3-oxo-6-hidroxiimino-A-homoespirost-4-eno (70b).....	120
8.7	Procedimiento para generar al diacetato de (25 <i>R</i>)-23-acetil-22,26-epoxicolest-5,22-dien-3 β ,16 β -diilo (71).....	121
8.8	Procedimiento para generar al diacetato de (25 <i>R</i>)-23-acetil-6-acetoxiimino-22,26-epoxicolest-5,22-dien-3 β ,16 β -diilo (72).....	123
8.9	Procedimiento para generar al diacetato de (6 <i>Z</i>)-23-acetil-22,26-epoxi-6-hidroxiiminocolest-4,22-dien-3 β ,16 β -diilo (73).....	125
9.0	Procedimiento para generar al diacetato de (25 <i>R</i>)-23-acetil-6a-aza-22,26-epoxi-6-oxo-B-homocolest-5,22-dien-3 β ,16 β -diilo (74).....	127
9.1	Procedimiento para generar el 5 α ,6 α -epoxicolestan-3 β -ol (75).....	129
9.2	Procedimiento para generar el (3 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i>)-3,6-dihidroxiimino-5 α -colest-5-ol (78).....	131
9.	Conclusiones	132
10	Bibliografía	136
11	Anexos	148

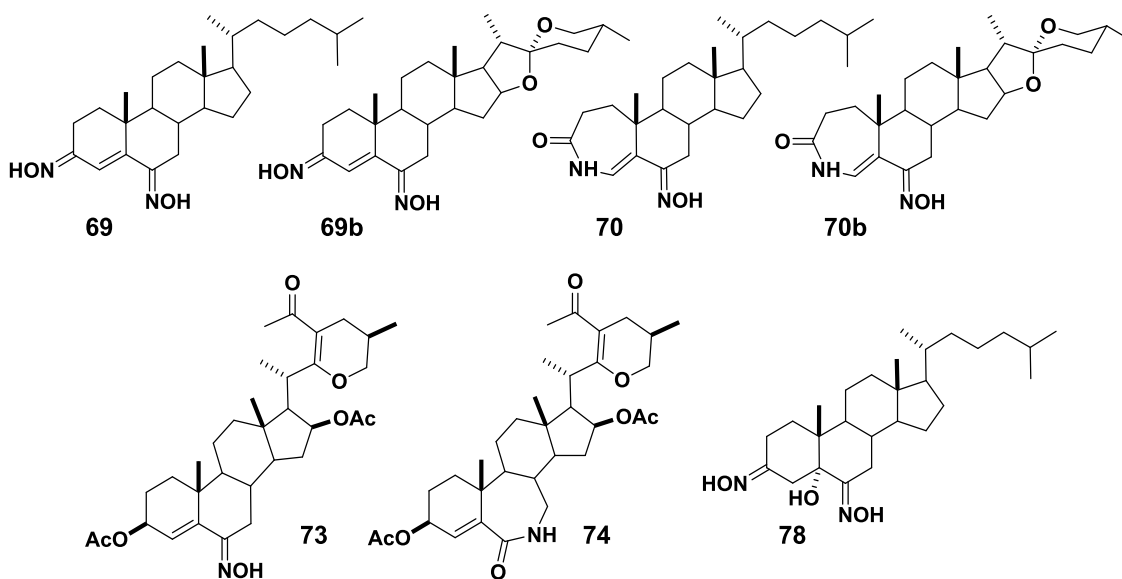
I.- RESUMEN

Partiendo del colesterol y diosgenina fueron sintetizados una serie de novedosos compuestos nitrogenados en los anillos A y B mediante reacciones como oxidación, condensación, oximación y rearrreglo de Beckmann. Los compuestos sintetizados contienen grupos dioximas (**69**, **69b** y **78**); oxima y lactama (**70** y **70b**) u oxima o lactama (**73** y **74**). Las estructuras fueron elucidadas mediante espectroscopia de RMN (1D y 2D), FT-IR y espectrometría de masas. A los compuestos formados se les realizó un ensayo para evaluar la actividad citotóxica frente a la línea de cáncer de mama MCF-7 y la línea de células mononucleares de sangre periférica. Los resultados mostraron una capacidad citotóxica selectiva frente a la línea de cáncer MCF-7, siendo los compuestos **69**, **70b**, **73** y **78** los que mostraron una mayor actividad con valores de Cl_{50} de 8.2 μ M, 9.5 μ M, 7.9 μ M y 25.5 μ M, respectivamente. Además, se efectuaron estudios *in silico* de una librería de 18 compuestos conteniendo nitrógeno, tales como acoplamiento molecular (5β -reductasa, 17β -HSD, CYP19 y CYP17) y relaciones estructura-actividad de parámetros fisicoquímicos y farmacológicos, así como su perfil de actividad biológica; 6 de éstos, incluyendo a **78**, mostraron una mayor afinidad con las enzimas 17β -HSD y CYP17. Mientras que 17 compuestos, cumplieron los criterios de similitud de propiedades farmacocinéticas y farmacológicas para fármacos aprobados.




II.- ABSTRACT

A series of steroidal compounds containing nitrogen in the A or B ring were synthesized using cholesterol and diosgenin as starting materials. Reactions such as oxidation, condensation, oximation and Beckmann rearrangement were carried out to obtain the desired products. Compounds containing dioximes (**69**, **69b** and **78**), lactam and oxime (**70** and **70b**) and oxime or lactam (**73** and **74**) were obtained in this work. The products were characterized by 1D and 2D NMR, FT-IR and Mass Spectrometry. These compounds were evaluated for their cytotoxic activity against MCF-7 cancerous cells line and peripheral blood mononuclear cells line. Compounds **69**, **70b**, **73** and **78** exhibited the highest activity with GI₅₀ values of. 8.2 μ M, 9.5 μ M, 7.9 μ M y 25.5 μ M, respectively. In addition, *in silico* analysis of a set of 18 compounds was accomplished including docking molecular (5β -reductasa, 17β -HSD, CYP19 and CYP17) and physicochemical and pharmacological relationship-activity studies and biological activity profile. The results revealed that 6 compounds, including **78**, showed the highest affinity with the 17β -HSD and CYP17 enzymes. 17 steroids showed comparable pharmacological and pharmacokinetic properties compared to approved drugs.



III.- LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

3,5-DMP	3,5-dimetilpirazol.
ATR	Attenuated Total Reflection (por sus siglas en inglés).
c	Señal cuádruple (RMN).
CCRF-CEM	Línea celular para la leucemia linfoblástica-T aguda humana.
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media máxima.
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica.
COSY	Correlation Spectroscopy (por sus siglas en inglés).
δ	Desplazamiento químico en ppm (en RMN).
d	Señal doble (RMN).
dd	Señal doble de dobles (RMN).
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (por sus siglas en inglés).
DMF	<i>N, N</i> -Dimetilformamida.
HBP	Hiperplasia Benigna Prostática.
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence (por sus siglas en inglés).
HSQC	Heteronuclear Spectrum Quantum Correlation (por sus siglas en inglés).
FT-IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento (RMN).
JURKAT	Línea celular para la leucemia aguda de células T humana.
K562	Línea celular para la leucemia mielógena crónica humana.
MOLT-24	Línea celular para la leucemia linfoblástica-T aguda humana.
MsCl	Cloruro de metanosulfonilo.



PCC	Clorocromato de piridinio.
<i>p</i> -TsOH	Ácido <i>p</i> -toluenosulfónico.
POPAM	Ácido 3-[4-(bis(2-cloroetil)amino)fenoxi]propiónico.
RMN de ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón.
RMN de ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono-13.
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, médium (por sus siglas en inglés)
SOCl ₂	Cloruro de tionilo.
SUP-B15	Línea celular para la leucemia linfoblástica-B aguda humana.
TMS	Tetrametilsilano.
THF	Tetrahidrofurano.
UV	Ultravioleta.

IV.- LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Numeración del esqueleto esteroidal.	1
Figura 2.	Numeración del lanosterol.	1
Figura 3.	Policiclos con configuración <i>trans</i> (5α) y <i>cis</i> (5β).	2
Figura 4.	Estructuras moleculares de algunos azaesteroides naturales.	3
Figura 5	Estructura molecular de la finasterida (azaesteroide sintético).	4
Figura 6	Azaesteroides naturales con nitrógenos dentro del núcleo esteroidal.	5
Figura 7	Azaesteroides sintéticos con nitrógenos fuera del núcleo esteroidal.	5
Figura 8	Azahomoesteroides con actividad frente a líneas celulares cancerosas.	7
Figura 9	Estructura molecular del POPAM.	7
Figura 10	Híbridos 13-16 con efectos anti-leucémicos.	8
Figura 11	Estructura molecular del 4,6-diaza-A,B-dihomo-24-etilcolest-22-en-3,7-diona.	9
Figura 12	Azahomoesteroides con actividad anti-fertilidad.	9
Figura 13	Estructura molecular de oximas aisladas de las esponjas marinas <i>Cinachyrella</i> (<i>C. alloclada</i> y <i>C. apion</i>).	13
Figura 14	Estructura de la enzima 5β -reductasa extraída del PDB con número 3BUR teniendo como ligando al glicerol, NADP y la testosterona (TES).	20
Figura 15	Estructura de la enzima 17β -HSD tipo I extraída del PDB con número 3HB5, teniendo como cofactor al NADP ⁺ y como ligando al 3-[[$(9\beta, 14\beta, 16\alpha, 17\alpha)$ -3,17-dihidroxiestra-1, 3,5(10)-trien-16-il] metil] benzamida (E ₂ B).	21
Figura 16	Estructura de la enzima aromatasa extraída del PDB con número 3S79, teniendo como cofactor al grupo hemo y un grupo fosfato y como ligando a la androstenediona (ASD).	22

Figura 17	Estructura de la enzima CYP17 extraída del PDB con número 3SWZ, teniendo un grupo hemo y como ligando a la molécula (3 α , 8 α)-17-(1H-bencimidazol-1-il) androsta-5,16-dien-3-ol (TOK).	23
Figura 18	Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 y $\text{DMSO-}d_6$) de los compuestos 69 y 69b .	39
Figura 19	Espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$) de los compuestos 69 y 69b .	40
Figura 20	Espectros ESI-MS-(+) de a) compuesto 69 y b) compuesto 69b .	41
Figura 21	Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$) de los compuestos 70 y 70b .	43
Figura 22	Espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$) de los compuestos 70 y 70b .	44
Figura 23	Espectros de FT-IR de los compuestos 70 y 70b .	45
Figura 24	Espectros ESI-MS-(+) de a) compuesto 70 y b) compuesto 70b .	46
Figura 25	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) de los compuestos 71 y 71* .	47
Figura 26	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3) del compuesto 72 .	48
Figura 27	Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) del compuesto 73 .	50
Figura 28	Espectro de ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$) del compuesto 73 .	51
Figura 29	Espectro ESI-MS-(+) del compuesto 73 .	52
Figura 30	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) del compuesto 74 .	53
Figura 31	Experimento COSY en CDCl_3 del compuesto 74 .	54
Figura 32	Experimento HSQC en CDCl_3 del compuesto 74 .	54
Figura 33	Experimento HMBC en CDCl_3 del compuesto 74 .	55
Figura 34	Espectro de FT-IR del compuesto 74 .	56

Figura 35	Espectro de ESI-MS-(+) del compuesto 74 .	56
Figura 36	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) del compuesto 75 .	58
Figura 37	Espectro de FT-IR del compuesto 75 .	59
Figura 38	Espectro de FT-IR del compuesto 76 .	60
Figura 39	Espectro ESI-MS-(-) del compuesto 76 .	61
Figura 40	Espectro de FT-IR del compuesto 77 .	62
Figura 41	Espectro ESI-MS-(+) del compuesto 77 .	63
Figura 42	Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) del compuesto 78 .	65
Figura 43	Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$) del compuesto 78 .	66
Figura 44	Espectro ESI-MS-(+) del compuesto 78 .	67
Figura 45	Ensayo de viabilidad de las células cancerosas MCF-7 a diferentes concentraciones de los compuestos 69 , 69b , 70 y 70b después de 48 h ($P < 0.001$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD, $***P < 0.001$, $**P < 0.05$, ns = no significativo; comparado con el control (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA).	69
Figura 46	Cambio en la morfología de las células MCF-7 después 48 h en el control, el H_2O_2 y en los tratamientos a las concentraciones indicadas.	70
Figura 47	Ensayo de viabilidad de las CMSP a diferentes concentraciones de los compuestos 69 , 69b , 70 y 70b después de 48 h ($P < 0.05$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA).	71
Figura 48	Cambio en la morfología de las CMSP y la precipitación del compuesto 69 a altas concentraciones.	71

Figura 49	Ensayo de viabilidad de las células cancerosas MCF-7 a diferentes concentraciones de los compuestos 71 , 71* , 72 , 73 y 74 después de 48 h ($P < 0.001$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD, $***P < 0.001$, $**P < 0.05$, ns = no significativo; comparado con el control (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA).	73
Figura 50	Cambio en la morfología de las células MCF-7 después 48 h en el control, el H_2O_2 y en los tratamientos a las concentraciones indicadas de la ruta 2 de síntesis.	73
Figura 51	Ensayo de viabilidad de las CMSP a diferentes concentraciones de los compuestos 71 , 71* , 72 , 73 y 74 después de 48 h ($P < 0.05$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA).	75
Figura 52	Ensayo de viabilidad de las células cancerosas MCF-7 a diferentes concentraciones del compuesto 78 después de 48 h ($P < 0.001$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA).	77
Figura 53	Cambio en la morfología de las células MCF-7 después 48 h en el control, el H_2O_2 y en 78 a una concentración de 7.8 $\mu\text{g/mL}$.	77
Figura 54	a) Ensayo de viabilidad de las CMSP a diferentes concentraciones del compuesto 78 después de 48 h ($P < 0.001$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA). b) Morfología de las células MCF-7 después 48 h de tratamiento a una concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$.	78

Figura 55	Cálculo de validación del algoritmo de acoplamiento molecular (Presentación del cálculo de RMSD, cálculo realizado en el programa PyMOL molecular Graphics System 2016).	83
Figura 56	Optimización de energía para el ligando 81 .	87
Figura 57	Acoplamiento del ligando 81 con el sitio activo de la enzima 5 β -reductasa visualizada en Discovery Studio (https://www.3ds.com/).	87
Figura 58	Cálculo de validación del algoritmo de acoplamiento molecular (Presentación del cálculo de RMSD, cálculo realizado en el programa PyMOL molecular Graphics System 2016).	89
Figura 59	Acoplamiento del ligando 81 con el sitio activo de la enzima 17 β -HSD visualizada en Discovery Studio (https://www.3ds.com/).	93
Figura 60	Cálculo de validación del algoritmo de acoplamiento molecular del ligando cristalizado en una caja de 25 (izquierda) y una caja de 30 (derecha) (Presentación del cálculo de RMSD, cálculo realizado en el programa PyMOL molecular Graphics System 2016).	95
Figura 61	Optimización de energía para el ligando 160 .	99
Figura 62	Acoplamiento del ligando 160 con el sitio activo de la enzima CYP19A1 visualizada en Discovery Studio (https://www.3ds.com/).	99
Figura 63	Cálculo de validación del algoritmo de acoplamiento molecular (Presentación del cálculo de RMSD, cálculo realizado en el programa PyMOL molecular Graphics System 2016)	101
Figura 64	Optimización de energía para el ligando 110 .	105

Figura 65	Acoplamiento del ligando 110 con el sitio activo de la enzima CYP17A1 visualizada en Discovery Studio (https://www.3ds.com/).	105
Figura 66	Optimización de energía de los ligandos 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81b, 90, 100, 120, 130, 140, 150 y 160b .	148
Figura 67	Acoplamiento del ligando 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81b, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 y 160b con el sitio activo de la enzima 5β -reductasa visualizada en Discovery Studio (https://www.3ds.com/).	149
Figura 68	Acoplamiento del ligando 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81b, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 y 160b con el sitio activo de la enzima 17β -HSD visualizada en Discovery Studio (https://www.3ds.com/).	150
Figura 69	Acoplamiento del ligando 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81, 81b, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 y 160b con el sitio activo de la enzima CYP19A1 visualizada en Discovery Studio (https://www.3ds.com/).	151
Figura 70	Acoplamiento del ligando 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81, 81b, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160 y 160b con el sitio activo de la enzima CYP17A1 visualizada en Discovery Studio (https://www.3ds.com/).	152

V.- LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Condiciones de reacción en el proceso de oxidación del colesterol y diosgenina.	38
Tabla 2	Actividad citotóxica (μM) de los compuestos sintetizados frente a las líneas MCF-7 y CMSP.	79
Tabla 3	Datos de energía y valores de RMSD de la enzima 5β -reductasa (residuo de Tyr132A/O) y su ligando cristalizado (testosterona).	82
Tabla 4	Interacciones entre la enzima 5β -reductasa y los ligandos 69-160b .	84
Tabla 5	Datos de energía y valores de RMSD de la enzima 17β -HSD (residuo de Asn152/N) y su ligando cristalizado (E_2B).	88
Tabla 6	Interacciones entre la enzima 17β -HSD y los ligandos 69-160b .	90
Tabla 7	Datos de energía y valores de RMSD de la enzima CYP19A1 (residuo de Met374/NH) y su ligando cristalizado (ASD).	94
Tabla 8	Interacciones entre la enzima CYP19A1 y los ligandos 69-160b .	96
Tabla 9	Datos de energía y valores de RMSD de la enzima CYP17A1 (residuo de Asn202/OD1) y su ligando cristalizado (TOK-001).	100
Tabla 10	Interacciones entre la enzima CYP17A1 y los ligandos 69-160b .	103
Tabla 11	Energías de afinidad (Kcal/mol) de los ligandos 69-160b .	106
Tabla 12	Parámetros fisicoquímicos obtenidos del programa Molinspiration Cheminformatics de los compuestos 69-160b .	108
Tabla 13	Valores de ADMET de los compuestos 69-160b .	111
Tabla 14	Predicción de la actividad mediante el programa PASS online de los compuestos 69-160b .	114

1. INTRODUCCIÓN

Los esteroides son moléculas lipofílicas de importancia notable en la fisiología humana, como ejemplos se pueden mencionar los ácidos biliares, las hormonas sexuales, los glucósidos cardioactivos, las sapogeninas y los alcaloides esteroideos.¹ De acuerdo a la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (UIQPA), los esteroides de manera estructural están conformados por el ciclopentanoperhidrofenantreno o un derivado de este; obtenido mediante rupturas, alargamientos o contracciones de los anillos. Los anillos se nombran A, B, C y D, numerados tal como se muestra en la **Figura 1**. Es común encontrar en las posiciones C-10 y C-13 grupos metilos, numerados como 19 y 18, respectivamente y una cadena lateral sobre la posición C-17.

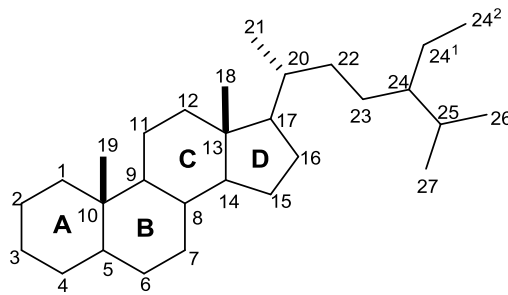


Figura 1. Numeración del esqueleto esteroideal.

En caso de que exista una cadena lateral en C-17, los sustituyentes se enumeran del 20-27 (los sustituyentes en dicha cadena principal serán asignados con superíndices). Los números 28, 29 y 30 son asignados a grupos metilos adicionales en las posiciones 4 y 14 en triterpenoides, por ejemplo, en el lanosterol (**Figura 2**).

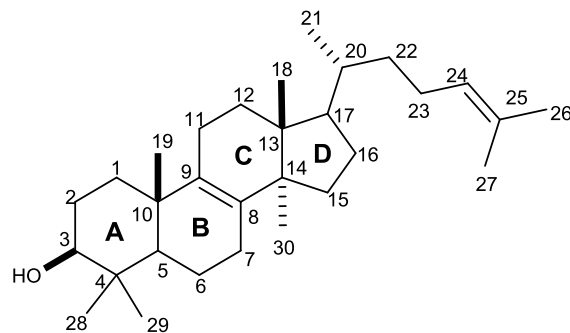


Figura 2. Numeración del lanosterol.

La estereoquímica del esteroide se define con base en la fusión de los anillos, se denomina un esteroide 5α cuando la fusión de A y B es *trans* y 5β cuando es *cis*.² Los anillos B-C siempre se fusionan en *trans* mientras que los anillos C-D pueden existir en su forma *cis* o *trans*, tal como se muestra en la **Figura 3**. Dicha estereoquímica les confiere diferentes propiedades físicas y químicas.³

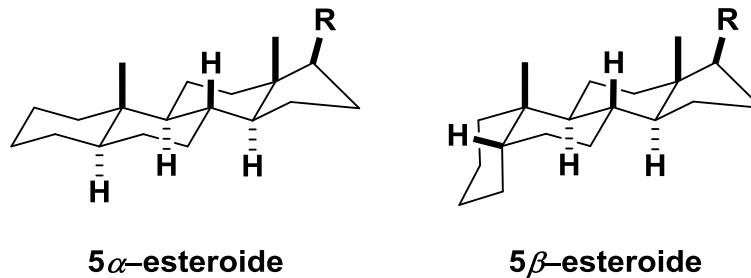


Figura 3. Polímeros en configuración *trans* (5α) y *cis* (5β).

Los esteroides están implicados en muchas funciones fisiológicas importantes para el ser humano, sin embargo, la alta concentración de esteroides de tipo androestano y estrogénico está relacionada con la proliferación de células malignas provocando el cáncer hormonalmente dependiente,² por ejemplo el cáncer de próstata, el cáncer de mama y de endometrio.⁴ Algunas terapias utilizadas en el tratamiento de estos tipos de cáncer consisten en el uso de una antihormona, esta bloquea la acción de una hormona sobre su receptor. Así también, la utilización de un inhibidor en la biosíntesis de hormonas se emplea frecuentemente para reducir su concentración. También, se han combinado ambas estrategias mediante la aplicación de un fármaco con acción dual. En atención a la estrategia de inhibición, se tienen reportes en varias enzimas relacionadas a la biosíntesis de hormonas. Por ejemplo, la inhibición de la enzima aromatasa (CYP19), encargada de catalizar la transformación de la testosterona a estradiol; es empleada como una solución momentánea en el tratamiento del cáncer de mama. El uso de inhibidores de las enzimas 5α -reductasas en el tratamiento de hiperplasia benigna prostática (HBP) y en casos más recientes, la utilización de un inhibidor de la enzima 17α -hidrolasa/C-17,20 liasa (CYP17) para el tratamiento de cáncer de próstata.⁴

Dentro de la familia de los esteroides, destaca un grupo de compuestos con un amplio rango de actividades biológicas llamados azaesteroides. Las actividades más importantes reportadas son antiinflamatoria,⁵ antihipercolesterolémica,⁵ dilatación coronaria,⁵ antitumoral⁶ y propiedades antibacterianas.⁷ Las últimas actividades se presentan con mayor efecto en esteroides que contengan átomos de nitrógeno.⁸ Los azaesteroides son compuestos que se pueden presentar de forma natural y sintética. Dentro de los naturales se encuentran los alcaloides en su forma glicosilada, los cuales son metabolitos de defensa frente a agentes externos y se les ha atribuido propiedades fungicidas e insecticidas.⁹ Las formas agliconas de algunos de los compuestos que forman parte de la familia de las *solanaceae*: son la solanidina, proveniente de la hidrólisis de los glicoalcaloides α -chaconina y α -solanina de las papas (**1**); la solasodina, derivado de la solasonina en las berenjenas (**2**) y la tomatidina, derivada de la α -tomatina proveniente de los tomates verdes (**3**).¹⁰ Las estructuras de estos azaesteroides naturales, se muestran en la **Figura 4**.

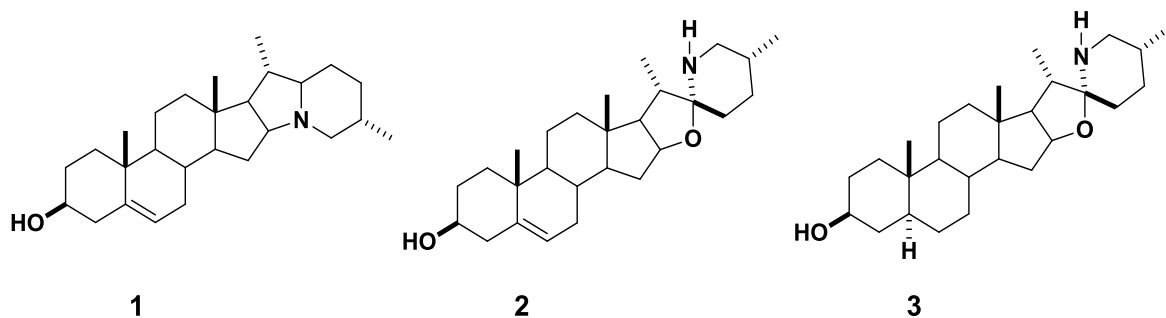


Figura 4. Estructuras moleculares de algunos azaesteroides naturales.

Por otra parte, como ejemplos de azaesteroides sintéticos se encuentra la finasterida (**Figura 5**) aprobada clínicamente contra la HBP, debido a que inhibe la acción de la enzima 5α -reductasa responsable de la transformación de la testosterona a dihidrotestosterona.¹¹

Dentro de los azaesteroides sintéticos cabe mencionar a los azahomoesteroides; llamados así porque alguno de los anillos del núcleo esteroidal ha sido expandido.² Los azahomoesteroides son compuestos que han sido sintetizados y modificados para aumentar la actividad biológica de los esteroides y a nivel de síntesis muchos de ellos se forman a través del intermediario oxima.¹² Ambas moléculas han sido objeto de estudio frente a varios tipos de líneas celulares.¹³ En años recientes, con el fin de disminuir los efectos producidos por los tratamientos inespecíficos contra el cáncer se han diseñado derivados azahomoesteroides esterificados y con agentes alquilantes; los cuales promueven una mayor absorción en el organismo.¹⁴ Por consiguiente, los agentes alquilantes disminuyen su toxicidad al estar unidos al esteroide y el esteroide aumenta su actividad lo que provoca que sean compuestos de interés biológico.¹⁴

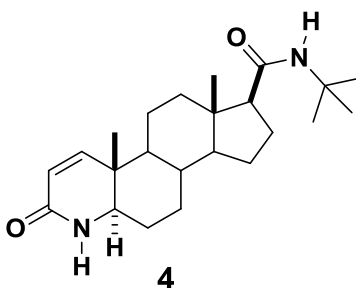


Figura 5. Estructura molecular de la finasterida (azaesteroides sintético).

Dada la importancia de los compuestos esteroidales nitrogenados, en este trabajo se realizó la síntesis de esteroides de tipo oxima y lactama con potencial actividad como agentes citotóxicos.

2. ANTECEDENTES

2.1.- Azaesteroides

Estos compuestos poseen átomos de nitrógeno fuera o dentro del núcleo del ciclo pentanoperhidrofenantreno. Cuando el átomo de nitrógeno se encuentra formando parte del ciclo, se denomina azaesteroide endonuclear. Acudimos a ejemplos en la naturaleza, tal es el caso de la familia de las *Salamandridae*. En específico, la salamandra europea posee alcaloides esteroideos liposolubles cuya función es la de proporcionar cierto grado de toxicidad, ejemplos de estos se muestran en la **Figura 6**.¹⁵

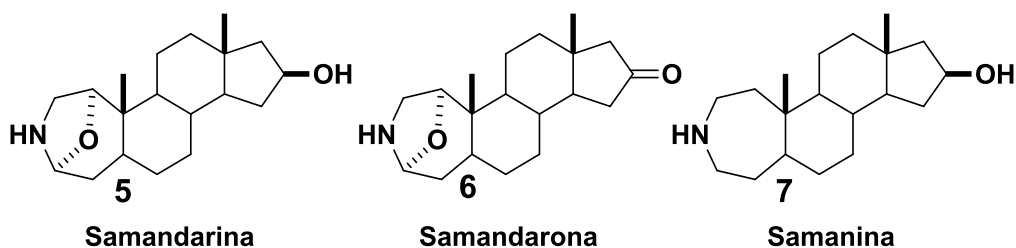


Figura 6. Azaesteroides naturales con nitrógenos dentro del núcleo esteroidal.

Se denomina azaesteroide exonuclear, cuando el o los átomos de nitrógeno se encuentran fuera del núcleo esteroidal. Por ejemplo, el bromuro de pancuronio empleado como un agente bloqueante neuromuscular (**8**).¹⁶ Otra alusión es la dutasterida (**9**), siendo éste utilizado como un potente inhibidor de la enzima 5 α -reductasa al igual que la finasterida (**Figura 7**).¹⁷

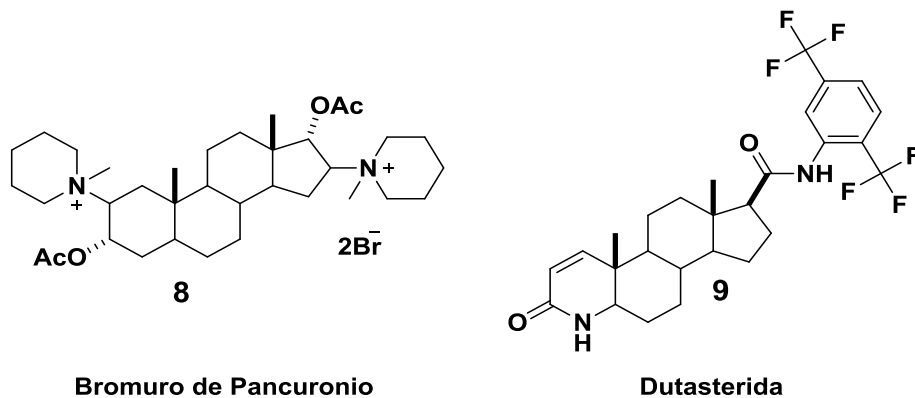



Figura 7. Azaesteroides sintéticos con nitrógenos fuera del núcleo esteroidal.



La numeración de estos compuestos enfatiza la posición del nitrógeno en la estructura tal es el caso de los 3, 4, 6, 10, 11 y 14 azaesteroides, los cuales han sido ampliamente reportados por su actividad inhibitoria frente a la enzima 5 α -reductasa.¹⁸ Otras actividades biológicas descritas para los azaesteroides son: bloqueador neuromuscular,¹⁹ antifúngica,²⁰ inhibidor de la enzima fosfatidilinositol fosfolipasa C (encargada de regular la concentración de Ca²⁺ y la proteína quinasa C)²¹ y antibacteriana.²²

2.2.- Oximas esteroidales

Las oximas esteroidales adquirieron relevancia a partir de que en 1997, se aislaron de esponjas marinas dos compuestos conteniendo un grupo hidroxiimino en la posición 6 del esteroide. Ambos metabolitos, mostraron una buena actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares HT-29 y MEL-28.²³ A partir de este descubrimiento, diversos grupos de investigación han sintetizado una extensa variedad de oximas esteroidales mostrando que el grupo hidroxiimino confiere actividad antiproliferativa al esteroide.²⁴ No obstante, uno de los grandes desafíos en la síntesis de este tipo de moléculas es la obtención de oximas diastereoisoméricas *E* o *Z* en su forma pura ya que normalmente se obtienen mezclas de éstas. Por otra parte, las oximas esteroidales se han utilizado como precursores en la síntesis de azahomoesteroides.²⁵

2.3.- Azahomoesteroides

Los azahomoesteroides son compuestos que también tienen reportadas valiosas y diferentes actividades biológicas tales como; citotóxica²⁶, antibacteriana²⁶ y anti-leucémica.²⁷ La principal característica estructural de estos compuestos es la expansión de sus anillos, como ya se mencionó, en ocasiones por acción de un heteroátomo (en este caso el nitrógeno). El grupo lactámico, presente en los azahomoesteroides posee interés biológico dado que este grupo tiene afinidad con los aminoácidos presentes en los receptores celulares.²⁸ Esto debido a que, la fracción esteroidea y la fracción lactama deterioran las señales bioquímicas (metabolismo de esteroides y lípidos/ruta de la proteína quinasa C). En la literatura,

se han descrito síntesis de agentes alquilantes unidos a esteroides con grupos lactámicos; observando la reducción de la toxicidad y el aumento de la actividad antitumoral en compuestos utilizados para tratamientos contra el cáncer.²⁹ La acción de los azahomoesteroides proviene de inducir la apoptosis en células específicas, mediante los receptores celulares e inhibir en gran medida el crecimiento en células tumorales.³⁰ Como muestra de ello, están los compuestos **10** y **11** que presentaron un CI_{50} de magnitud μM frente a líneas celulares cancerosas HT-29 (carcinoma de colon), GNE 2 (carcinoma nasofaríngeo), SPC-A (carcinoma de pulmón), Tu 686 (carcinoma de laringe) y PC-3 (adenocarcinoma de próstata) (**Figura 8**). Además, el compuesto **10** inhibió el crecimiento tumoral en un modelo de ratón atímico; sugiriendo al compuesto como un candidato a fármaco para el tratamiento de cáncer de próstata.³¹

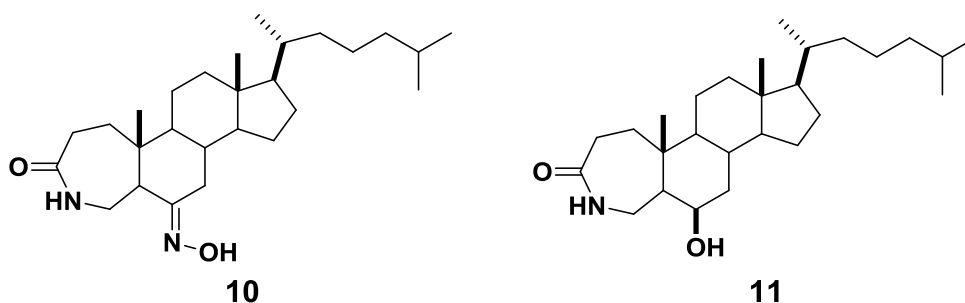


Figura 8. Azahomoesteroides con actividad frente a líneas celulares cancerosas.

También, se ha optado por realizar híbridos de lactamas esteroidales con compuestos como el denominado ácido 3-[4-(bis(2-cloroetil)amino)fenoxi]propiónico (POPAM) (**Figura 9**).

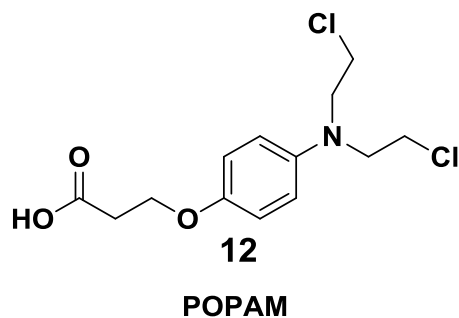


Figura 9. Estructura molecular del POPAM.

El POPAM es un agente alquilante no esteroideal utilizado y bien establecido en las terapias anticancerígenas; teniendo como función principal el impedir la reproducción de las células al dañar el ADN. Éste ejerce una acción en todas las fases del ciclo celular y debido a esto, puede afectar a las células de la médula ósea. Los híbridos formados por el POPAM y un esteroide han mostrado disminuir los efectos secundarios del agente alquilante. Los compuestos híbridos **13-16** mostraron una disminución de los efectos tóxicos que normalmente produciría por sí mismo el POPAM. Mientras que, propiciaron una mejora en la biodisponibilidad y en los efectos antitumorales (**Figura 10**).³²

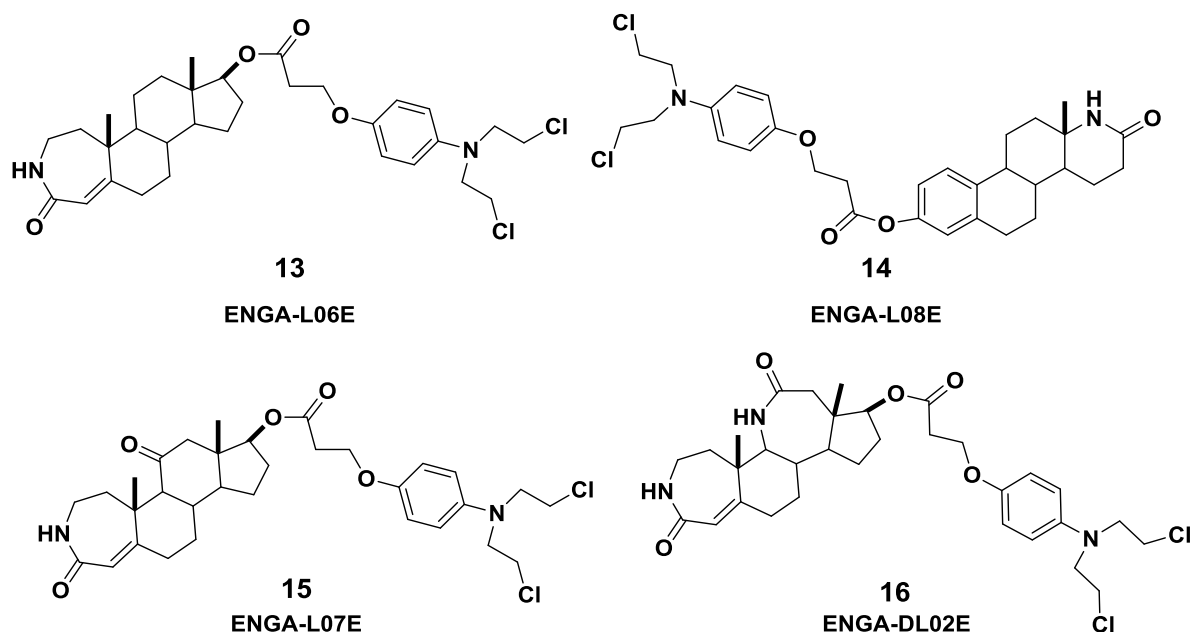
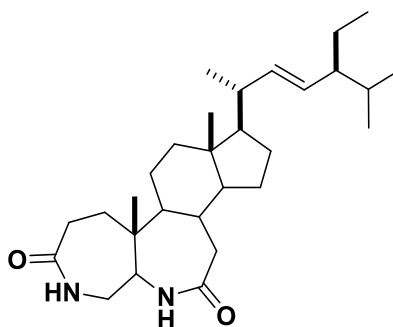


Figura 10. Híbridos **13-16** con efectos anti-leucémicos.

Otras moléculas novedosas son aquellas que contienen una doble lactama, éstas han sido reportadas y sintetizadas en muy pocas ocasiones mediante oxidación, reducción, oximación y transposición de Beckmann. El compuesto 4,6-diaza-A,B-dihomo-24-etilcolest-22-en-3,7-diona (**17**), es una bi-lactama en los anillos A y B sintetizada a partir del sitosterol. Esta molécula fue evaluada frente a cuatro líneas celulares importantes como la SGC-7901 (línea celular del carcinoma gástrico), Bel7404 (línea hepatocelular), HeLa (línea celular del cáncer cervicouterino) y HT-

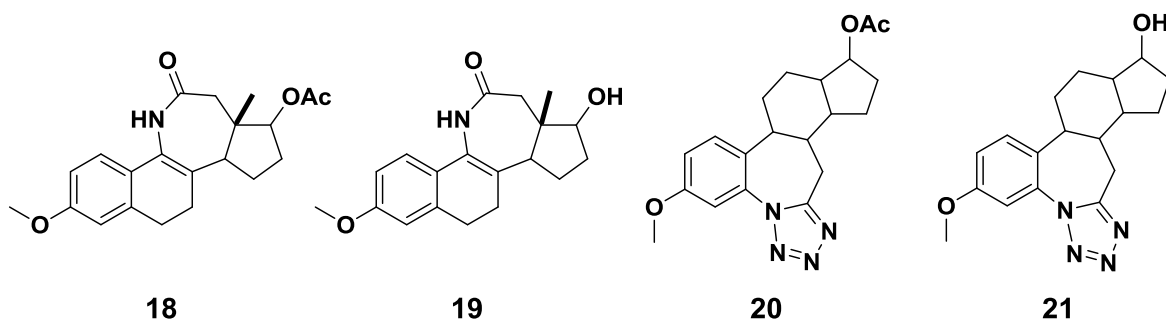
29 (línea celular del carcinoma de colón) (**Figura 11**).³³ En específico, el compuesto **17** mostró una importante citotoxicidad frente a las líneas celulares HeLa y SGC-7901.



17

Figura 11. Estructura molecular del 4,6-diaza-A,B-dihomo-24-etilcolest-22-en-3,7-diona.

No obstante, los azahomoesteroides no son solo conocidos como potenciales anti-leucémicos sino que, también se han descrito como compuestos contra la fertilidad partiendo de esteroides estrogénicos.³⁴ En la síntesis de 4 compuestos que se muestran en la **Figura 12**, dos de ellos; **18** y **21** evidenciaron mediante estudios con ratas inmaduras (peso de 25 a 30 g) que su administración estimulaba el aumento de la actividad estrogénica. La consecuencia de dicho aumento es la prevención de la fertilidad. Dejando así, a los compuestos azahomoesteroides como potenciales fármacos asociados a agentes progestacionales siendo posiblemente utilizados como métodos anticonceptivos postcoitales.³⁵



18

19

20

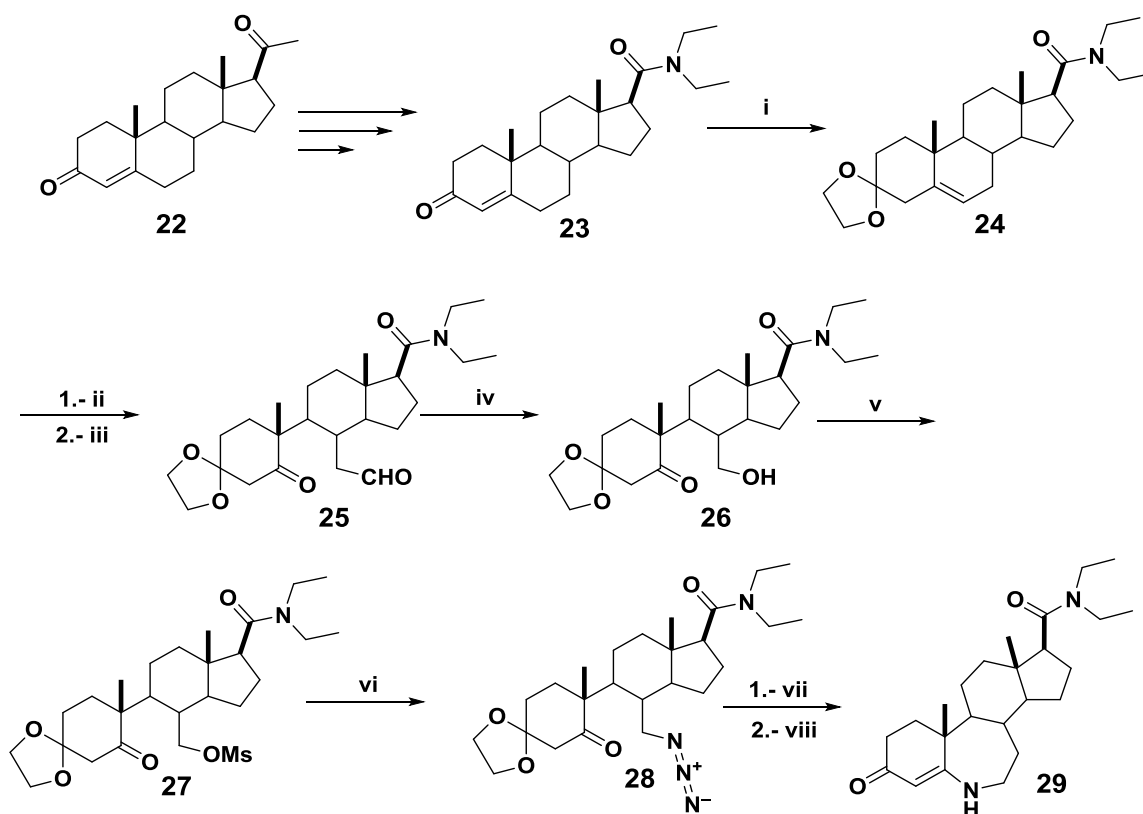
21

Figura 12. Azahomoesteroides con actividad anti-fertilidad.

2.4.- Síntesis de azahomoesteroides

Como se mencionó anteriormente, las azahomoesteroides se han reportado como antiproliferativos o como inhibidores de ciertas enzimas. La obtención de homolactamas se da mediante la transposición de Beckmann de una oxima específica. Las oximas se forman por medio de grupos funcionales como los aldehídos y/o cetonas, sin embargo; existen oximas intermediarias en reacciones de nitrosación utilizando agentes ácidos en sapogeninas esteroideas.³⁶

Como seguimiento de los métodos de síntesis en 1994, Maloney y colaboradores³⁷ reportaron la síntesis de B-homo-6-azaprogest-en-3-ona. Para su preparación, partieron de la progesterona (**22**), acoplado a la posición C-17 un agente alquilante formando a **23**. Como siguiente paso, se protegió la posición C-3 con etilenglicol dando lugar al desplazamiento del doble enlace al anillo B en la posición 5. Este desplazamiento fue beneficioso ya que posteriormente, se efectuó una ozonólisis seguido de una reducción con zinc en medio ácido generando a **25**. Después, el mismo compuesto **25** se redujo selectivamente hacía el alcohol primario formando así a **26**, seguido del ataque al cloruro de metanosulfonilo (haciendo al alcohol un mejor grupo saliente), lo que condujo a **27**. Posteriormente, mediante una reacción de sustitución nucleofílica se formó el azida **28** y como último paso se formó el intermediario iminofosfinato para luego llevarse a cabo la ciclación generando al compuesto **29**. Dicho compuesto se evaluó frente a la enzima 5 α -reductasa tipo II, alcanzado un valor de CI₅₀ de 3.8 nM (**Esquema 1**).

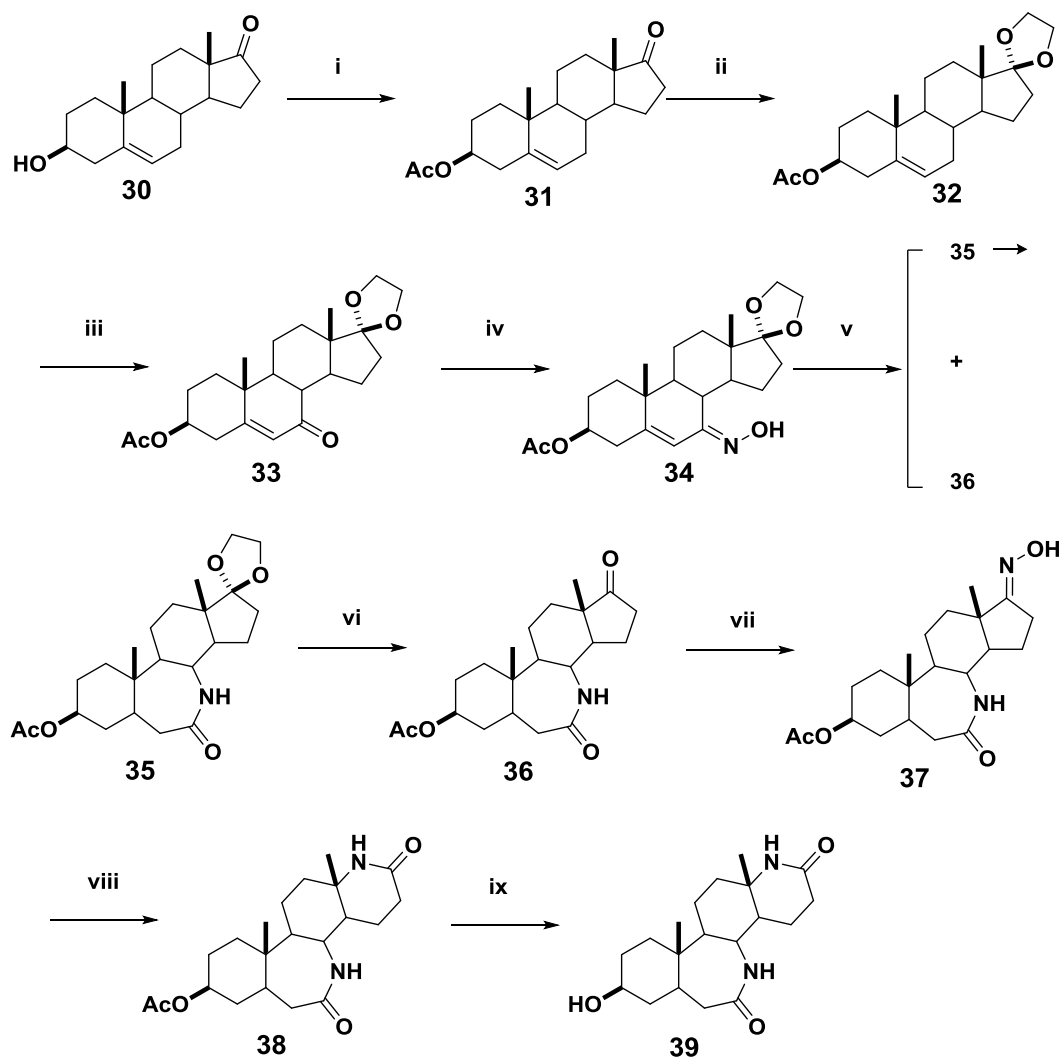


i) Etilenglicol, *p*-TSA, tolueno (55%). ii) O₃, MeOH, CH₂Cl₂. iii) Zn, AcOH (86%). iv) LiAlH.*(OtBu)*₃, THF.
v) MsCl, TEA, CH₂Cl₂. vi) NaN₃, DMF, 70°C. vii) P(Ph)₃, THF. viii) HCl, reflujo.

Esquema 1. Síntesis de azahomoesteroides B-homo 6-azaprogester-3-ona.

En 2003, Nikolaropoulos y colaboradores³⁸ se enfocaron en la síntesis de B, D-bi-homolactama con actividad citotóxica. Tomando como material de partida a la dehidroepiandrosterona (**30**), se esterificó la posición C-3 para después proteger la posición C-17 formando el acetal **32**. A continuación, se realizó la oxidación alílica utilizando CrO₃/3,5-DMP; ya que este evita la desprotección del acetal-17 a bajas temperaturas (-10°C a -20°C), produciendo con ello a **33** con un rendimiento del 78%. La oxima **34** fue preparada en condiciones ya reportadas con clorhidrato de hidroxilamina, esto a temperatura ambiente. Como siguiente paso, se efectuó la transposición de Beckmann mediante la adición de SOCl₂ en THF, formando los productos **35** y **36** con rendimientos de 16% y 52%, respectivamente. No obstante, **35** fue fácilmente hidrolizado con HCl en metanol para llegar a un único producto. Posteriormente, se llevó a cabo la formación de 17-hidroxiimino **37** para finalmente

formar la D-homolactama **38** y en última instancia, desproteger el grupo hidroxilo en la posición C-3 mediante LiOH en metanol (**Esquema 2**).



i) AcOH, H₂SO₄. ii) *p*-TsOH, etilenglicol, TEOF. iii) CrO₃, 3,5-DMP, CH₂Cl₂, -20°C, 5h. iv) NH₂OH.HCl, C₅H₅N, EtOH, reflujo, 2h. v) SOCl₂, THF, 0°C, 8h. vi) HCl_(ac), 1h 30min. vii) H₂NOH.HCl, C₅H₅N, EtOH, reflujo, 2h. viii) SOCl₂, dioxano, 5h. ix) LiOH, MeOH, 1h.

Esquema 2. Síntesis de B, D-bi-homolactama con actividad citotóxica.

Por su parte Huang y colaboradores,³⁹ se plantearon en 2014 la síntesis de compuestos azahomoesteroideos tomando como partida análogos de oximas aisladas de esponjas marinas. Dado que, las oximas (6*E*)-hidroxiimino-24-etilcolest-4-en-3-ona (**40**) y (6*E*)-hidroxiiminocolest-4-en-3-ona (**41**) han sido descritas con actividad citotóxica frente a las líneas celulares cancerígenas P-388, HT-29 y MEL-

28 (**Figura 13**); resultó interesante para este grupo de trabajo el realizar la síntesis de moléculas afines y evaluar su actividad citotóxica

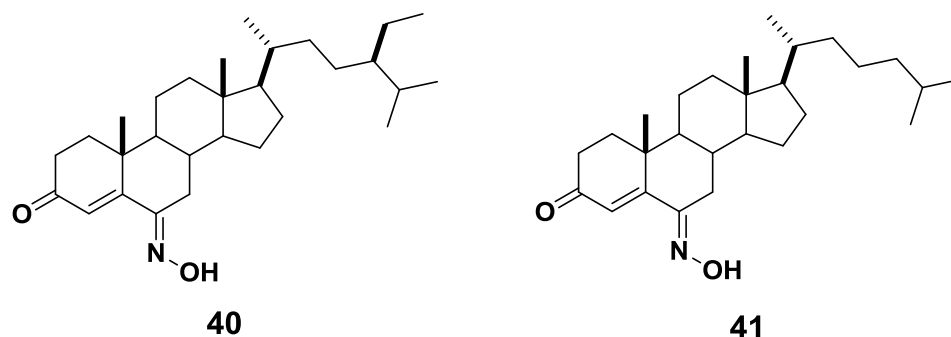
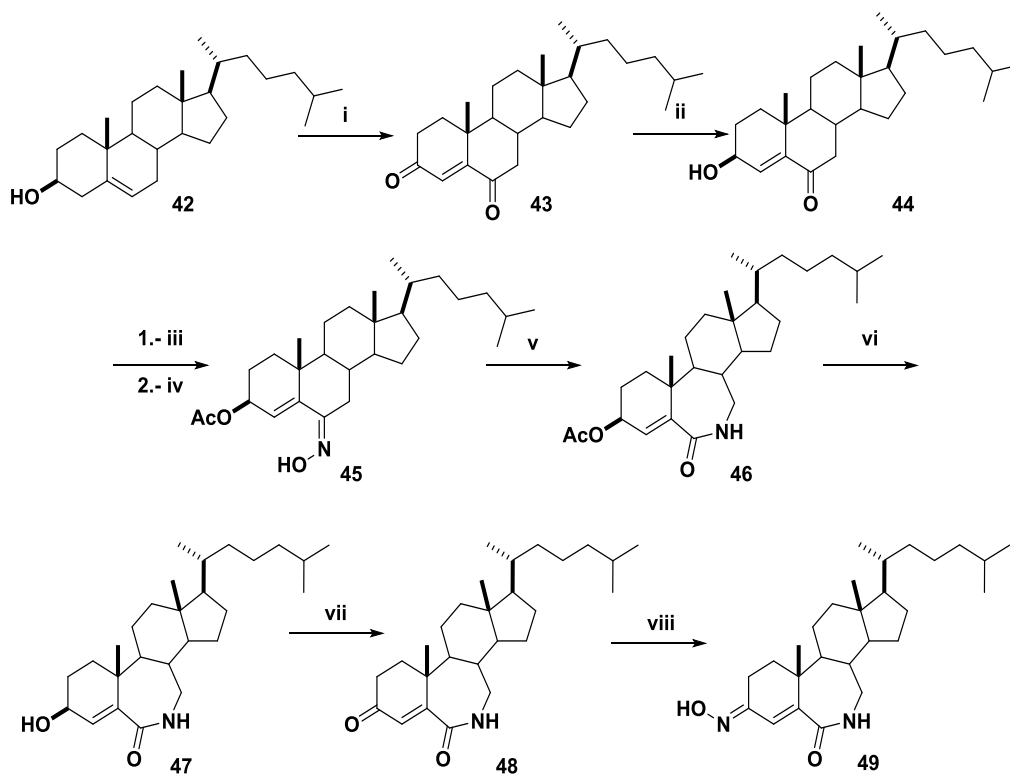


Figura 13. Estructura molecular de oximas aisladas de las esponjas marinas *Cinachyrella* (*C. alloclada* y *C. apion*).

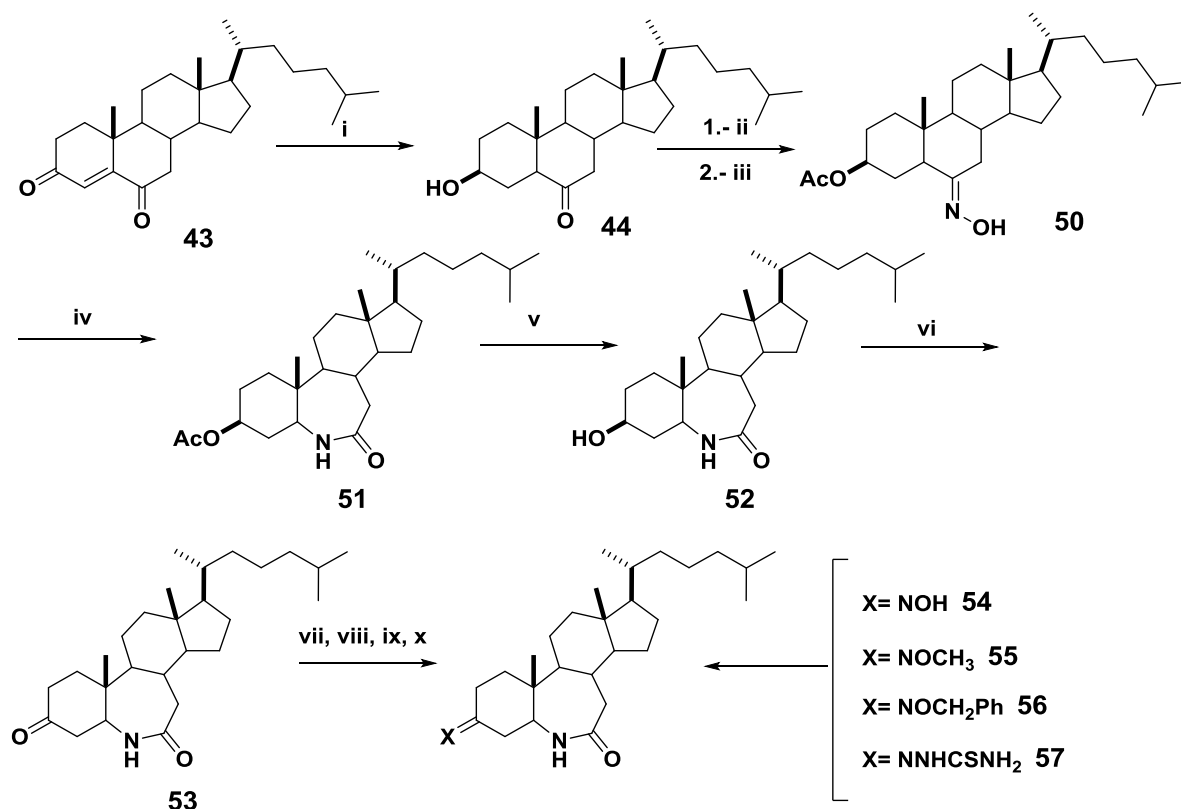
En primer lugar, se llevó a cabo una oxidación del C-3 y del Δ^5 con PCC en el núcleo del colesterol (**42**) conduciendo a la dicetona **43**. Luego, utilizando NaBH_4 en metanol se generó el alcohol **44** mediante una reducción selectiva en la posición C-3. A continuación, se formó el compuesto **45**, primeramente, protegiendo la posición C-3 al formar un éster; seguido de la formación del grupo hidroximinio en la posición C-6 mediante las condiciones ya citadas. De la forma se obtuvo a la lactama **46**, por medio de la transposición de Beckmann usando SOCl_2 . Una vez generada la lactama, se desprotegió la posición C-3 realizando una saponificación para posteriormente oxidar el alcohol intermediario generando el derivado **48**. Finalmente, se introdujo el grupo 3-hidroximinio obteniendo así a un homólogo de las oximas (**Esquema 3**).



i) PCC, CH₂Cl₂. ii) NaBH₄, CH₃OH, CoCl₂·6H₂O. iii) Ac₂O, piridina. iv) NH₂OH·HCl, NaOAc, EtOH, reflujo. v) SOCl₂, THF, 0°C. vi) 13% K₂CO₃, CH₃OH, reflujo. vii) reactivo de Jones, acetona, 2h. viii) NH₂OH·HCl, EtOH, reflujo.

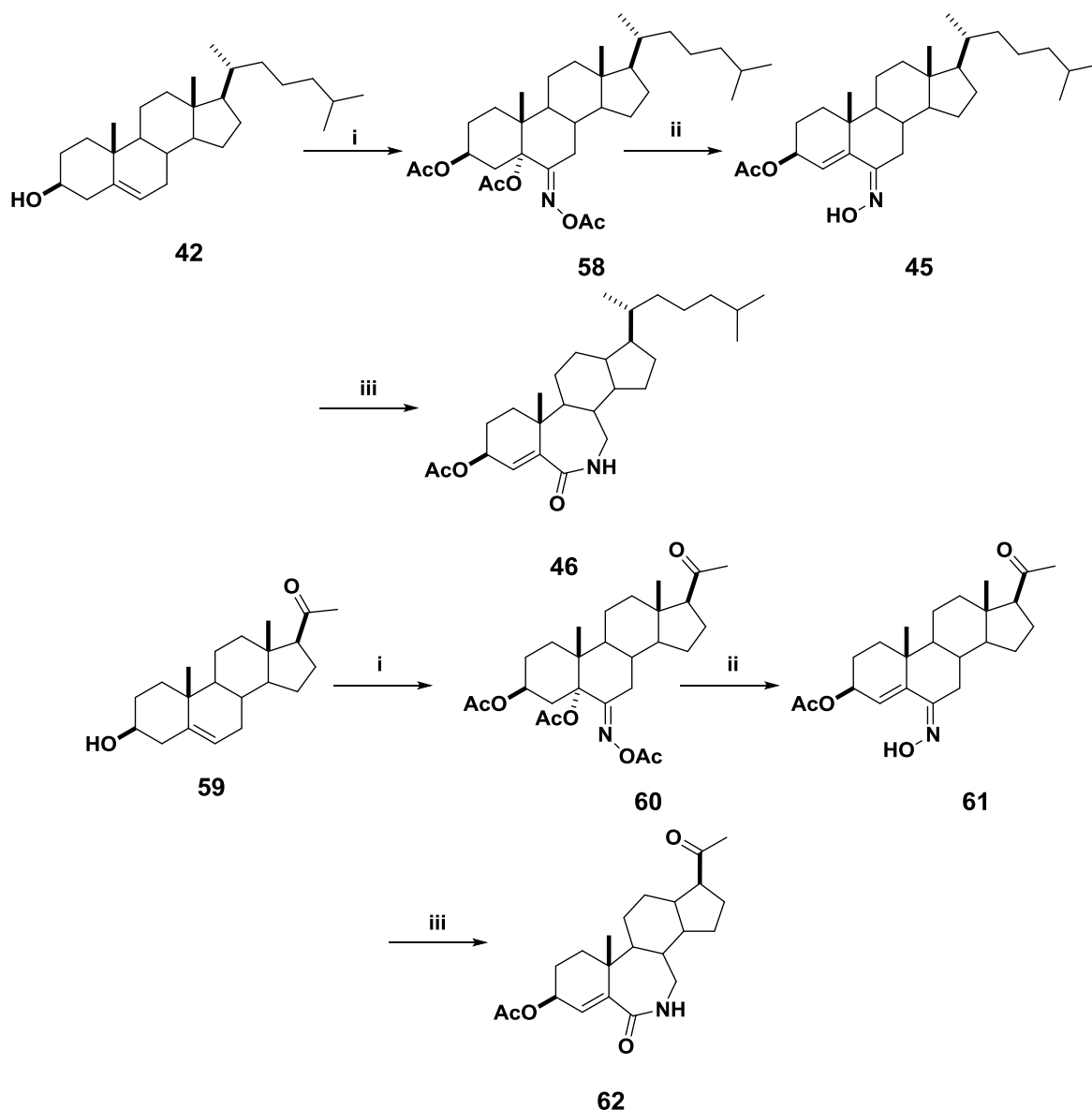
Esquema 3. Síntesis de 3-hidroxiimino-7-aza-B-homocolest-4-en-6-ona.

Para profundizar más en el estudio de la actividad biológica de los azahomoesteroides, este mismo grupo de investigación reportó la formación de otros derivados con grupos lactámicos en el anillo B y distintos sustituyentes en el C-3. Los derivados **54** a **57** se formaron a partir del colesterol mediante una ruta similar a la antes expuesta. Ahora, realizando todos los pasos anteriores partiendo de igual manera del colesterol llegando mediante PCC en CH₂Cl₂ hasta el compuesto **43**. Después, se formó la B-homolactama **51** mediante SOCl₂ en THF a 0°C siguiendo con la hidrólisis básica para obtener el alcohol **52**. Posteriormente, se oxidó la misma posición C-3 con el reactivo de Jones en acetona con el objetivo de funcionalizar dicha posición. Por último, se trató con diferentes sustituyentes formando derivados de oxima (**Esquema 4**).



Esquema 4. Síntesis de compuestos análogos de oximas.

En años recientes, Martínez-Pascual y colaboradores⁴⁰ realizaron la síntesis de azahomoesteroides partiendo de dos compuestos esteroidales importantes mediante rutas sintéticas más cortas. Para introducir el grupo oxima en el C-6 utilizaron una metodología novedosa de nitrosación del Δ^5 , usando la mezcla NaNO_2 , AcOH , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ y Ac_2O . El acetoximino **58**, pudo hidrolizarse selectivamente hacia **45** empleando Na_2CO_3 en CH_2Cl_2 . Por último, una transposición de Beckmann de la oxima **45** generó la lactama deseada **46**. Este protocolo se aplicó satisfactoriamente al núcleo de la pregnenolona obteniendo a la homolactama **62** (Esquema 5).

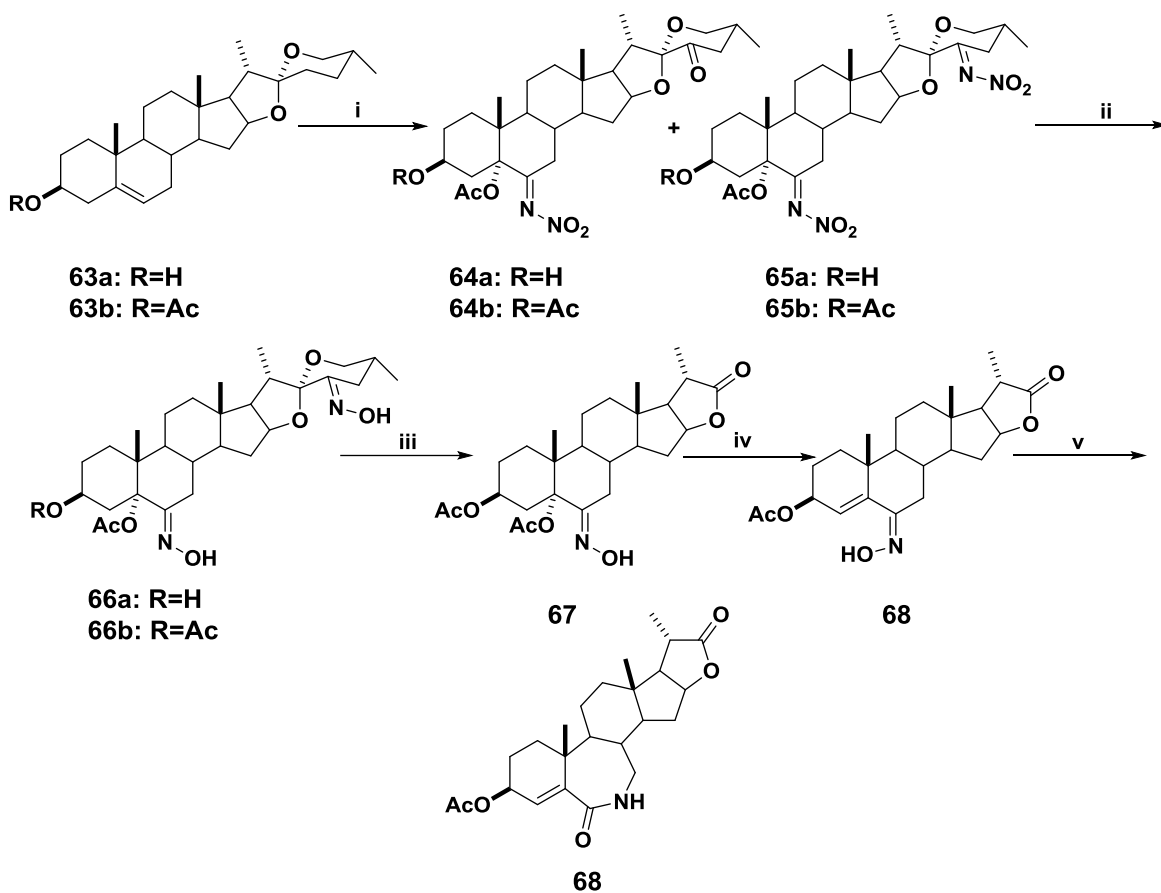


i) NaNO_2 , Ac_2O , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, AcOH . ii) Na_2CO_3 , CH_2Cl_2 , MeOH , reflujo. iii) SOCl_2 , dioxano

Esquema 5. Síntesis de B-homolactamas como agentes antiproliferativos.

En este mismo trabajo se reportó la obtención de una homolactama en el anillo B, ahora utilizando a la diosgenina como material de partida. Ésta se hizo reaccionar con NaNO_2 y $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ en medio ácido formándose **64** y **65**. A esta mezcla de productos se les trató con clorhidrato de hidroxilamina para obtener como único producto a la 6,23-dioxima **66**. Posteriormente, la oxima en el anillo F se hizo reaccionar con el $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ en ácido trifluoroacético generando la γ -lactona (**67**). Finalmente, la obtención de la homolactama en el anillo B se dio en dos pasos.

Primero, se eliminó el éster de la posición C-5, formando un doble enlace y después se efectuó un rearrreglo de Beckmann de la oxima en la posición C-6 (**Esquema 6**).



i) NaNO_2 , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, AcOH . ii) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, EtOH , reflujo. iii) CF_3COOH , Ac_2O , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. iv) Na_2CO_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, reflujo. v) SOCl_2 , dioxano.

Esquema 6. Síntesis para la formación de una homolactama en el anillo B.

Por lo anteriormente expuesto, la síntesis estereoselectiva de nuevos sistemas oxima y lactama con actividad biológica propicia el interés por rutas sintéticas novedosas y cortas. En particular, debido a su gran versatilidad han surgido como moléculas de estudio ingeniosas y de estudios *in-silico* de compuestos similares.

2.5.- Modelado molecular

Los métodos computacionales, se han aplicado en el estudio de la formación de complejos intermoleculares que han sido objeto de búsqueda en las últimas décadas. Una de las formas de acción del fármaco es la interacción de éste (ligando) a una zona específica de una molécula más grande (receptor), como lo es comúnmente una proteína.⁴¹ Es por lo que, en la actualidad se realizan los modelados moleculares para observar las fuerzas intermoleculares entre un ligando propuesto y una enzima relacionada con la actividad biológica. El proceso computacional de búsqueda de un ligando adecuado que sea capaz de adaptarse geométrica y espacialmente al sitio de unión de una proteína es llamado acoplamiento molecular (dado por la energía de afinidad).⁴¹

En muchos de los casos, lo que se busca en este tipo de estudios es la visualización de un paquete de moléculas con cierta relación en su estructura y en su función promisorio en el organismo y la relación que pueda existir entre las enzimas o proteínas relacionadas con el desarrollo de ciertos padecimientos. Esto se logra con la ayuda de ciertos programas como lo es, Avogadro, el cual es una plataforma diseñada para el modelado molecular, bioinformático y relacionado en sí con la ciencia de los materiales.⁴² Cuando se realizan este tipo de estudios es de importancia la optimización geométrica conformacional y la búsqueda de mínimos locales de energía de los ligandos, para ello, se emplea el programa Gaussian en su versión 09. Por su parte, el programa Auto-Dock Vina proporciona datos de energías de afinidad del complejo ligando-receptor utilizando algoritmos genéticos y mecánica molecular.⁴³

2.6.- Enzimas relacionadas con el cáncer hormonalmente dependiente

Existen diversas enzimas que se relacionan con el cáncer hormonalmente dependiente o la proliferación celular, esto debido a que, fungen como receptores de ciertos compuestos que se encuentran en la superficie celular siendo los ojos y oídos para dichas células. Este mecanismo es llamado esteroidogénesis, en el cual

los receptores involucrados actúan como interruptores que activan y desactivan una función en particular de la célula originando así a las hormonas esteroideas.⁴⁴ Algunos de los receptores más importantes o más empleadas en esta cascada de señalización son las enzimas 5α -reductasa, así como 17β -HSD (17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa), CYP19 o también llamada aromatasa y CYP17 o 17α -hidroxilasa/ $17,20$ liasa descritas a continuación.⁴⁵

2.6.1 La enzima 5α -reductasa y su relación con el cáncer hormonalmente dependiente

Las enzimas 5α -reductasa y 5β -reductasa han sido objeto de estudios por parte de cierto grupo de investigadores debido a su implicación en diversos padecimientos como el carcinoma de próstata, hiperplasia benigna prostática, calvicie, pseudohermafroditismo y disfunción hepática.⁴⁶ Como ya se ha mencionado, en específico la enzima 5α -reductasa posee dos isoenzimas las cuales se identificaron gracias a la diferenciación provocada por los compuestos 4-azaesteroidales que fueron utilizados como inhibidores en el año de 1990. Una de las diferencias más notorias de estas isoenzimas es el pH. En el tejido del hígado se encuentra a la isoenzima SR5 α 1 a un pH alcalino y en el tejido de la próstata encontramos a un pH ácido a la isoenzima SRD5 α 2. Así también, se ha reportado a SRD5 α 3 que es una tercera isoenzima encontrada en el tejido prostático dañado y se sabe que también puede convertir la testosterona en dihidrotestosterona, aunque en menor proporción.⁴⁷ A pesar de toda esta información, no existe en el banco de datos de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés), un modelo acerca de la enzima 5α -reductasa. Sin embargo, existen datos sobre el análogo 5β -reductasa el cual posee actividades biológicas relacionadas con los andrógenos, la regulación de la disponibilidad de la testosterona y con la reducción de ésta, aunque con menor afinidad de enlace (**Figura 14**). Estas diferencias se deben principalmente a que la SRD5 α es una oxidoreductasa, mientras que la SRD5 β es una aldo-ceto reductasa. La primera de ellas, reduce esteroespecíficamente al doble enlace en el C-4 de la testosterona formando a la dihidrotestosterona en una conformación en silla; por su parte, la segunda enzima favorece una configuración de bote en el producto.⁴⁶

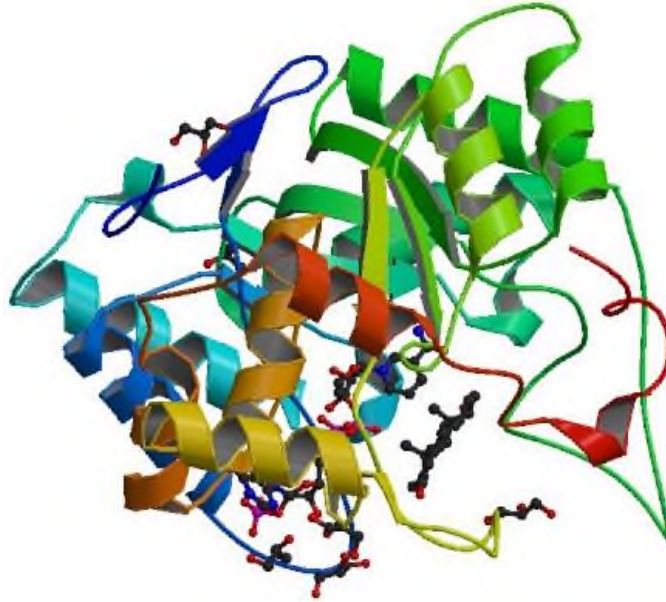


Figura 14. Estructura de la enzima 5 β -reductasa extraída del PDB con número 3BUR, teniendo como ligando al glicerol, NADP y la testosterona (TES).

2.6.2 La enzima 17 β -HSD y su relación con el cáncer hormonalmente dependiente

El estradiol, es conocido como un potente estrógeno que se le ha atribuido la estimulación del cáncer de seno y de otros padecimientos relacionados con los estrógenos. La actividad biológica de éste y otras hormonas esteroideas está regulada por ciertos niveles de enzimas pre-receptoras, incluyendo a las enzimas 17 β -HSD, siendo la 17 β -HSD tipo I el primer miembro conocido de esta familia que cataliza el último paso en la síntesis de estradiol.⁴⁸ Se han descrito para el cáncer de seno, dos principales vías enzimáticas para su formación. La primera vía, es el denominado “camino de la aromatasa” que involucra la transformación de los andrógenos a estrógenos. El segundo es el “camino de la sulfatasa”, donde el sulfato de estrona (E₁S) se convierte a estrona (E₁) y después por la acción de 17 β -HSD tipo I a estradiol (E₂).⁴⁹ Es así como la 17 β -HSD tipo I juega un rol importante en la síntesis de estrógenos que están implicados en el crecimiento y diferenciación de las glándulas mamarias. Sin embargo, también pueden estar involucrados en la formación de tumores posiblemente debido a la excesiva estimulación hormonal en el epitelio del seno.⁵⁰ La enzima de 17 β -HSD tipo I es una enzima de la familia

oxidoreductasa cuya estructura pudo ser obtenida de la base de datos de proteínas (Figura 15).



Figura 15. Estructura de la enzima 17β-HSD tipo I extraída del PDB con número 3HB5, teniendo como cofactor al NADP⁺ y como ligando al 3-[[9β,14β,16α,17α)-3,17-dihidroxiestra-1,3,5(10)-16-il]metil]benzamida (E₂B).

2.6.3 La enzima CYP19 y su relación con el cáncer hormonalmente dependiente

El citocromo P450 19A1, conocido también como la enzima aromatasa, se localiza en el retículo endoplásmico y su función primordial es la conversión de los andrógenos a estrógenos. Está compuesta por una cadena polipeptídica de 503 residuos de aminoácidos, dentro de la enzima se encuentra el sitio de unión cuya característica es ser específico para andrógenos y contar con zonas hidrófobas y polares (Figura 16). Para la conversión de andrógenos a estrógenos se requieren tres pasos, en cada paso la enzima necesita de un mol de O₂, un mol de NADPH y del citocromo reductasa específica para el NADPH. Esta reacción convierte la androstenediona, testosterona y 16α-hidroxitestosterona a estrona, 17β-estradiol y 17β, 16α-estradiol, respectivamente.⁵¹ En el tejido de cáncer de seno, se ha encontrado una elevada concentración de estradiol indicando con ello que la sobreproducción de esta hormona está ligada al desarrollo del cáncer. Dado que, la enzima CYP19 es la principal enzima encargada de la producción de este tipo de hormonas en el tejido periférico, hígado, tejido adiposo, músculo y sobre todo en el

tejido canceroso de seno; esta enzima se relaciona directamente con la regulación en la producción del cáncer hormonalmente dependiente.⁵²

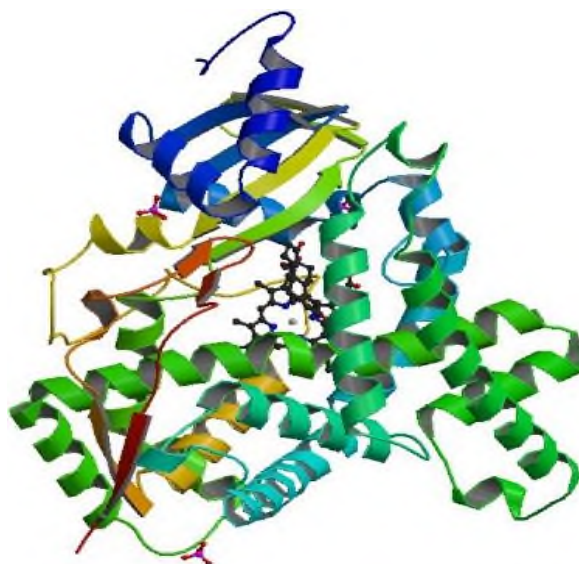


Figura 16. Estructura de la enzima aromatasa extraída del PDB con número 3S79, teniendo como cofactor al grupo hemo y un grupo fosfato y como ligando a la androstenediona (ASD).

2.6.4 La enzima CYP17 y su relación con el cáncer hormonalmente dependiente

El citocromo P450 17A1, es una enzima de la familia del citocromo P450 que cataliza la biosíntesis de andrógenos en humanos.⁵³ Esta enzima, suele actuar específicamente sobre la pregnenolona y progesterona añadiendo un grupo hidroxilo en el C-17 del anillo D o actúa sobre la 17-hidroxi pregnenolona y la 17-hidroxi progesterona para dividir la cadena lateral del anillo esteroidal (actividad liasa). Dicha proteína se encuentra en el retículo endoplásmico, siendo pieza clave en la producción de progestinas, mineralocorticoides, glucocorticoides, andrógenos, y estrógenos (**Figura 17**).⁵⁴ En concreto, en células de cáncer de próstata se ha encontrado una excesiva proliferación de esteroides androgénicos, siendo una alternativa la castración química o quirúrgica que reducen los niveles de testosterona en suero (<50 ng/dL), a pesar de ello, se ha constatado que a partir de los receptores de andrógenos (AR) se puede llegar a la formación de andrógenos intracrinos y favorecer aún más el crecimiento del tumor. Es por lo que, la inhibición de la enzima CYP17A1 es una nueva estrategia para prevenir la síntesis de

andrógenos y tratar el cáncer de próstata resistente a la castración con metástasis letal.⁵⁵

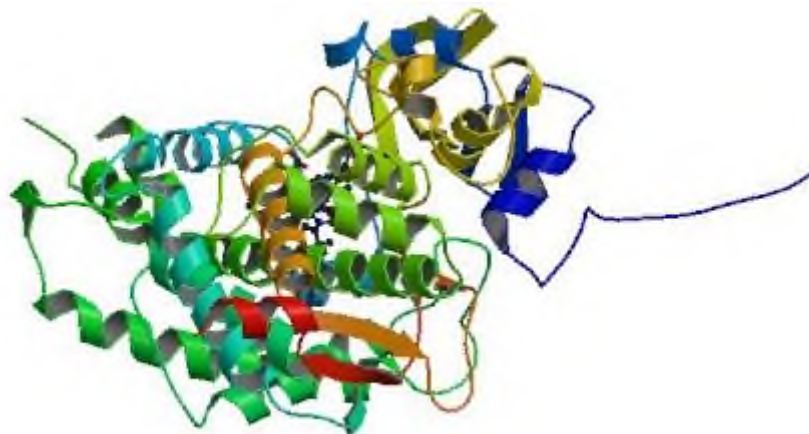


Figura 17. Estructura de la enzima CYP17 extraída del PDB con número 3SWZ, teniendo un grupo hemo y como ligando a la molécula (3 α , 8 α)-17-(1H-benzimidazol-1-il) androsta-5,16-dien-3-ol (TOK).

3. JUSTIFICACIÓN

En 2018 en México se llegó a 190,667 nuevos casos de algún tipo de cáncer, siendo de mayor prevalencia el cáncer de mama en mujeres y el de próstata en hombres. En específico el cáncer hormonalmente dependiente afecta a un número significativo de la población afectando órganos como el endometrio, las mamas y la próstata. Una de las nuevas terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer que ha emergido incluye el uso de moléculas de bajo peso molecular, por ejemplo, inhibidores de las enzimas que catalizan la biosíntesis de moléculas claves relacionadas con la proliferación de células malignas o compuestos que inducen la apoptosis en líneas celulares cancerígenas, esto soportado también a través de estudios de acoplamiento molecular. Los esteroides han denotado relevancia en ambas actividades y es por lo que surge la necesidad de buscar compuestos novedosos esteroidales para así poder ofrecer nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer.



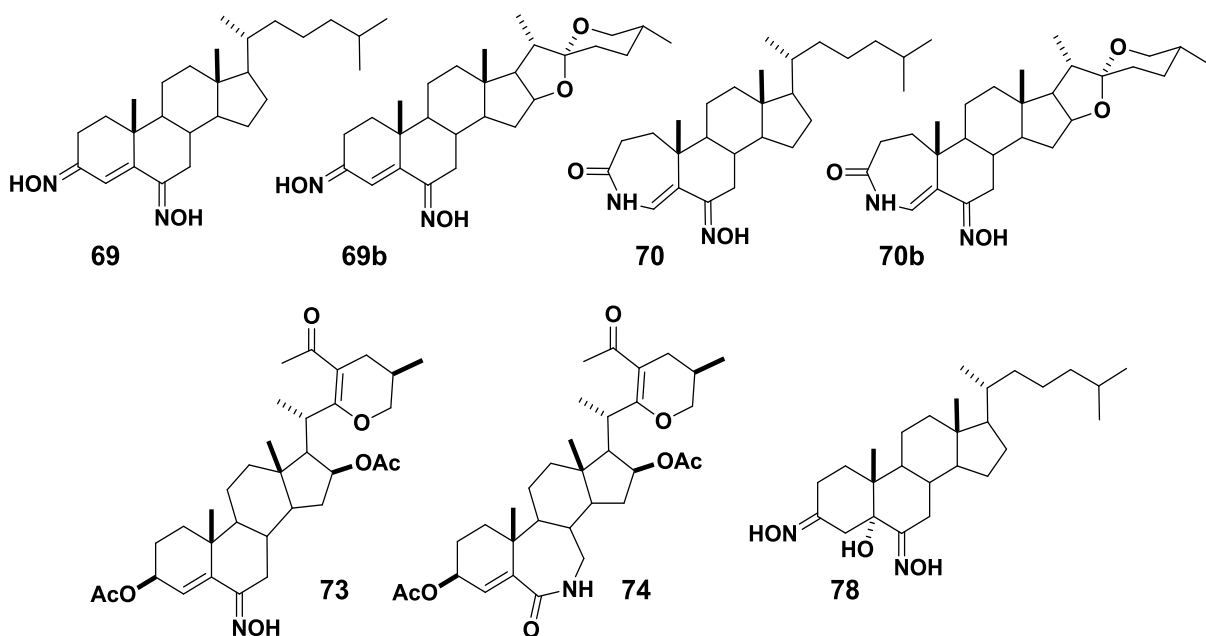
4. HIPÓTESIS

Derivados esteroidales conteniendo un grupo oxima y/o lactama en los anillos A o B son potenciales agentes citotóxicos frente a la línea de cáncer de seno MCF-7 y potenciales inhibidores enzimáticos.

5. OBJETIVOS

5.1.- Objetivo general

- Sintetizar compuestos esteroidales con grupos oxima y/o lactama en los anillos A/B (**69**, **69b**, **70**, **70b**, **73**, **74** y **78**), evaluar su actividad citotóxica frente a la línea cancerígena de mama MCF-7 y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y analizar su posible interacción con blancos moleculares *in silico* (5β -reductasa, 17β -HSD, CYP19A1 y CYP17A1).



5.2.- Objetivos específicos

- Desarrollar u optimizar metodologías para la síntesis de oximas y lactamas esteroidales partiendo de colesterol y diosgenina.
- Proponer los mecanismos de reacción que justifiquen la formación de intermediarios y productos finales.
- Caracterizar los intermediarios y productos finales mediante distintos métodos espectroscópicos y físicos.
- Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de los intermediarios y productos de interés frente a la línea celular MCF-7 (seno) y CMSP.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular y estudios *in silico* de una variedad de compuestos azaesteroidales para evaluar su potencial biológico como inhibidores de diversas enzimas (5β -reductasa, 17β -HSD, CYP19A1 y CYP17A1) y su potencial para ser considerados candidatos a fármacos.

6. METODOLOGÍA

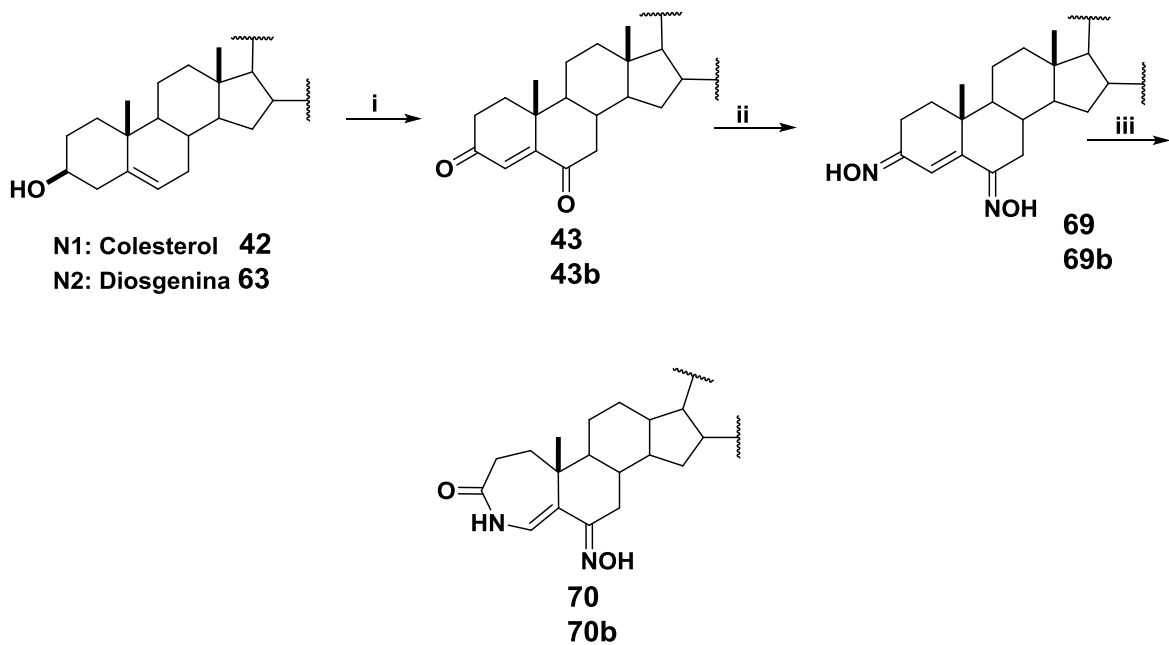
La metodología consistió en tres etapas: síntesis y caracterización de intermediarios y productos, evaluación biológica *in vitro* de los compuestos obtenidos y un estudio *in silico* de una librería de compuestos nitrogenados que de acuerdo con la bibliografía podrían ser potenciales inhibidores de enzimas relacionadas con el cáncer hormono-dependiente.

6.1.- Reactivos y disolventes

Las materias primas y reactivos utilizados son marca Sigma Aldrich. Mientras que, los disolventes empleados son grado técnico y grado analítico.

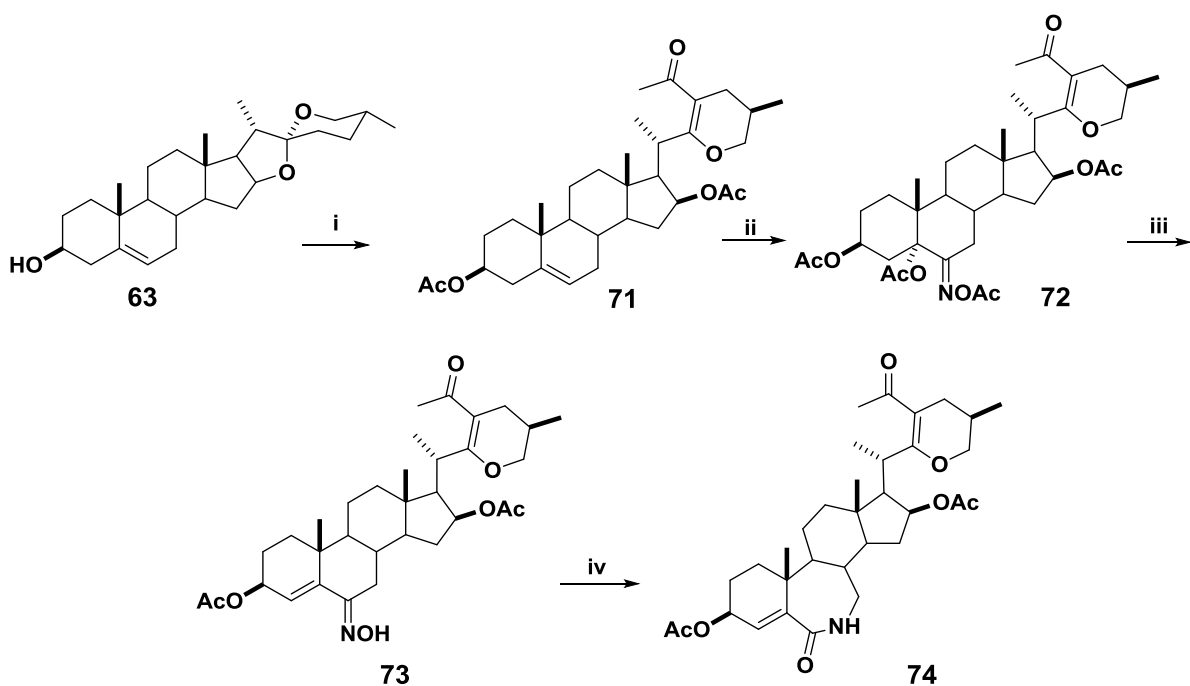
6.2.- Síntesis y caracterización de compuestos oxima y lactama esteroideas

Por lo mencionado en los antecedentes, el grupo oxima y el grupo lactama poseen valiosas y diversas actividades, entre ellas como antiproliferativos. En el presente trabajo se planteó la síntesis de 4 oximas esteroideas (**69**, **69b**, **73** y **78**) y 3 lactamas (**70**, **70b** y **74**). Las rutas de síntesis para su formación se describen en los **Esquemas 7, 8 y 9**.



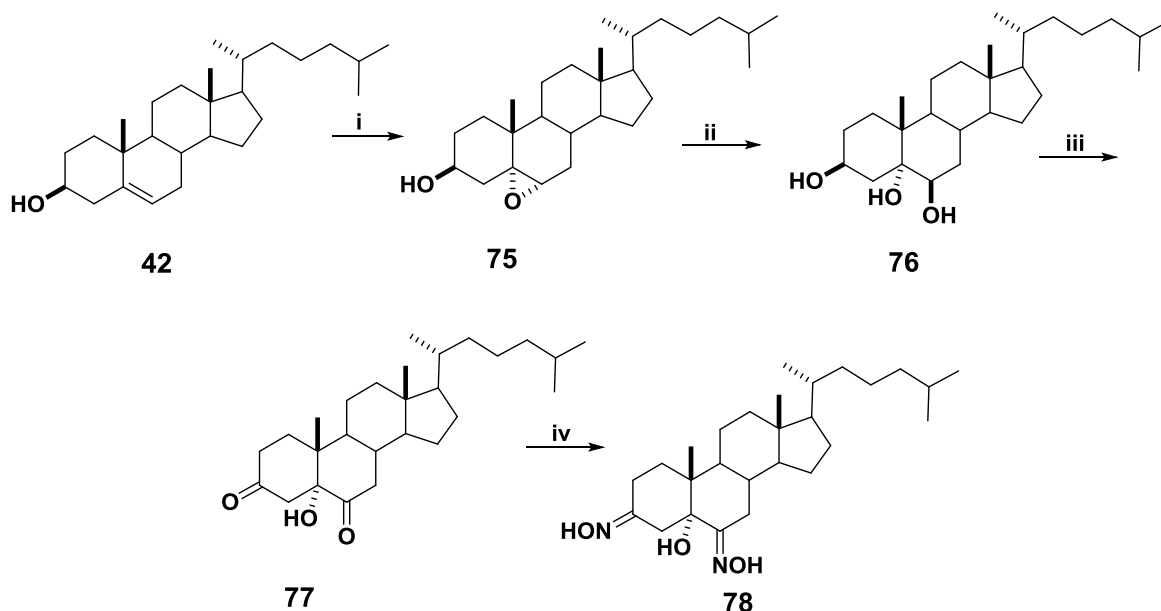
i) Reactivo de Jones, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{CH}_3)_2\text{CO}$. ii) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOAc , EtOH . iii) SOCl_2 , dioxano.

Esquema 7. Metodología de síntesis para la formación del compuesto 6-hidroxiimino-A-homolactama derivada de colesterol y diosgenina.



i) $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$, Ac_2O . ii) NaNO_2 , $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$, AcOH , Ac_2O . iii) Na_2CO_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. iv) SOCl_2 , dioxano.

Esquema 8. Metodología para la síntesis de B-homolactama derivada de diosgenina.



i) *m*CPBA, CH₂Cl₂. ii) H₂SO₄, H₂O, (CH₃)₂CO. iii) PCC, silica. iv) NH₂OH·HCl, NaOAc, EtOH.

Esquema 9. Metodología para la síntesis del 5β-hidroxi-3,6-hidroxiimino derivada del colesterol.

6.2.1.- Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se obtuvieron en un espectrómetro VARIAN MR (400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C), Bruker Ascend 500 NMR Spectrometer (500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C) y Spinsolve, Magritek Spectrometer 80 NMR (80 MHz para ¹H, 20 MHz para ¹³C). Se empleó cloroformo deuterado (CDCl₃), dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) y acetona deuterada (Acetona-*d*₆) como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se realizaron experimentos de ¹H, ¹³C, DEPT y experimentos bidimensionales (COSY, HMBC y HSQC) para la elucidación estructural completa. Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (*J*) en Hertz y la multiplicidad se indicó de la siguiente manera: s (señal simple), d (señal doble), t (señal triple), c (señal cuádruple), m (señal múltiple), dd (señal doble de dobles) y ddd (señal doble de doble de dobles).

6.2.2.- Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los intermediarios y productos se analizaron por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier e interferómetro Dynascan marca Perkin Elmer Spectrum 100. Expresando los datos en número de onda ν (cm^{-1}) y realizando 16 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} dentro de un rango de 4000 a 515 cm^{-1} .

6.2.3.- Espectrometría de masas (EM)

Los intermediarios y productos se analizaron en un cromatógrafo de líquidos (Acquity I-Class, Waters) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución equipado con filtro de masas de cuadrupolo, celda de fragmentación molecular por colisiones CID, sistema de movilidad iónica y analizador de masas de tiempo de vuelo (Synapt G2-Si, Waters).

6.3.- Evaluación biológica de los compuestos oxima y lactama

Los ensayos se realizaron en el área de cultivo celular del laboratorio LINAN en la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec. Para este ensayo se evaluaron los siguientes compuestos: **69**, **69b**, **70**, **70b**, **71**, **71***, **72**, **73**, **74** y **78**, mediante la técnica de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), frente a dos tipos de líneas celulares (MCF-7 y CMSP). La línea celular de cáncer MCF-7, es una de tipo epitelial con propiedades adherentes (apropiada para el cultivo celular); extraída del tejido canceroso de mama derivado de la metástasis y la cual expresa receptores estrogénicos citoplasmáticos, por tanto, es una línea dependiente de hormonas. En tanto, la línea de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), son células con un único núcleo que se localizan en el plasma y están compuestas por monocitos y linfocitos (T y B). La clasificación para este ensayo, se basó en la actividad citotóxica (expresada como CI_{50}) del peróxido de hidrógeno, el cual se manejó como control positivo. El peróxido de hidrógeno es un agente radicalario derivado del oxígeno (oxirradicales), implicado en diversas enfermedades, siendo capaz de dañar, de forma irreversible o reversible diversas biomoléculas importantes para las células del cuerpo humano.⁵⁶

6.3.1.- Cultivo y mantenimiento de líneas celulares

El cultivo de células MCF-7 se mantuvo en criopreservación suspendidas en el medio DMEM suplementado con 5 % (v/v) de FBS, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina G y 0.1 mg/mL de estreptomina. Los frascos se incubaron a 37 °C, humedad y 5 % de CO₂, tal y como lo expresa la ATCC. Las CMSP, fueron obtenidas directamente de donantes mediante una muestra sanguínea y se llevó a cabo en frascos estériles donde se añadió medio de cultivo RPMI-1640 que tiene como indicador rojo fenol para su mantenimiento.

6.3.2.- Siembra de las líneas celulares

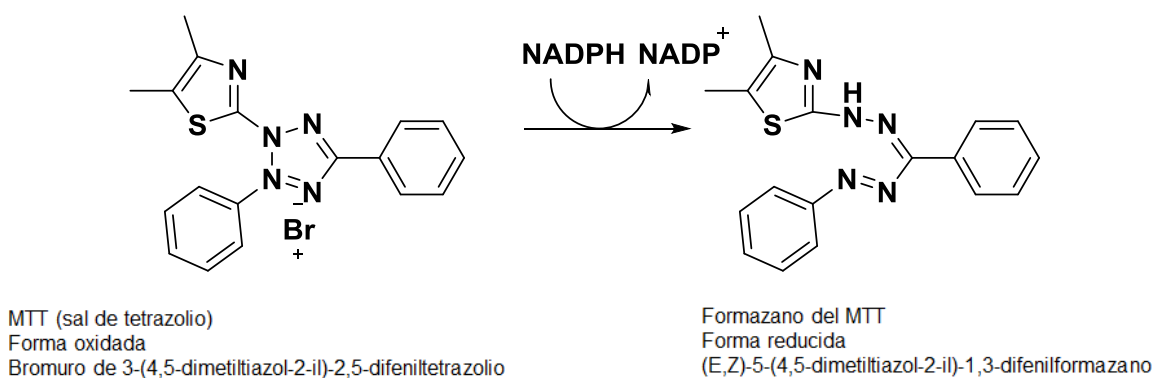
La siembra de las células se llevó a cabo a través de un proceso de tripsinización que consistió en retirar el medio de cultivo de los pocillos, realizar dos lavados con PBS (2-3 mL por lavado). Posteriormente, se adicionaron de 0.5-1 mL de tripsina para el desprendimiento celular. Se incubó por 1 min a 37 °C y después, se añadieron de 5-10 mL de medio DMEM fresco. Las células fueron transferidas a un tubo Falcón®, se aforo con medio DMEM hasta un volumen final de 5 mL, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 mL de medio DMEM. Finalmente, se cuantificaron las células en una disolución 1:20 y sembraron en una placa de 96 pocillos colocando un aproximado de 2×10^4 a 5×10^4 células incluyendo un control, control positivo y un control negativo. Para las CMSP, se procedió a adicionar 5 mL de Histopaque® en un tubo Falcón® de 15 mL y se vertieron 5 mL de muestra sanguínea. Posteriormente, se centrifugó a 400 rpm durante 20 min (se repitió este proceso). Se recolectó la capa intermedia formada con ayuda de una pro-pipeta y se adicionó a un segundo tubo Falcón®. Una vez depositado ahí, se añadió PBS hasta alcanzar un volumen de 11 mL y se centrifugó a 100 rpm durante 20 min. Se decantó el sobrenadante, se adicionó y homogeneizó 1 mL en medio RPMI. Luego, con una micropipeta se tomaron 50 µL del paquete celular y se colocaron en un tubo de Eppendorf® junto con 450 µL de medio RPMI. De esa solución, se tomaron 20 µL y se adicionaron a un segundo tubo Eppendorf® más 20 µL de azul de tripan. Se cuantificaron y sembraron las células en una placa de 96 pocillos colocando un aproximado de 1.5×10^5 a 2×10^5 .

6.3.2.1.- Adición de productos

Los compuestos esteroidales se disolvieron en DMSO hasta conseguir la concentración inicial deseada. Se procedió a la preparación de las diluciones a evaluar. Para ello, se utilizaron placas de dilución de 96 pocillos donde se colocaron 100 μ L de la disolución de los compuestos a probar más 100 μ L de medio (DMEM para las células MCF-7 y RPMI 1640 para las CMSP); obteniendo así un volumen final de 200 μ L. Finalmente, se prepararon diluciones decimales.

6.3.2.2.- Método de MTT

El método de tinción con MTT es una forma de evaluar la viabilidad celular, la técnica consiste en tener una sal de tetrazolio (forma oxidada), la cual sufrirá una reacción de óxido-reducción por parte de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales. Por tanto, la sal de tetrazolio se protona obteniendo su forma reducida que es conocida como formazano del MTT (**Esquema 10**). Así, la cantidad de formazano obtenido de la actividad metabólica de las células será directamente proporcional a la viabilidad celular.⁵⁷ En los ensayos realizados para este trabajo, el reactivo de MTT se adicionó (20 μ L) posterior a las 48 h de incubación. Una vez adicionado el reactivo, éste se incubó por un periodo de 4 h (MCF-7) y de 6-8 h (CMSP), se retiró el medio, se adicionó DMSO (200 μ L) y se realizó la lectura a 595 nm.



Esquema 10. Reacción de óxido-reducción del compuesto MTT.

6.4.- Análisis computacional enzima-ligando

6.4.1.- Estructuras en 3D


Las 4 enzimas (5β -reductasa, 17β -HSD, CYP19 y CYP17) fueron obtenidas del RCSB Protein Data Bank a través del programa PyMOL Molecular Graphics System (con los códigos PDB: 3BUR, 3HB5, 3S79, 3SWZ). Se guardó en formato PDB tanto la enzima con el ligando, como la enzima y el ligando por separado. Posteriormente, mediante comandos de Python se modificó, aplicando campos de fuerzas y un pH 7.0, el archivo de las enzimas y los ligandos a PDBQT (formato empleado en Autodock-vina).

6.4.2.- Optimización de la geometría y simulación mediante el programa Avogadro

Las moléculas propuestas en este trabajo (ligandos) fueron generadas en 3D en el programa Avogadro. Posteriormente, utilizando un campo de fuerza de MMFF94 se optimizó geoméricamente, ajustando ángulos y distancias de enlace, para a continuación guardar estos datos con la extensión de Gaussian con un nivel de teoría de B3LYP teniendo como base 6-31G(d) y así finalmente ser enviados a calcular con el programa Gaussian versión 9 G09 en el formato XYZ de coordenadas cartesianas.

6.4.3.- Validación y Acoplamiento

La validación y acoplamiento de la proteína con sus respectivos ligandos se realizó con el programa AutoDock Vina, el cual es un software empleado en el acoplamiento molecular haciendo uso de configuraciones de computadora multinúcleo/multi-CPU (24 procesadores). La implementación de este programa consiste en un método Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) para la optimización local, procedimiento cuasi-newtoniano. El BFGS utiliza valores de puntuación y de gradiente, teniendo como argumentos la posición y orientación del ligando, así como los valores de torsión de los enlaces libres en el ligando y los enlaces flexibles de los residuos de aminoácidos en el acoplamiento.⁴³ La validación se realizó



obteniendo las interacciones más promisorias entre el ligando cristalizado y la enzima para así obtener las limitaciones de la caja del sitio de acción. Los tamaños de caja utilizados fueron: 10, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 y el número de modos empleados fueron: 10, 100, 500 y 1000 como máximo valor. La validación era aceptable en aquellos que tuvieran un valor de RMSD menor o igual a 2, así como energías de afinidad negativas. Una vez validadas las enzimas con su ligando cristalizado, se tomaron los valores obtenidos de la validación (número de caja, número de modos y coordenadas XYZ). Se ejecutó el acoplamiento molecular, mediante el programa AutoDock Vina y comandos Python de los ligandos propuestos y previamente optimizados para este trabajo.

6.4.4.- Visualización de la afinidad ligando-receptor


Se descargaron los acoplamientos en formato PDB y con ayuda del programa PyMOL se convirtieron a formato PDBQT (formato requerido para la visualización). Dicha visualización, se llevó a cabo mediante el programa BIOVIA/Discovery Studio 2017R2. Este programa, recrea un análisis de la afinidad que existe entre un ligando con una proteína dando información acerca de las interacciones permitidas y no permitidas. Para este caso particular, solo se tomaron en cuenta las interacciones de los ligandos con los aminoácidos a una distancia no mayor a 5 Å.

6.4.5.- Información de reglas de Lipinski, toxicidad y actividad.

Existen muchas herramientas en línea y programas fuera de línea disponibles que nos ayuda en la predicción de este comportamiento en los candidatos a fármacos. En este caso, se emplearon los programas de molinspiration, admetSAR, y PASS online para ello.

6.4.5.1.- Molinspiration

Molinspiration ofrece una amplia gama de herramientas en un mismo programa para la manipulación y procesamiento de moléculas, incluidas SMILES y SDfile, normalización de moléculas, generación de tautómeros, fragmentación de moléculas, cálculo de varias propiedades moleculares necesarias en QSAR,



modelado molecular y diseño de fármacos con una representación de moléculas de alta calidad. Las herramientas de bases de datos moleculares soportan una subestructura con base a la propuesta y realizan búsquedas de similitud. Los datos obtenidos de las moléculas propuestas en este programa, son los relacionados con las reglas de Lipinski como lo son el clogP (cálculo del coeficiente de partición octanol/agua), TPSA (área polar superficial), natoms (número de átomos totales), MW (peso molecular), nON (número de puentes aceptores de hidrógeno), nOHNH (número de puentes donadores de hidrógeno), nviolaciones (número de violaciones a la regla de Lipinski), nrotb (número de enlaces rotables) y vol (volumen del compuesto o molécula).

6.4.5.2.- admetSAR

El programa de admetSAR es una herramienta que proporciona datos acerca de moléculas o compuestos químicos asociados con perfiles conocidos de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad. Además, admetSAR puede llegar a predecir tantos compuestos como sea posible debido al desarmado de la misma mediante una herramienta de quimioinformática, integrando modelos predictivos QSAR de alta calidad. Una vez obtenidos los SMILES de cada compuesto mediante el programa de molinspiration se insertaron en admetSAR y se establecieron los datos más relevantes para cada uno de los compuestos nitrogenados.

6.4.5.3.- PASS online

Ahora bien, para conocer las posibles actividades y porcentajes que puedan tener ciertas moléculas y en específico los compuestos nitrogenados propuestos se optó por PASS online; el cual es un programa que predice más de 4000 tipos de actividades biológicas, incluidos los efectos farmacológicos, los mecanismos de acción, los efectos tóxicos y adversos, la interacción con enzimas y transportadores metabólicos, la influencia en la expresión génica, etc. Del mismo modo que con el programa de admetSAR, se insertó el SMILE obtenido del programa de molinspiration y se eligieron las actividades más promisorias para las moléculas propuestas.

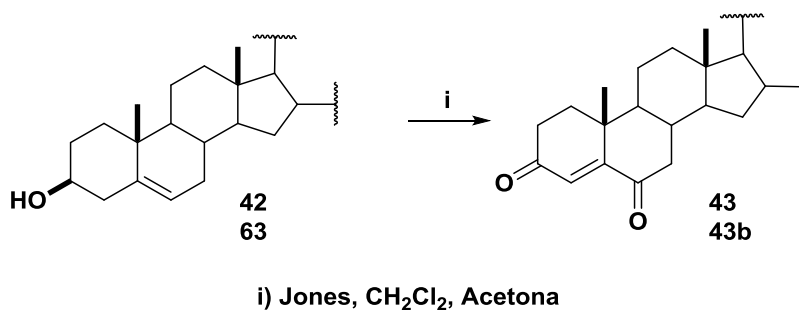
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1.- Síntesis química y análisis estructural de los compuestos azaesteroidales

Los intermediarios y productos de reacción purificados se elucidaron mediante RMN de ^1H , ^{13}C y experimentos bidimensionales. Así también, se realizó el análisis mediante FT-IR y EM corroborando las estructuras finales.

7.1.1.- Análisis estructural de productos e intermediarios de reacción para la obtención de las moléculas A-homolactama-6-hidroxiimino (Esquema 7)

La formación de la lactama en el anillo A en los núcleos de colesterol y diosgenina conllevó como primer paso la formación de los derivados 3,6-dicetónicos y posteriormente la obtención de sus respectivas oximas. Para ello, existen diferentes metodologías reportadas, destacando el uso de compuestos con cromo como es el caso del PCC. Sin embargo, con este reactivo los tiempos de reacción son muy largos, entre 26-28 h.^{14,58} Así también, se describe el uso del reactivo de Jones, el cual oxida en tiempos más cortos los carbonos C-3 y C-6. No obstante, la reacción no es selectiva hacia la formación de la 3,6-dicetona.⁵⁹ En 2016, Sánchez y colaboradores obtuvieron el derivado 3,6-dicetónico a partir de diosgenina en un 85% de rendimiento controlando la temperatura entre -10 a 10 °C en presencia del reactivo de Jones.⁶⁰ Por lo anterior, en este trabajo se empleó el reactivo de Jones como agente oxidante y se variaron los equivalentes molares de CrO_3 manteniendo la reacción a temperatura ambiente (**Esquema 11**).



Esquema 11. Reacción de oxidación del colesterol **42** y diosgenina **63**.

En la **Tabla 1** se muestran las condiciones de reacción del colesterol y diosgenina en donde se observa que al aumentar los equivalentes de CrO₃ y mantener la reacción a temperatura ambiente, la obtención de los compuestos 3,6-dicetónicos mejoró notablemente. En el caso del derivado dicetónico del colesterol, el rendimiento es similar al reportado por Thi Ha y colaboradores (80%).⁵⁸ Mientras que, con diosgenina se obtuvo un mejor rendimiento que el descrito por Sánchez y colaboradores (85%).⁶⁰ La asignación de las señales de los intermediarios 3,6-dicetónicos **43** y **43b** se llevó a cabo mediante experimentos de ¹H y ¹³C y mediante la comparación con los datos descritos en la bibliografía.⁶¹ En el espectro de RMN de ¹H de **43**, se observó la señal en 6.13 ppm asignada al protón vinílico de C-4 y las señales de ¹³C en: 202.4 ppm (C-6), 199.5 ppm (C-3), 161.0 (C-5) y 125.4 (C-4). En el caso del producto de oxidación de la diosgenina (**43b**), sobresalieron las señales de ¹H en 6.16 ppm asignado a H-4 y de ¹³C en: 201.9 ppm (C-6), 199.4 ppm (C-3), 160.6 ppm (C-5), 125.6 ppm (C-4) y 109.3 ppm (C-22).

Tabla 1. Condiciones de reacción en el proceso de oxidación del colesterol y diosgenina.

Materia prima	Masa (gr)	CrO ₃ (equivalentes)	Tiempo (min)	Rendimiento (%)
42	0.5	1	30	20
	0.5	3	30	56
	0.5	4	30	82
63	0.5	1	30	43
	0.5	3	30	64
	0.5	4	30	98.3

Posteriormente, los compuestos dicetónicos **43** y **43b** fueron disueltos en EtOH al 97% y tratados con 3 equivalentes de NH₂OH·HCl y NaOAc a reflujo.¹⁴ En cada una de las reacciones se favoreció la condensación del grupo carbonilo por el uso de un exceso de clorhidrato obteniendo así a la dioxima **69** con un 86% de rendimiento y a la dioxima **69b** con un 90% de rendimiento.

En los espectros de RMN de ^1H , se observó la presencia de una señal simple que integra para un protón asignada a H-4 con un desplazamiento en 6.3 ppm para el caso de **69** y en 6.5 ppm para **69b**, confirmando así la presencia de un doble enlace. Además, fue posible determinar la estereoquímica de las oximas en función de los desplazamientos de los protones vecinos H-2 y H-7. Según la literatura, cuando la estereoquímica de la oxima en C-6 es *E*, el protón de C-7 se desplaza ~ 3 ppm.⁵⁸ Mientras que, en el isómero *Z*, este mismo protón se observa en ~ 2.4 ppm.²³ De manera similar, cuando la oxima en la posición 3 es *E*, un protón diasterotópico de C-2 se ve afectado desplazándose arriba de 3 ppm. Con base en los desplazamientos observados se determinó que la configuración de las oximas es *E,E*. (Figura 18).

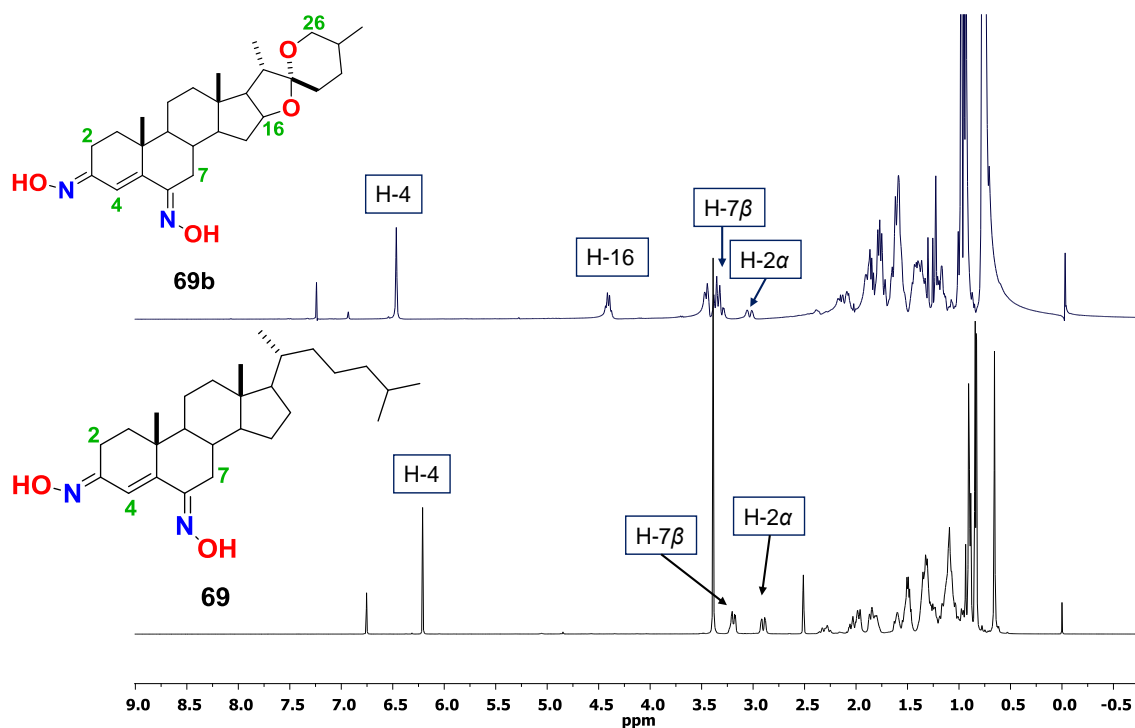


Figura 18. Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$) de los compuestos **69** y **69b**.

El espectro de ^{13}C de **69** y **69b** fue fundamental para corroborar la presencia de los grupos oxima. Las señales asignadas a C-3 y C-6 se observaron en 154.4 ppm y 153.8 ppm para el derivado del colesterol y en 156.6 ppm y 156.2 ppm, en el caso del derivado de diosgenina. En la molécula de **69b**, además se distinguió la señal en 109.3 ppm atribuida al C-22 y en 80.6 ppm al carbono base de oxígeno C-16 (Figura 19).

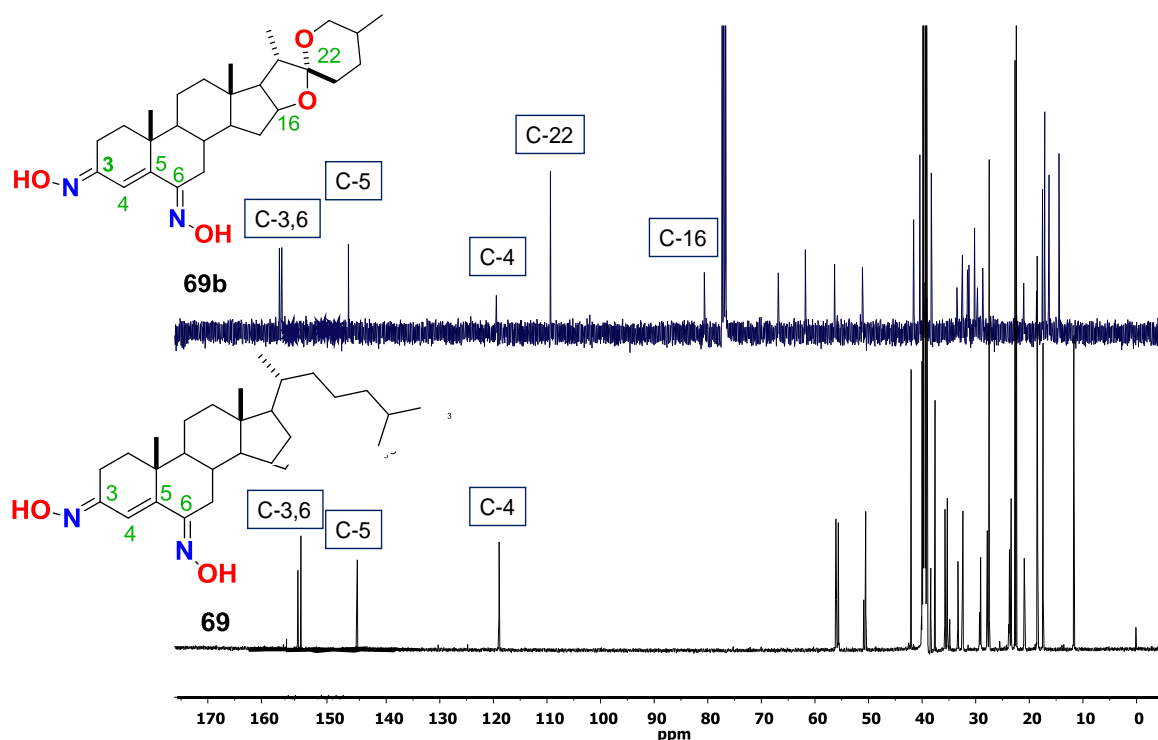


Figura 19. Espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$) de los compuestos **69** y **69b**.

En el espectro de masas mediante la técnica ESI-MS-(+) se observó un pico (ion molecular) con una relación m/z de 429.3481 $[\text{M}+\text{H}]^+$; la cual corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_2$, con un error de masa de 1.2 ppm. En el caso de **69b**, el espectro de masas mostró un pico (ion molecular) con una relación m/z de 457.3070 $[\text{M}+\text{H}]^+$, cuya fórmula molecular es $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$ y un error de masa de 0.9 ppm (Figura 20).

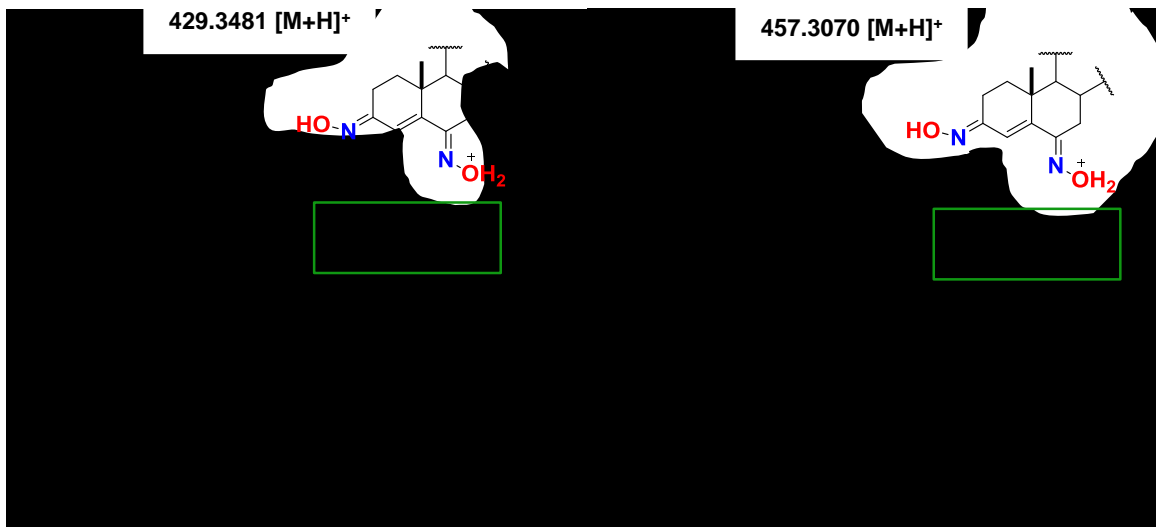
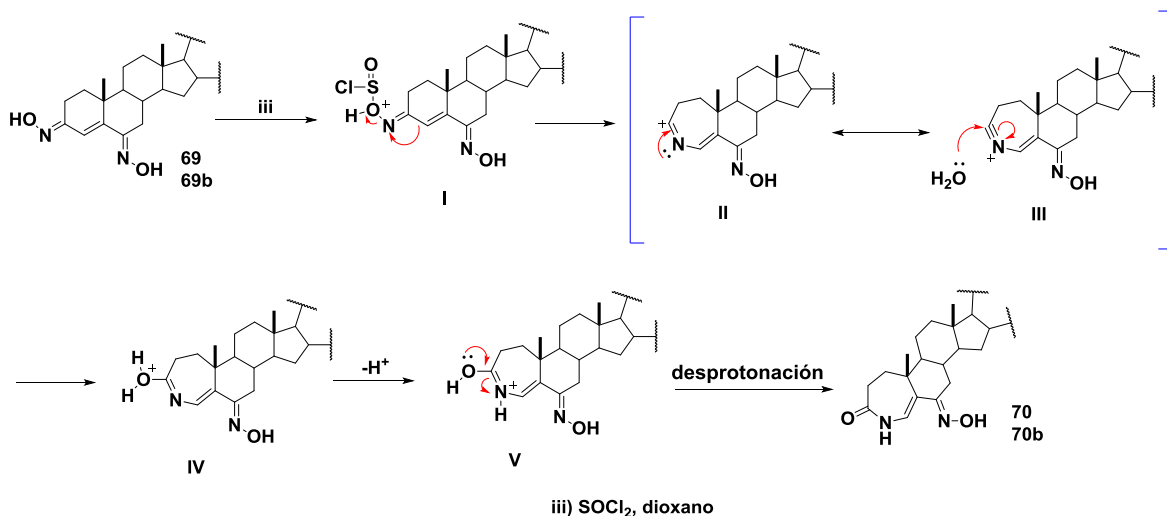


Figura 20. Espectros ESI-MS-(+) de a) compuesto **69** y b) compuesto **69b**.

Las oximas son grupos funcionales bien conocidos por sus propiedades nucleofílicas, proporcionadas por su característico enlace de baja energía N-O, dando a estos compuestos la habilidad de rearrreglarse. En específico, el rearrreglo de Beckman es uno de los métodos más empleados para la conversión de cetoximas a amidas. Para ello, es necesario contar con un buen grupo saliente y esto se logra por protonación, eterificación o esterificación del OH. Normalmente, se pueden emplear cierto tipo de ácidos próticos o de Lewis como el SOCl_2 . Por tanto, en este último paso de reacción se llevó a cabo el rearrreglo de Beckmann de los compuestos **69** y **69b** utilizando SOCl_2 en agitación constante y temperatura ambiente obteniendo a **70** (60% de rendimiento) y **70b** (45% de rendimiento). El mecanismo para explicar la transformación de **69** y **69b** a **70** y **70b**, se muestra en el **Esquema 12**. Como primer paso del mecanismo ocurre un ataque nucleofílico del OH de la oxima al azufre del SOCl_2 . Subsecuentemente, migra el grupo R *anti* al grupo saliente, formándose el intermediario **II**, el cual está estabilizado por un efecto de resonancia (híbrido **III**). Posteriormente, el átomo de oxígeno del agua realiza un ataque nucleofílico al C-3, generando el intermediario **IV**. Mediante una transferencia de protón se forma el intermediario **V**, que se caracteriza por contener un nitrógeno con carga positiva. Para estabilizar dicha carga el nitrógeno recupera

el par electrónico enlazante que tiene con el carbono adyacente. Por último, una transferencia de protón genera la amida en el anillo A.



Esquema 12. Reacción de Beckmann de los compuestos **69** y **69b**.

En los espectros de RMN de ^1H , fue posible observar las señales atribuidas al protón del NH del grupo lactama con un desplazamiento de 8.93 ppm para **70** y de 7.72 ppm para **70b**. En la literatura se expresa que, los protones del grupo amida se desplazan hacia campos bajos entre 5-9 ppm. Mientras que, los protones de las oximas se desplazan entre 9-12 ppm. No obstante, debido a la facilidad de intercambiarse con el agua del medio; estos valores pueden variar significativamente e incluso no aparecer como es en el caso de **70**. A diferencia de éste, la señal ancha que integra para un solo protón y cuyo desplazamiento es de 9.26 ppm se asignó al protón de la oxima de **70b** ya que en los experimentos HSCQ y HMBC no mostró correlación alguna. Así también, se observó el protón vinílico H-4 como una señal simple (**70**: 5.76 ppm; **70b**: 5.93 ppm) y el protón alfa a un grupo oxima H-7 como una señal doble de dobles (**70**: 3.00 ppm; **70b**: 2.92 ppm) en ambas moléculas (**Figura 21**).

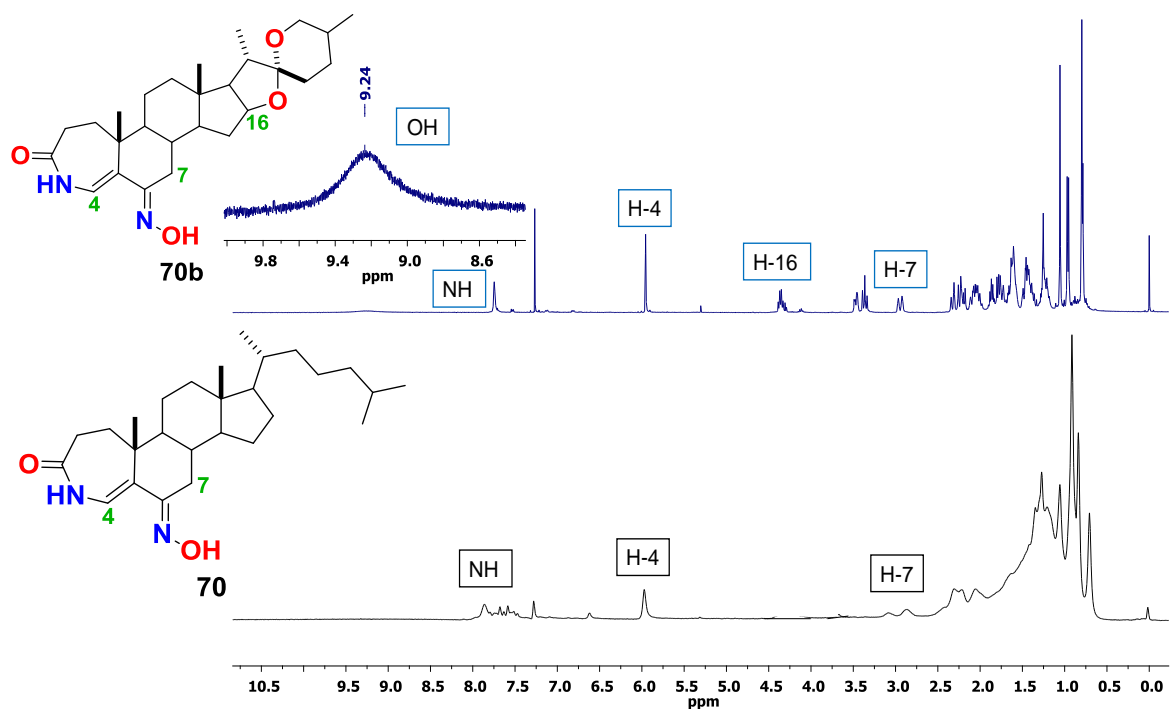


Figura 21. Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 y $\text{DMSO-}d_6$) de los compuestos **70** y **70b**.

En los espectros de RMN de ^{13}C de los compuestos **70** y **70b**, fue posible confirmar los principales grupos funcionales que distinguen a los productos de interés. En ambas estructuras se observó la señal característica del carbonilo de la lactama entre 173-175 ppm. Adicionalmente, se determinó que la oxima en C-6 no reaccionó debido a la presencia de la señal de 154.2 ppm, para **70** y 155.9 ppm, para **70b**. En ambas moléculas, el doble enlace queda intacto, esto debido a los picos en 152.9 ppm (C-5) / 119.1 ppm (C-4) y en 149.6 ppm (C-5) / 120.2 ppm (C-4) de **70** y **70b**, respectivamente (**Figura 22**).

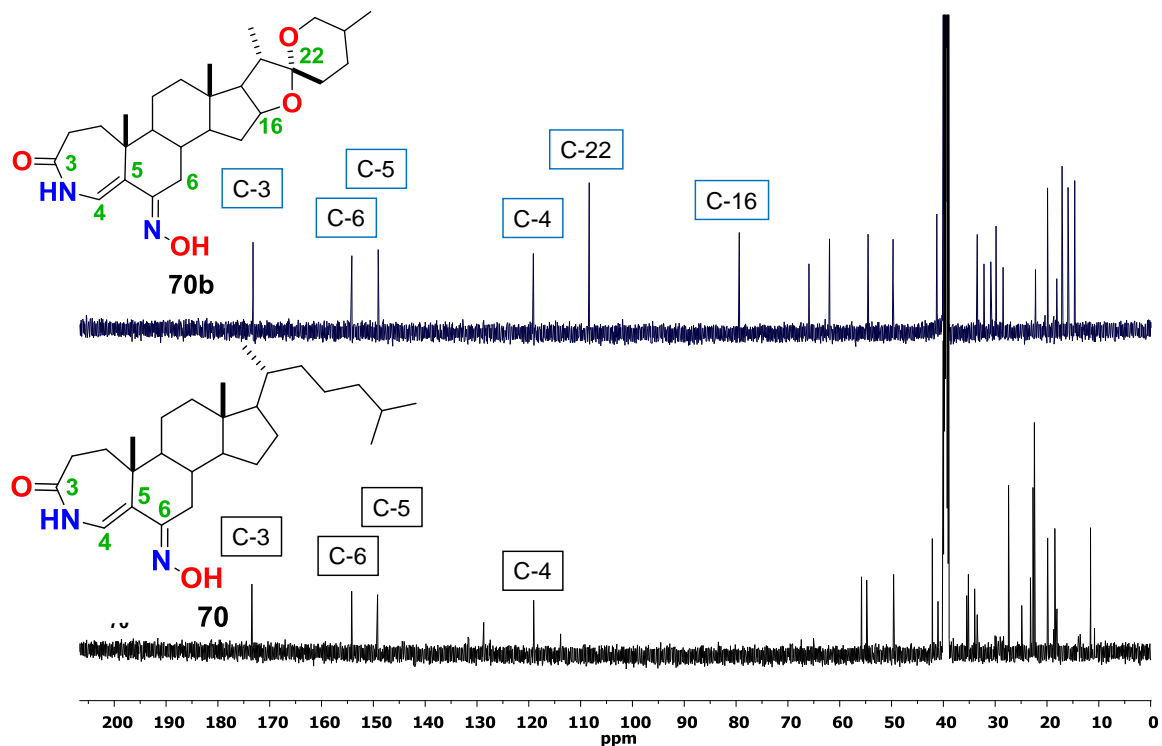


Figura 22. Espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$) de los compuestos **70** y **70b**.

En los espectros de FT-IR, se muestran las bandas de vibración más significativas de las moléculas **70** y **70b**. Con base a la literatura, la banda de tensión del N-H se suele observar entre $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ y la banda debidas a la tensión del enlace O-H se localizan por arriba de 3000 cm^{-1} . En el caso particular de **70** y **70b**, las bandas debido a la tensión de estos enlaces se observaron traslapadas en $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$. Otras vibraciones importantes son debidas al carbonilo de lactama y al enlace C=N del grupo oxima que en el espectro se observaron en 1704 cm^{-1} y 1633 cm^{-1} para **70** y en 1667 cm^{-1} y 1629 cm^{-1} para **70b** (Figura 23).

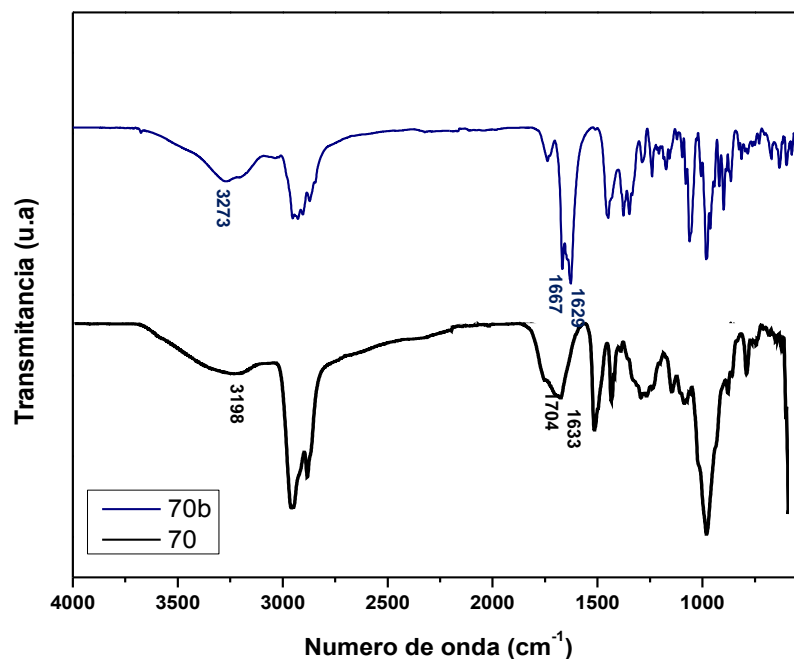


Figura 23. Espectros de FT-IR de los compuestos **70** y **70b**.

Finalmente, el espectro de masas por la técnica ESI-MS-(+) confirmó la estructura propuesta para **70**, ya que se observó el pico (ion molecular) de 429.3473 [M+H]⁺. Por el contrario, el espectro de **70b** mostró un pico (ion molecular) con una relación m/z de 427.2848 derivado posiblemente de la pérdida del grupo oxima, ya que la formación del grupo lactámico quedó corroborada con los experimentos de RMN. En ambos espectros, se observó un pico con una relación m/z de 338.3419 para **70** y 338.3423 para **70b**. De acuerdo con la base de datos del equipo MS ESI-TOF, dicha señal podría corresponder a un compuesto llamado erucamida. La erucamida, es un aditivo de deslizamiento y antibloqueo para ser usada en polietileno de baja y alta densidad y de polipropileno; provocando buena estabilidad a la oxidación, baja volatilidad, efecto deslizante, características antibloqueantes y por tanto, podría estar presente en contenedores plásticos como aquellos donde se resguardan los disolventes orgánicos (**Figura 24**).

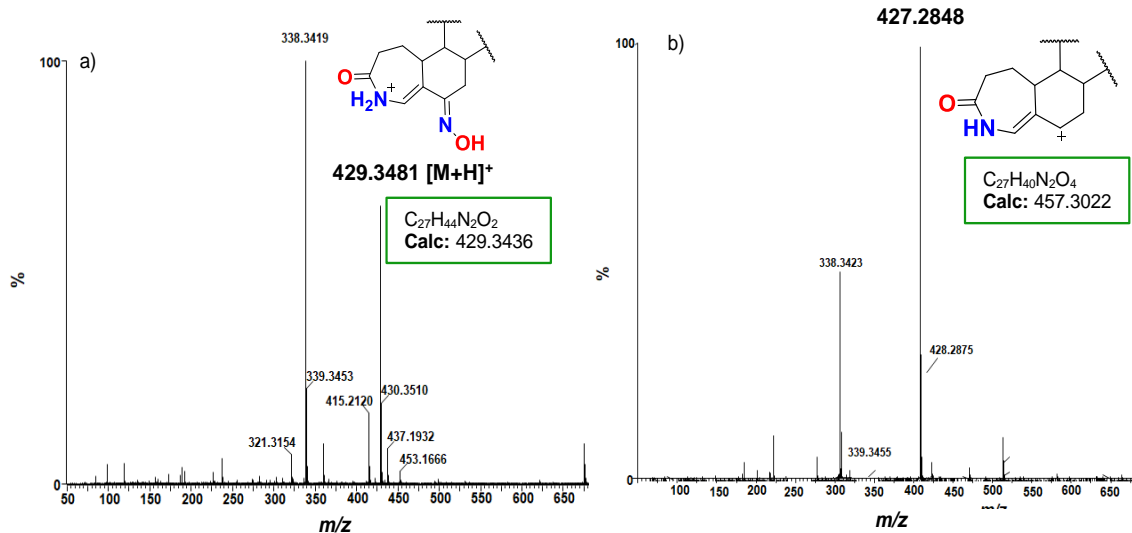
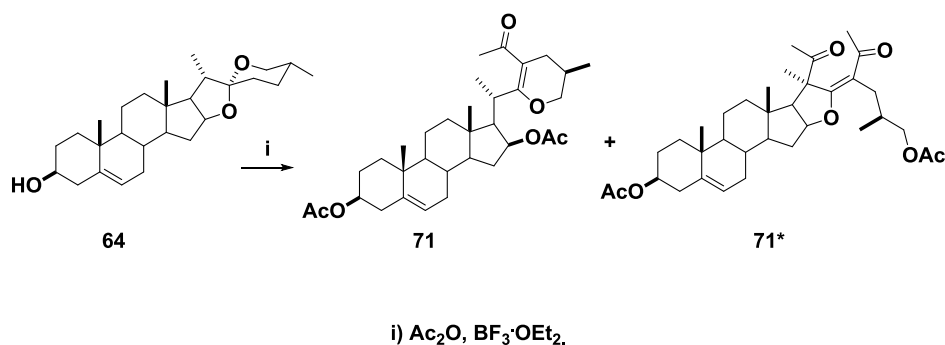


Figura 24. Espectros ESI-MS-(+) de a) compuesto **70** y b) compuesto **70b**.

7.1.2.- Análisis estructural de productos e intermediarios para la obtención de una B-homolactama (Esquema 8)

Las modificaciones en la cadena lateral han permitido encontrar moléculas con interesantes actividades destacando a la vespertilina sintetizada a partir de diosgenina.⁶² Es por lo que, en el primer paso de reacción se pensó en la modificación de la cadena lateral tal y como lo reporta Hernández-Linarex, Meza-Reyes⁶³ y Pérez-Díaz.⁶⁴ Para ello, se hizo reaccionar a la diosgenina con un exceso de anhídrido acético y un excedente de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ por 50 min. Posterior a la purificación por CC, se separaron y caracterizaron dos principales productos, el derivado **71** y en una menor proporción el diacetato de (*E*)-(20*S*,25*R*)-20,23-diacetilfurost-5,22-dien-3 β ,26-diil (**71***) (Esquema13).



Esquema 13. Reacción de modificación de la cadena lateral de diosgenina.

En el espectro de RMN de ^1H de **71**, fue posible observar la señal en 5.14 ppm asignada a $\text{H-16}\alpha$, la cual es claramente desprotegida por la presencia del grupo acetato. Entre 1.90-2.31 ppm se observaron tres señales simples que integran para tres protones correspondientes a los metilos de los dos grupos acetatos y del grupo acetilo (**Figura 25**). El espectro de ^{13}C de **71**, coincidió con el reportado en la literatura.^{63,64} Cabe señalar que, con respecto a dichas referencias bibliográficas, en este trabajo fue posible aumentar el rendimiento del derivado **71** (90.6 %) y disminuir la formación de intermediarios.

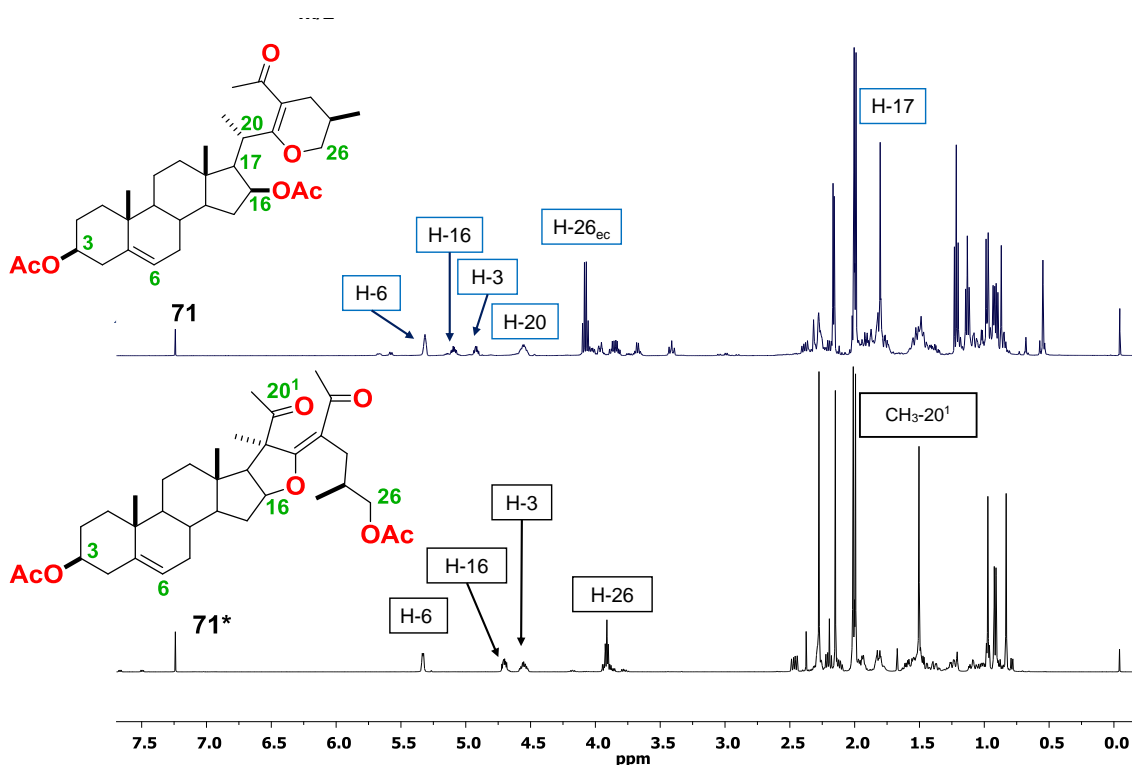
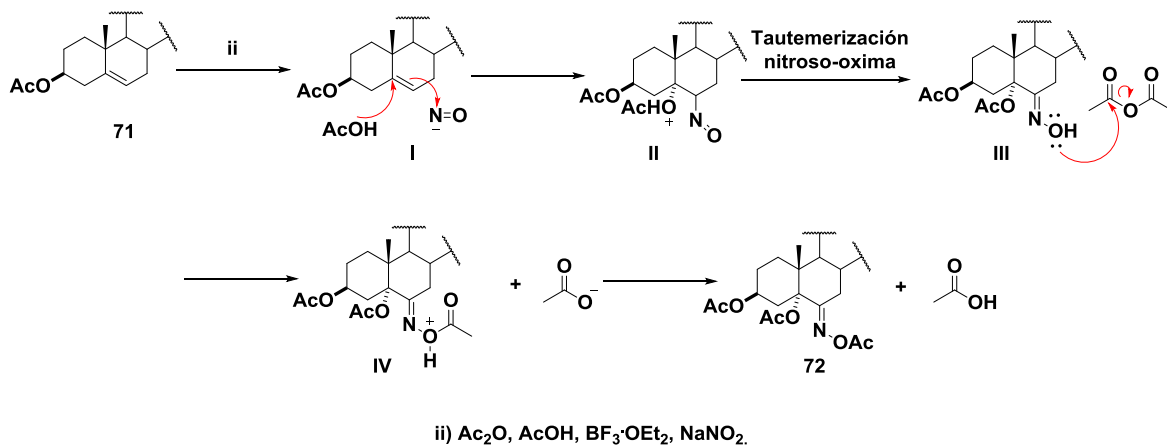


Figura 25. Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) de los compuestos **71** y **71***.

El segundo paso de la ruta consistió en hacer reaccionar el derivado **71** con anhídrido acético y $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ seguido de la adición de AcOH y NaNO_2 , el cual se agregó poco a poco mientras se iba generando el gas nitrosonio. En el **Esquema 14**, se describe el mecanismo de reacción para la formación del derivado **72** (83.3% de rendimiento).³⁶ En el análisis por RMN de ^1H , se destacaron las señales en: 5.11 ppm (H-26 , ddd); 4.82 ppm (H-3 , m); 3.96 ppm ($\text{H-26}\beta$, dd); 3.42 ppm ($\text{H-26}\alpha$, dd); 3.05 ppm (H-7 , dd) y 2.17 ppm ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{-N}$, s). Con respecto a las señales de ^{13}C ,

la señal en 165.2 ppm asignada al C=N confirmó la obtención del grupo acetoximino (Figura 26).



Esquema 14. Reacción de nitrosación en la posición 6 del compuesto 71.

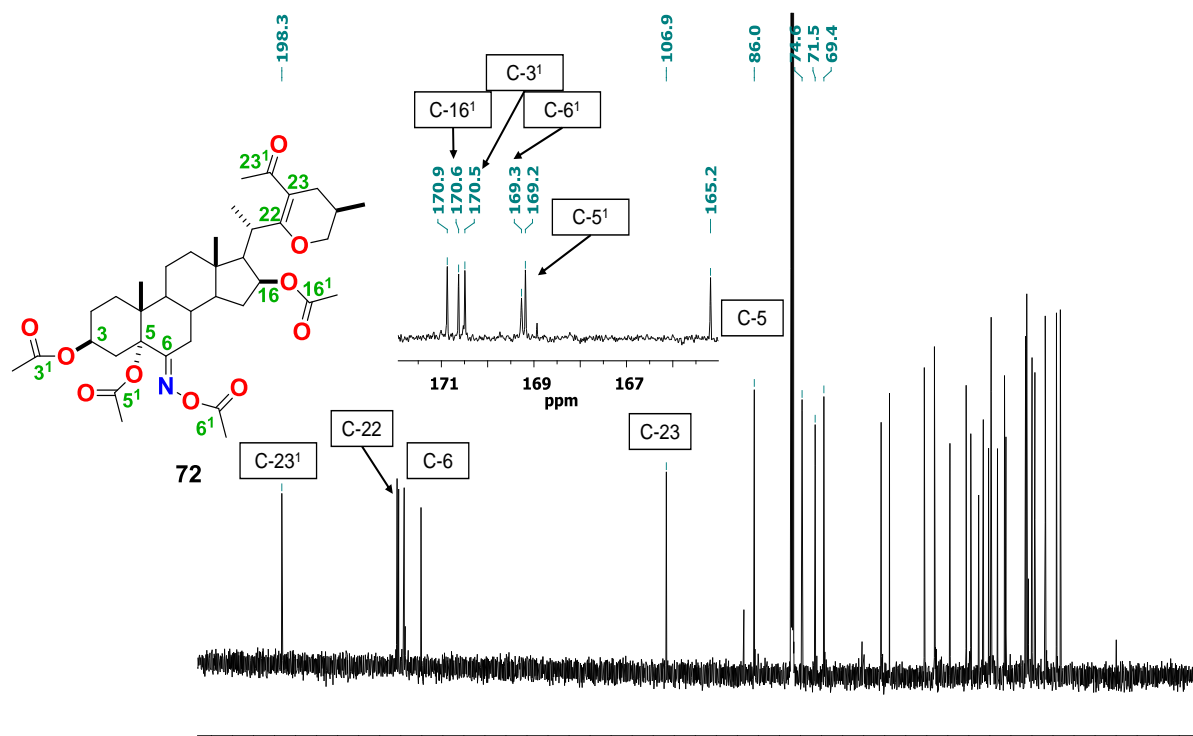
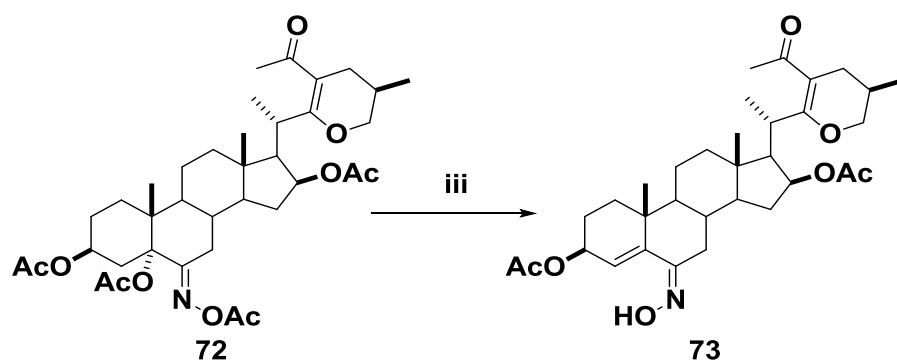


Figura 26. Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃) del compuesto 72.

Una vez generado el compuesto **72**, éste se hizo reaccionar con una base débil (Na_2CO_3), en presencia de una mezcla de $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1). Bajo estas condiciones fue posible hidrolizar de manera selectiva el grupo acetato del acetoximino y, se logró obtener un grupo oxima de configuración *Z* sin partir de un grupo cetónico (**Esquema 15**).



Esquema 15. Reacción de hidrolisis básica del compuesto **72**.

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **73**, se observó una señal simple en 10.27 ppm que integra para un protón, el cual es atribuida al grupo OH de la oxima. También, se observó una señal dd que integra para un protón con desplazamiento de 2.33 ppm asignada al protón $\text{H-7}\beta$. Con base al desplazamiento observado y, a los datos bibliográficos, se determinó que la estereoquímica de la oxima resultante es *Z*.^{65, 66} Por tanto, la hidrolisis del grupo acetato en C-6 y la eliminación del grupo acetato en C-5 provocó la modificación de la estereoquímica del enlace $\text{C}=\text{N}$. Otras señales características observadas son las asignadas al protón vinílico H-4 en 5.63 ppm y las dos señales simples de los grupos metilo de los acetatos en 2.02 ppm ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{-3}$) y 1.77 ppm ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{-16}$) (**Figura 27**).

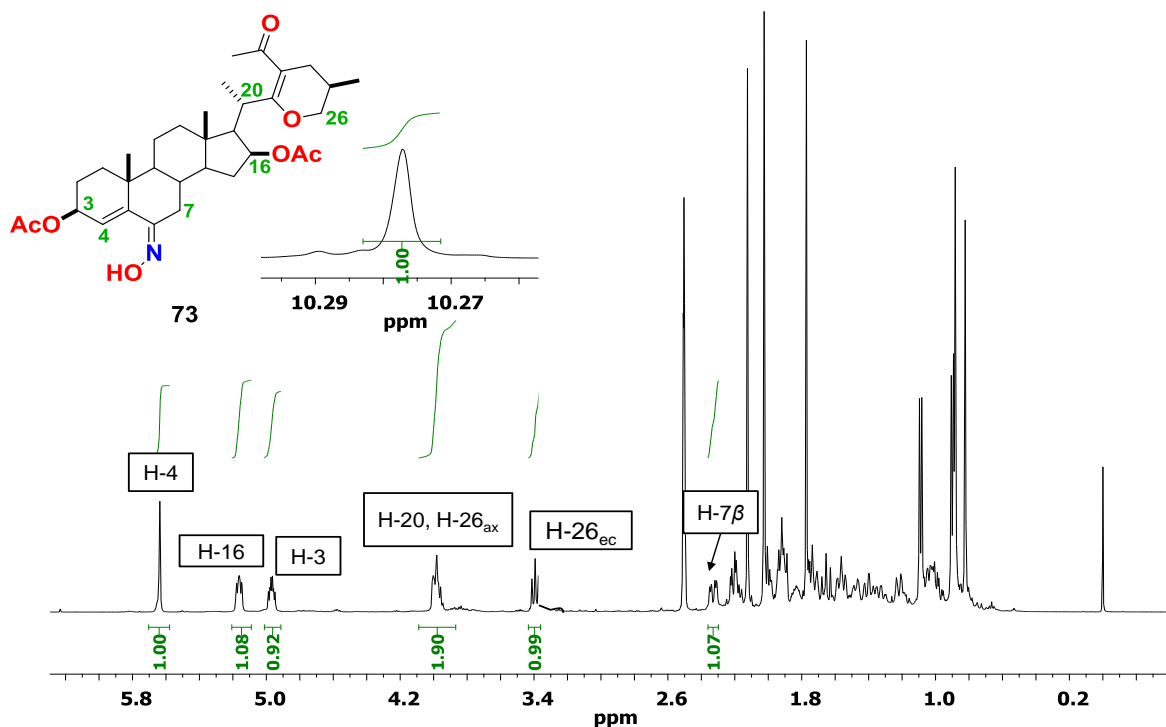


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) del compuesto **73**.

En el espectro de RMN de ^{13}C destacan las siguientes señales en: 197.7 ppm, una señal asignada al carbonilo de cetona; en 170.2 ppm y 106.8 ppm, las señales correspondientes a los carbonos vinílicos C-22 y C-23, respectivamente. Además, se corroboró la hidrólisis del grupo acetato en C-6 debido al cambio de desplazamiento químico del carbono del grupo acetoximino (165.2 ppm) vs el desplazamiento del carbono del grupo oxima (151.8 ppm). También, se observaron dos señales en 169.7 ppm y 169.3 ppm asignadas a los carbonilos de éster C-3¹ y C-16¹, respectivamente. En 138.5 ppm, se encuentra C-5 y en 125.8 ppm está la señal asignada a C-4 corroborando la presencia de un doble enlace. Otra señal que resalta en el espectro es la de 106.8 ppm, asignada al carbono vinílico C-23 (**Figura 28**).

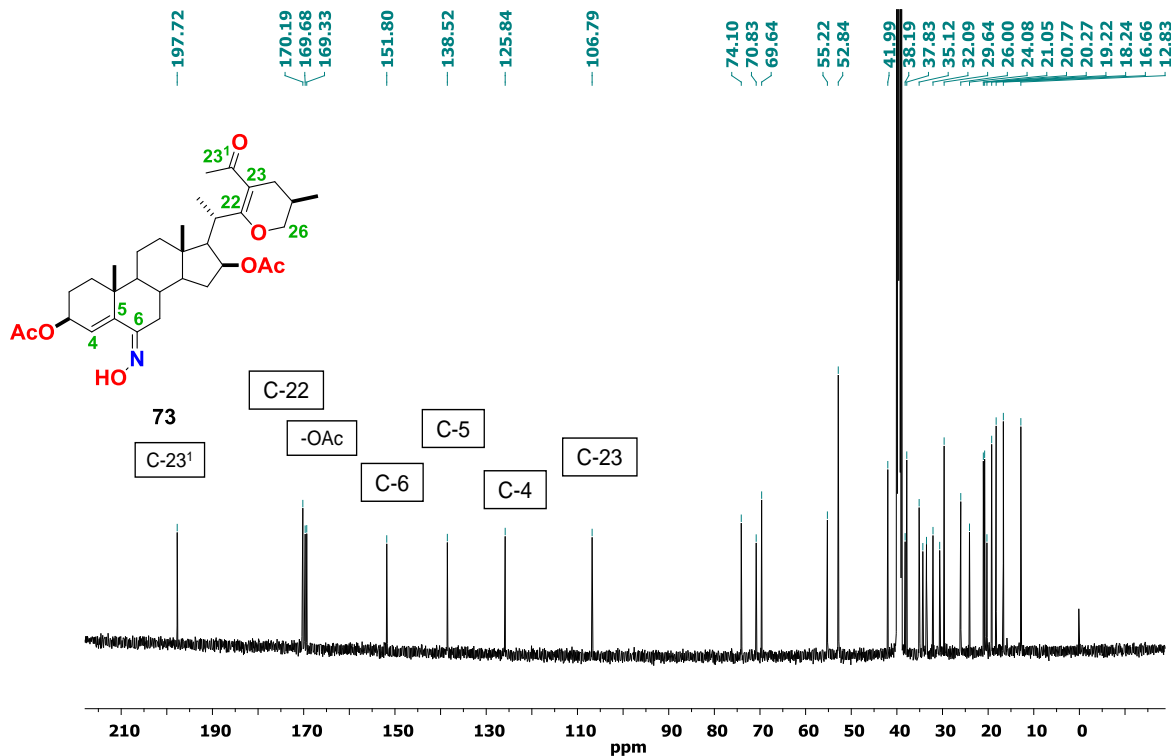


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$) del compuesto **73**.

En el espectro de masas mediante la técnica ESI-MS-(+) para el compuesto **73**, se observó el pico (ion molecular) con una relación m/z esperada de 570.3435 $[\text{M}+\text{H}]^+$ de fórmula molecular $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{NO}_7$ y un error de masa de 0.2 ppm. Además, en el experimento MS/MS fue posible observar que el pico base con una relación m/z de 510.3225 es un fragmento de **73**, el cual corresponde a la pérdida de un grupo acetato en la molécula (Figura 29).

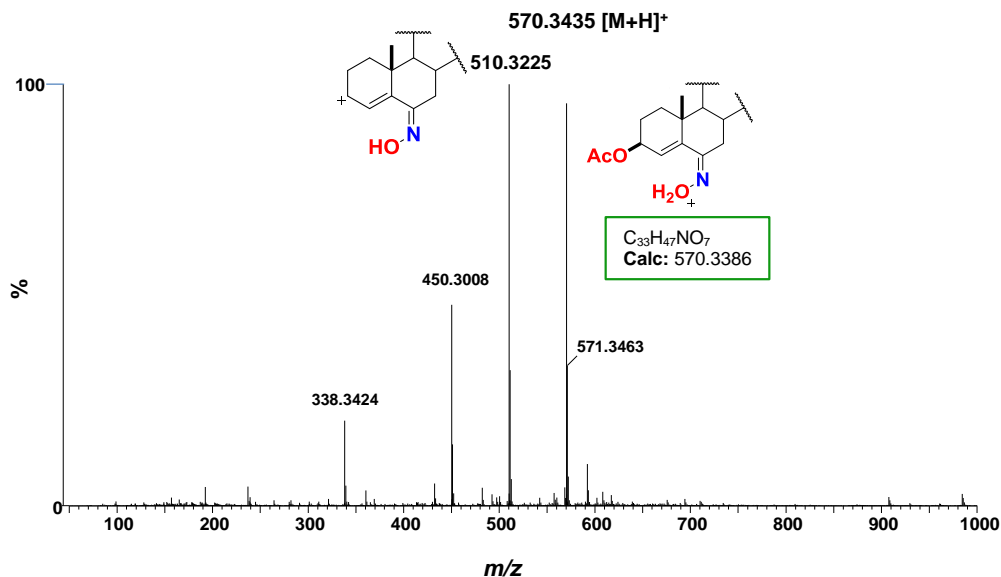


Figura 29. Espectro ESI-MS-(+) del compuesto **73**.

Las oximas son fácilmente convertibles a lactamas y este grupo funcional en particular de acuerdo a la bibliografía posee afinidad con los aminoácidos encontrados en los receptores celulares explicando de esta manera su actividad antiproliferativa o citotóxica.⁶⁷ Por lo anterior, se planteó obtener una B-homolactama haciendo reaccionar a **73** con $SOCl_2$ en dioxano. Bajo estas condiciones se esperaba obtener una lactama tipo enamida según lo reportado por Kristić y colaboradores, quienes mostraron que cuando se parte de un oxima *Z* se obtiene una lactama tipo enamida; mientras que, cuando se parte de una oxima *E*, bajo estas mismas condiciones, se obtiene una lactama tipo enamina.¹² Dado que los protones diastereotópicos H-7 α y H-7 β de **73**, se observaron en el espectro de RMN de 1H en ~ 3.00 ppm se confirmó que se obtuvo una lactama tipo enamida. Otras señales que corroboraron la estructura propuesta son: en 6.23 ppm, el protón del grupo lactama y en 5.93 ppm, una señal asignada al protón vinílico H-4. En tanto, la cadena lateral no sufrió modificaciones ya que se mantuvieron las señales de los protones diastereotópicos de C-26 y la señal simple del grupo acetilo (**Figura 30**).

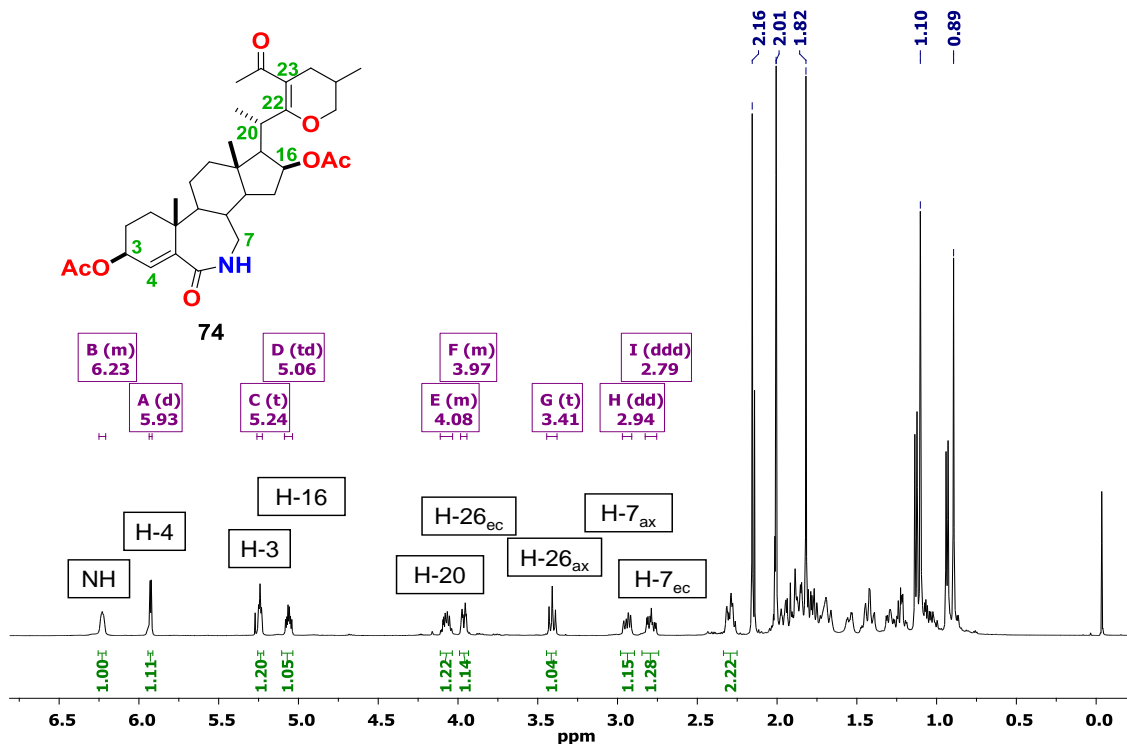


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) del compuesto **74**.

Existen experimentos bidimensionales en RMN que ayudan a entender y elucidar casi por completo una estructura química. Por ejemplo, el experimento COSY, el cual corresponde a un espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H a dos o tres enlaces. Mientras que los experimentos HMBC y HSQC, establecen una correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C vía tres enlaces y una correlación directa mediante pulsos, respectivamente. En el espectro COSY de **74**, se pudo observar una correlación entre la señal ancha del protón de la lactama (6.23 ppm) con los protones de C-7 en 2.94 ppm y 2.79 ppm (**Figura 31**). Esa misma señal en 6.23 ppm, no presentó ninguna correlación en el experimento HSQC confirmando ser el protón de la lactama (**Figura 32**). La señal de 5.93 ppm, asignada al protón H-4, también apoya la estructura propuesta ya que en COSY correlaciona con la señal de H-3 (5.24 ppm) y en HMBC correlaciona con la señal de ^{13}C de 174.8 ppm (C-6) (**Figura 33**). Lo anterior, corrobora la lactama tipo enamida. Además, están las señales en 3.96 ppm y 3.41 ppm que correlaciona con una misma señal de ^{13}C en 71.5 ppm confirmando a los protones del C-26; esto en HSQC.

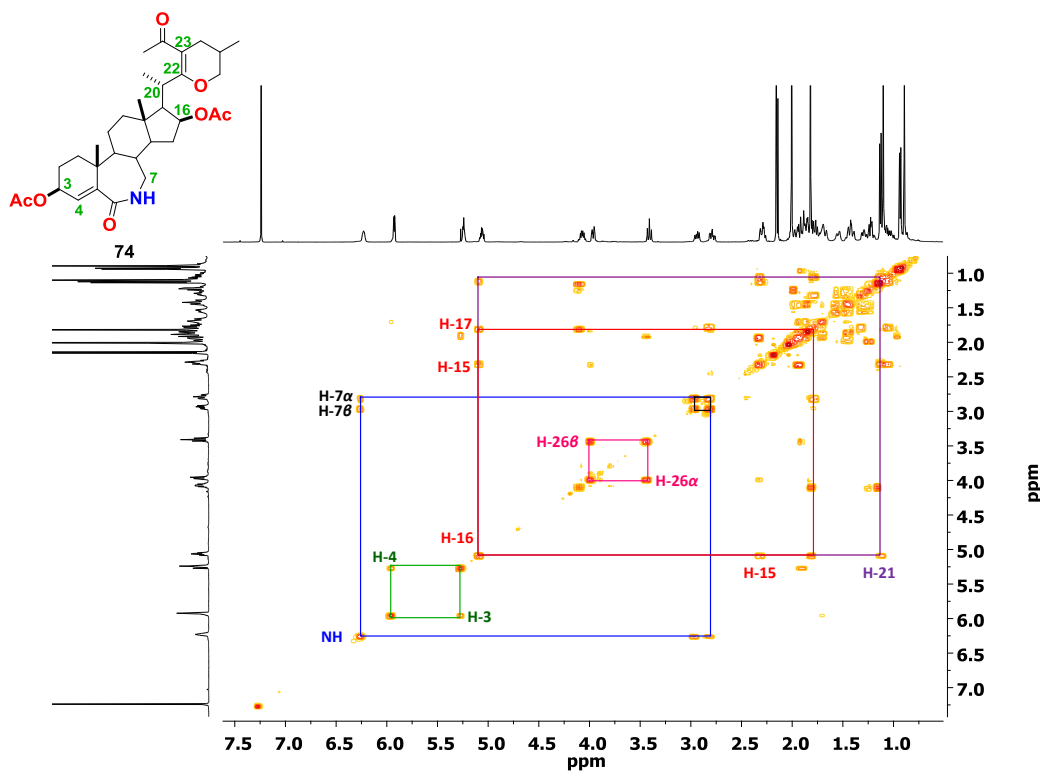


Figura 31. Experimento COSY en CDCl_3 del compuesto 74.

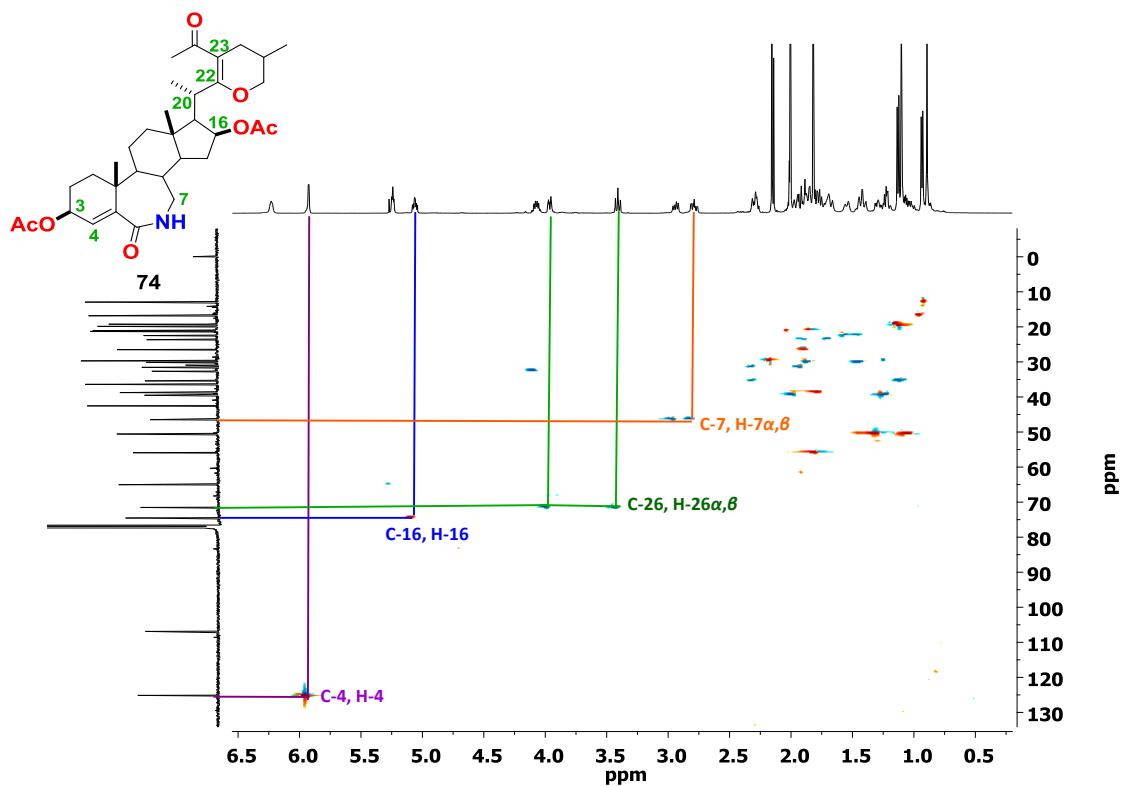


Figura 32. Experimento HSQC en CDCl_3 del compuesto 74.

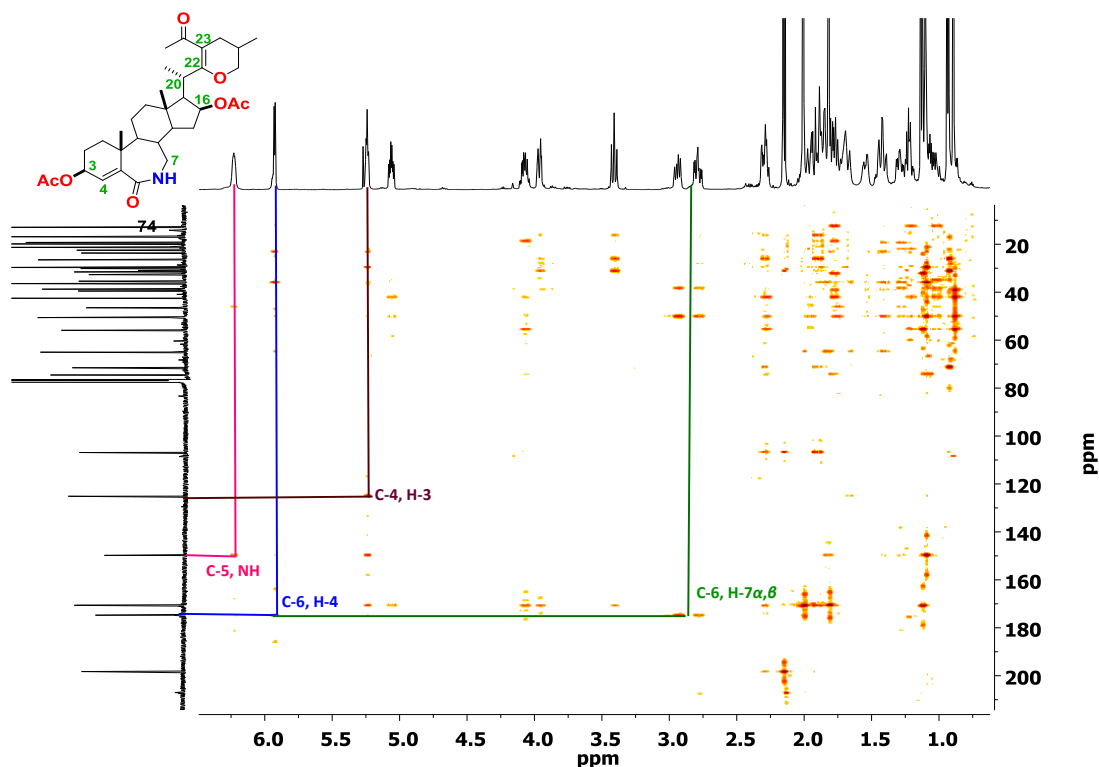


Figura 33. Experimento HMBC en CDCl_3 del compuesto **74**.

En el análisis por FT-IR de **74**, se observaron las bandas esperadas para los grupos funcionales presentes en el compuesto: dos de tensión propias del grupo lactama debidas a la tensión simétrica y asimétrica del enlace N-H en 3302 cm^{-1} y 3216 cm^{-1} ; la de vibración del grupo carbonilo de los ésteres en 1732 cm^{-1} ; la de tensión del grupo carbonilo de cetona α,β -insaturada en 1660 cm^{-1} . Por último, la de flexión del enlace N-H del grupo lactama en 1567 cm^{-1} . Probablemente, la banda debida a la tensión del grupo C=O de la lactama este traslapada con la banda del grupo carbonilo de la cetona ya que presentan frecuencias similares (**Figura 34**).

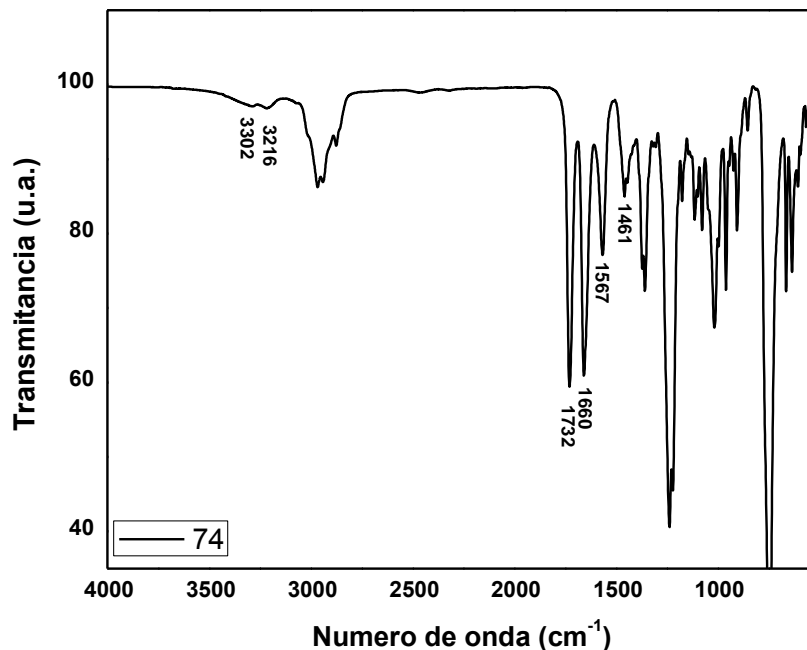


Figura 34. Espectro de FT-IR del compuesto 74.

En el espectro de masas mediante la técnica ESI-MS-(+) para el compuesto 74, se logró identificar un pico base con una relación m/z de 510.3216, que puede ser resultado de la pérdida de un grupo acetato del esteroide. Esto debido a que, es bien sabido que los grupos acetatos son fácilmente ionizables dejando un patrón similar de fragmentación que al descrito para el intermediario oxima 73 (Figura 35).

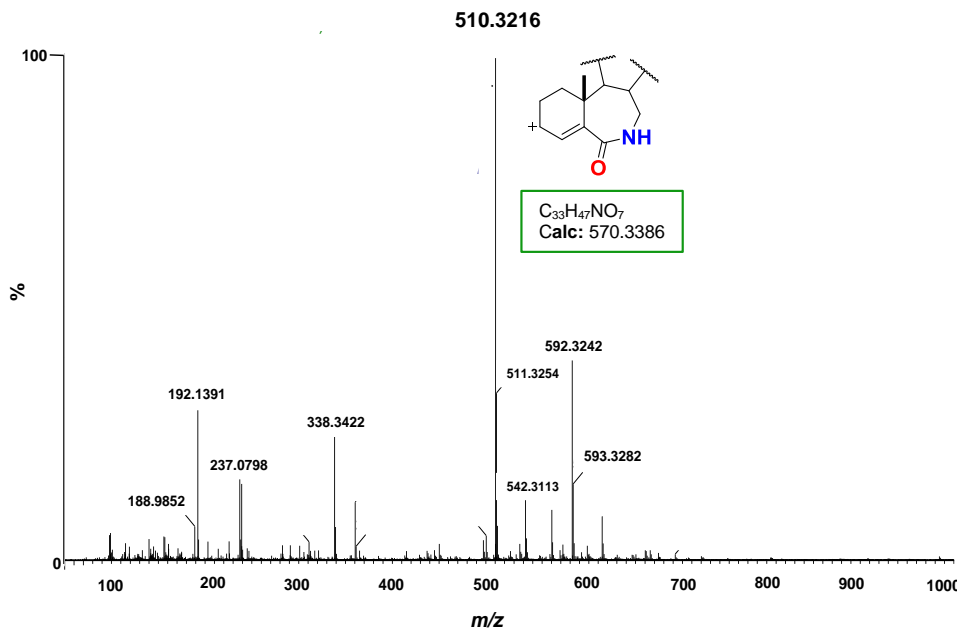
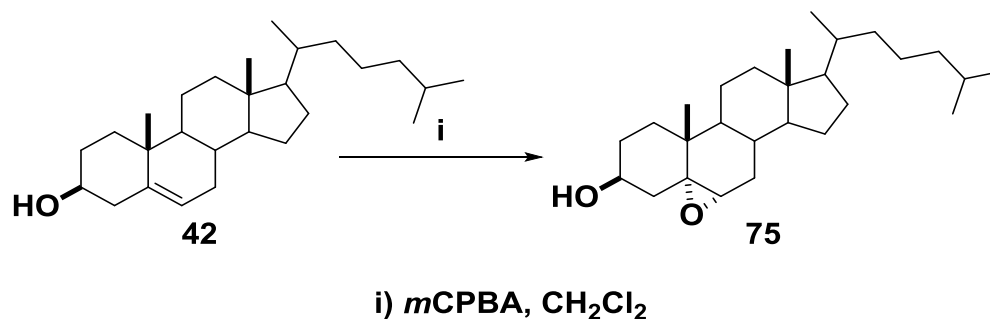


Figura 35. Espectro de ESI-MS-(+) del compuesto 74.

7.1.3.-Análisis estructural de intermediarios y productos en la obtención de la 5 α -hidroxidioxima a partir de colesterol (Esquema 9)

Las oximas esteroidales con grupos hidroxiimino localizados en el anillo B y un grupo hidroxilo en los anillos A o B han resultado tener un índice de citotoxicidad mayor frente a otras modificaciones estructurales.⁶⁸ Este aumento de la citotoxicidad ha sido evaluado frente a diversas líneas celulares de cáncer tales como Sk-Hep-1, H-292, PC-3 y Hey-1B; mostrando una mejoría en la actividad antiproliferativa. Debido a lo mencionado, resultó de gran interés la síntesis de una molécula con grupos hidroxiimino en C-3 y C-6 junto con la introducción de un grupo hidroxilo en C-5. En primera instancia, la estrategia consistió en la formación de un epóxido en C-5 partiendo del colesterol (**Esquema 16**). Para ello, se empleó la metodología reportada en la literatura,^{69, 70} utilizando una disolución de *m*CPBA en CHCl₃ la cual se agregó gota a gota a la disolución del esteroide en CHCl₃ manteniendo la temperatura entre 0-5 °C. La reacción se terminó al adicionar sulfito de sodio lentamente.



Esquema 16. Reacción de epoxidación en Δ^5 del compuesto **42**.

Mediante los datos de RMN de ¹H y datos de la literatura, se corroboró la estructura de **75**. Destacando las señales en: 3.90 ppm asignada a H-3, 2.90 ppm asignada a H-6, 1.05, 0.88, 0.86, 0.84 y 0.60 ppm, correspondiente a los protones de los 5 metilos de la molécula. Específicamente, el desplazamiento de H-6 fue fundamental para diferenciar la posible estereoquímica del epóxido formado. Esto debido a que, para una estereoquímica 5 β ,6 β ; H-6 posee un desplazamiento \sim 3.06 ppm y para una estereoquímica 5 α ,6 α ; H-6 se desplaza en \sim 2.90 ppm.⁷⁰ En este espectro, H-

6 se observó en como una señal d con un desplazamiento de 2.90 ppm. Por tanto, la estereoquímica formada mediante las condiciones descritas fue un epóxido 5 α ,6 α . En el experimento de ^{13}C , se observaron 27 señales de carbono que concuerdan con el número de carbonos del producto, destacando los desplazamientos para los carbonos base de oxígeno en: 69.4 ppm (C-3), 68.7 (C-5) y 59.3 (C-6) (**Figura 36**).

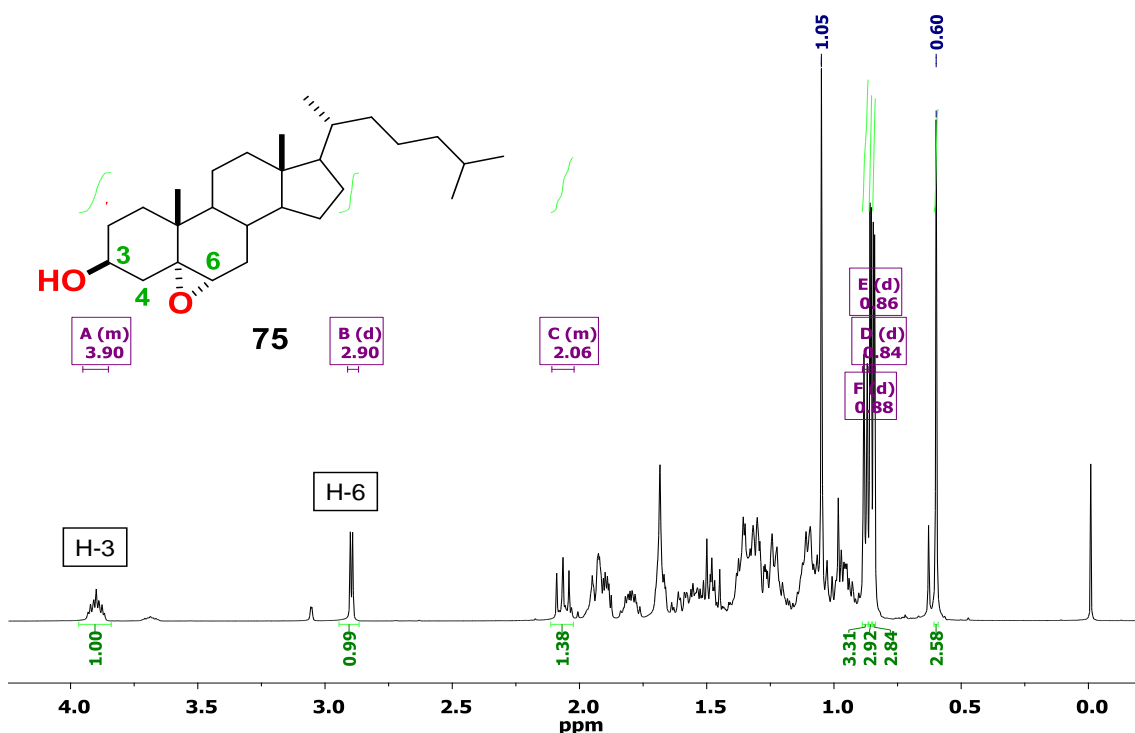


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) del compuesto **75**.

En el espectro de FT-IR, fue posible observar la banda de tensión del enlace O-H de C-3 a una frecuencia máxima de 3392 cm^{-1} . En 1369 cm^{-1} , se encuentra la banda de tensión asimétrica y en 1059 cm^{-1} la banda de tensión simétrica del enlace C-O-C del epóxido. Así también, una frecuencia destacable es aquella que aparece en 1039 cm^{-1} , la cual se atribuye a la tensión asimétrica del anillo del grupo epóxido (**Figura 37**).

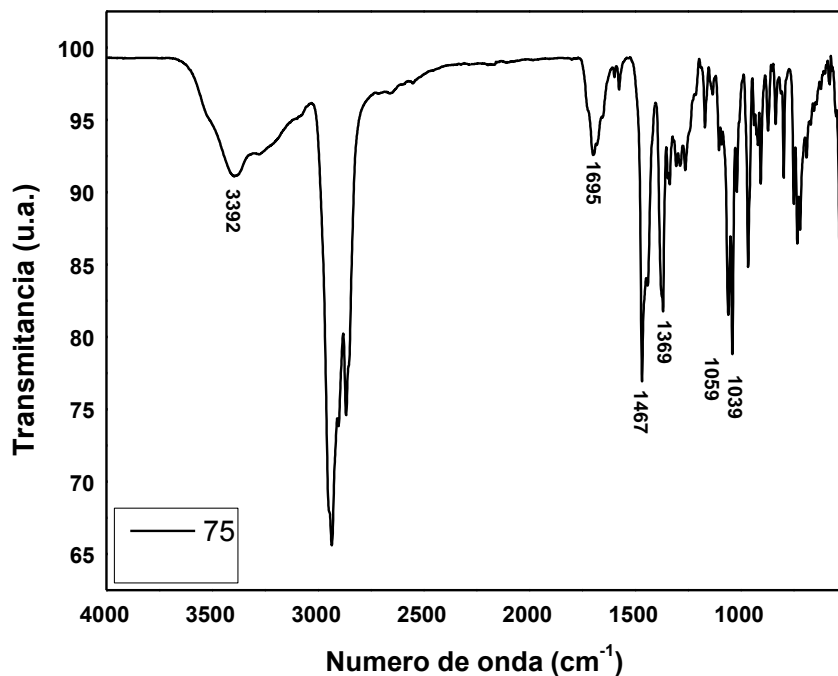
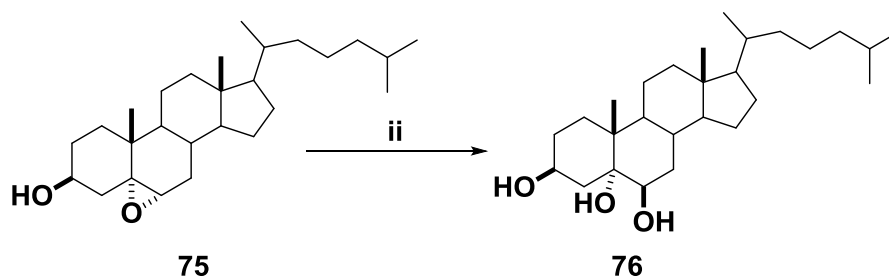


Figura 37. Espectro de FT-IR del compuesto 75.

La molécula objetivo de esta ruta posee dos grupos hidroxiiminos y un grupo hidroxilo en C-5, para formar la oxima se sintetizó la 3,6-dicetona a partir del epóxido **75**. Para ello, se planteó la ruptura del epóxido y la oxidación *in situ* de C-3 y C-6 siguiendo la metodología planteada por Chávez-Riveros y colaboradores.⁷¹ De manera que **75** se disolvió previamente en acetona y se le agregó gota a gota una disolución acuosa de CrO₃ a 0°C por 10 min. Después, la mezcla se llevó a temperatura ambiente y se dejó en agitación por 30 min, luego se adicionó la misma cantidad de la disolución de CrO₃. El producto se obtuvo con un rendimiento bajo (10%). Por lo anterior, se realizó un segundo ensayo utilizando el reactivo de Jones como oxidante, siguiendo la misma metodología que con **43** y **43b**, sin embargo, no se obtuvo el producto esperado. Dados los resultados anteriores se propuso obtener un triol intermediario (**76**) y su subsecuente oxidación. Para llegar a **76**, se trató al epóxido con H₂SO₄ concentrado a temperatura ambiente por tres horas (**Esquema 17**). Sin embargo, posterior a la purificación se observó descomposición del producto. Por lo que se decidió no llevar a cabo la separación cromatográfica y se optó por evaporar la mayor parte del disolvente y posteriormente verter en agua

helada para favorecer la formación de un precipitado blanco que correspondió al compuesto esperado **76** con un rendimiento del 75.3%.



ii) H_2SO_4 , acetona- H_2O

Esquema 17. Reacción de apertura de **75**.

De este intermediario no se adquirieron espectros de RMN, únicamente se compararon los datos de FT-IR con la literatura. En el espectro de FT-IR del producto, se observó una banda de tensión simétrica de menor intensidad para el enlace O-H a una frecuencia de 3296 cm^{-1} (vs 3332 cm^{-1} de la lit).⁷³ Debido a que la intensidad de esta banda disminuyó, se dedujo que los hidroxilos de C-3 y C-6 se transformaron a las respectivas cetonas. Adicionalmente, se apreció una nueva banda en 1708 cm^{-1} (vs 1710 cm^{-1} lit)⁷³ correspondiente al enlace C=O (**Figura 38**).

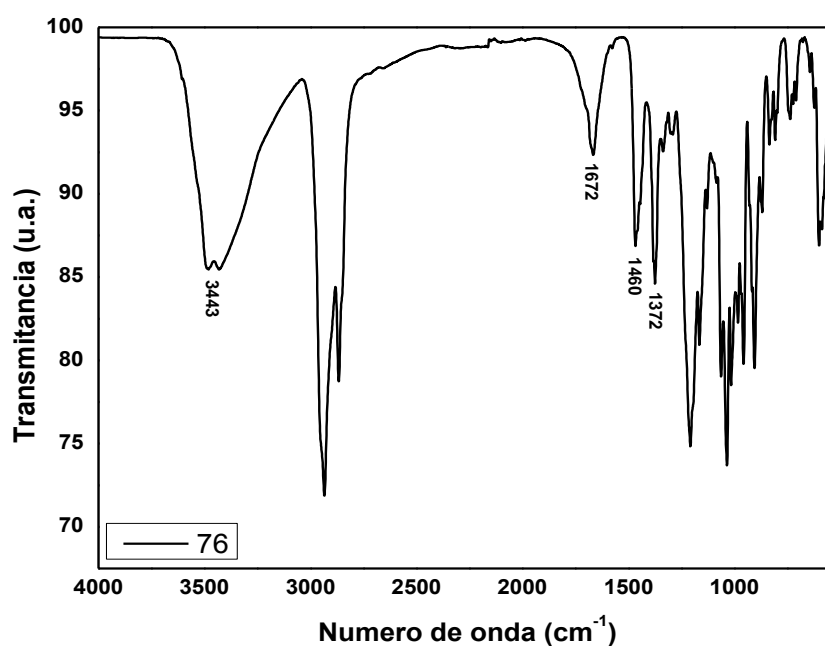


Figura 38. Espectro de FT-IR del compuesto **76**.

Mediante el análisis por masas mediante la técnica ESI-MS(-) se observó el pico esperado con una relación m/z de 419.3520 $[M-H]^-$ de fórmula molecular $C_{27}H_{47}O_3$ y un error de masa de 1.9 ppm. Además, en el experimento MS/MS se observó que el pico con una relación m/z de 417.3372, es un derivado del triol **76** que ha perdido los tres alcoholes (**Figura 39**).

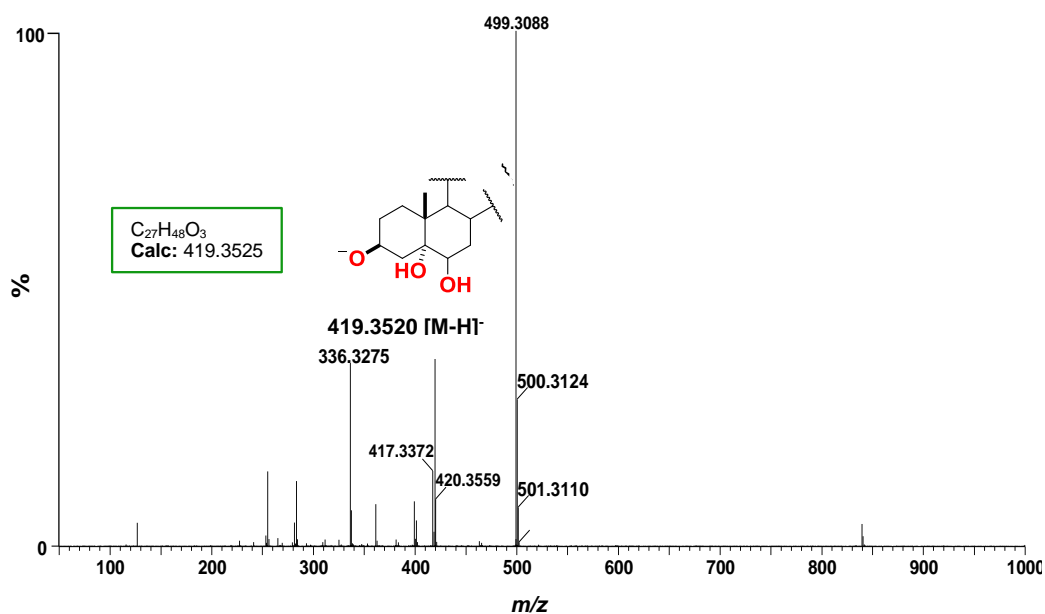
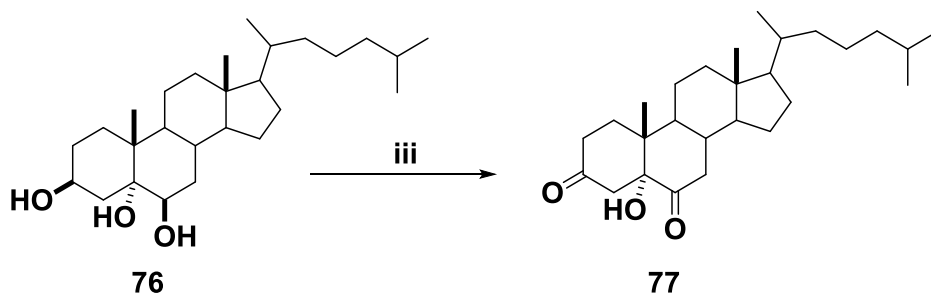


Figura 39. Espectro ESI-MS(-) del compuesto **76**

Continuando con la ruta de síntesis, se oxidaron los alcoholes secundarios del triol. Para ello, se sometió a **76** a un proceso de oxidación empleando el reactivo de Jones. Sin embargo, se formaron demasiados subproductos y fue difícil la separación cromatográfica más aún porque muchos de los productos obtenidos no revelaron al UV. En un segundo ensayo, se empleó PCC como agente oxidante, el cual, se adicionó a una suspensión formada por **76**, gel de sílice y $CHCl_3$. Mediante esta metodología se obtuvo a **77** con un 70% de rendimiento (**Esquema 18**).



iii) PCC, CH₃Cl, silica.

Esquema 18. Reacción de oxidación del compuesto **76**.

De este intermediario no se adquirieron espectros de RMN, únicamente se compararon los datos de FT-IR con la literatura. En el espectro de FT-IR del producto, se observó una banda de tensión simétrica de menor intensidad para el enlace O-H a una frecuencia de 3296 cm⁻¹ (vs 3332 cm⁻¹ de la lit).⁷³ Debido a que la intensidad de esta banda disminuyó, se dedujo que los hidroxilos de C-3 y C-6 se transformaron a las respectivas cetonas. Adicionalmente, se apreció una nueva banda en 1708 cm⁻¹ (vs 1710 cm⁻¹ lit)⁷³ correspondiente al enlace C=O (**Figura 40**).

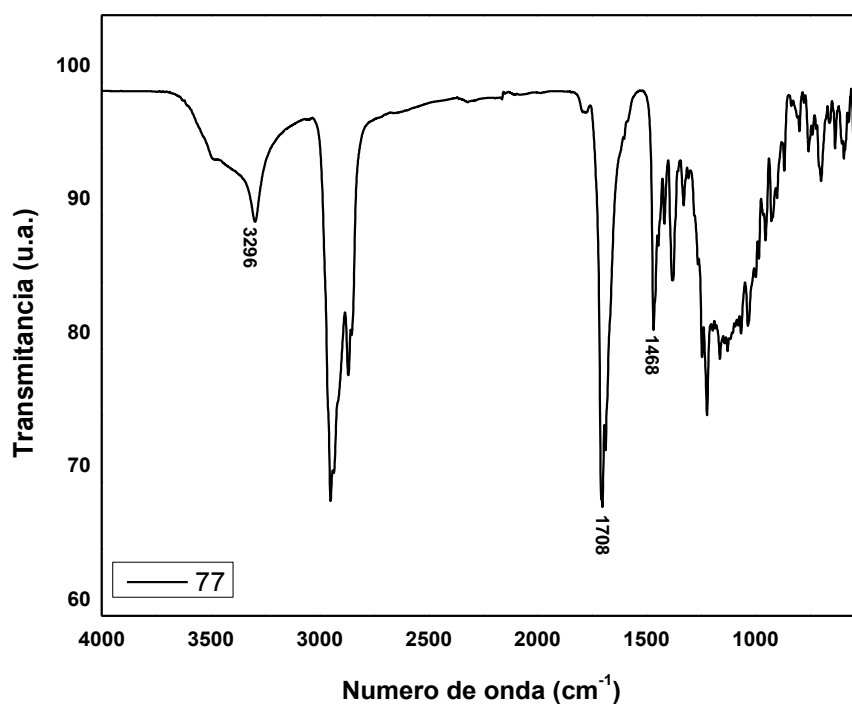


Figura 40. Espectro de FT-IR del compuesto **77**.

En el espectro de masas por la técnica de ESI-MS-(+) del compuesto **77**, no se observó el pico (ion molecular) esperado de masa 416.3290. Sin embargo, se observó un pico con una relación m/z de 399.3262 que concuerda con la masa esperada que ha perdido un grupo hidroxilo (**Figura 41**). No obstante, ya que por FT-IR de **77**, se observó una banda con una energía de vibración característica para los grupos cetona y la cual no se encontraba en el espectro de FT-IR de **76**, se decidió continuar con el paso de condensación del grupo carbonilo.

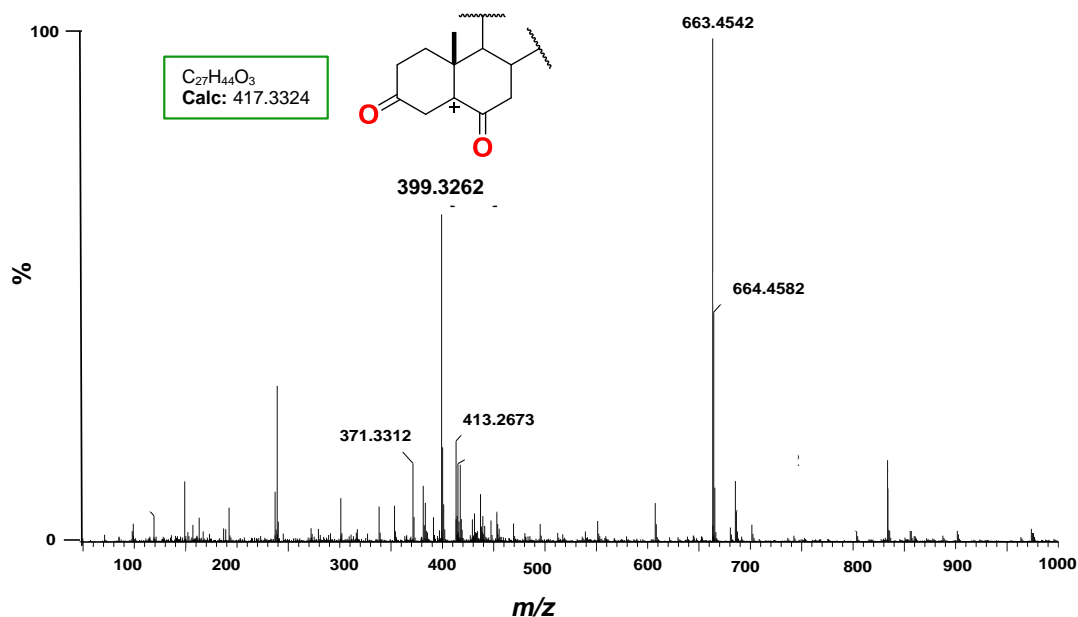
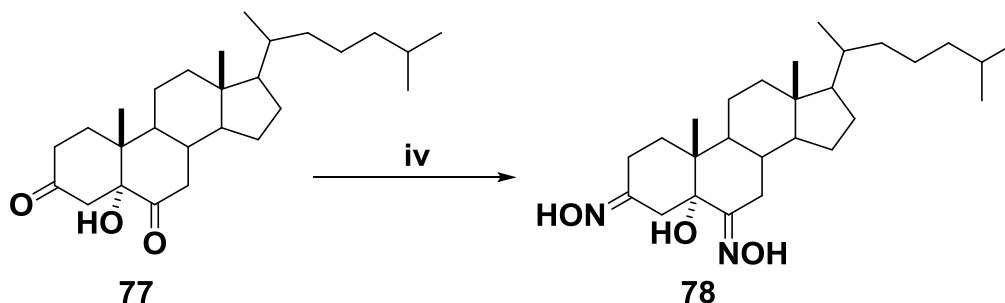


Figura 41. Espectro ESI-MS-(+) del compuesto **77**

En un último paso de la ruta de síntesis, se hizo reaccionar al compuesto **77** con $NH_2OH \cdot HCl$ y $NaOAc$ en $EtOH$. Posteriormente, se llevó a cabo la separación cromatográfica utilizando como eluyente una mezcla 5:5 ($Hex/AcOEt$), obteniendo a **78** con un rendimiento del 28% (**Esquema 19**).



iv) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOAc , EtOH .

Esquema 19. Reacción de condensación del compuesto **77**.

En el espectro de RMN de ^1H , fue posible observar dos señales simples que integran para un protón y cuyo desplazamiento se va a campos bajos en 10.52 ppm y 10.07 ppm (9.80s y 9.65s lit)⁷⁴ las cuales se asignaron a los hidrógenos de los grupos oxima. El pico del protón del alcohol se apreció como una señal simple en 4.87 ppm. La señal observada en 2.99 ppm y que integra para dos protones se asignó a los protones de C-4, este desplazamiento a campos bajos puede deberse a la influencia de los grupos oxima e hidroxilo cercanos a ellos. En el trabajo realizado por Ahmad y colaboradores,⁷⁴ no mencionan la estereoquímica de las oximas ni los desplazamientos de protones adyacentes a éstas. Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, la estereoquímica de dichos grupos funcionales es posible deducirla por el desplazamiento de los protones H-2 y H-7. En el caso particular de **78**, se sugiere una estereoquímica *Z* para ambas oximas dado los desplazamientos de H-7 β y H-2 en 2.24 ppm y 1.94 ppm (**Figura 42**).

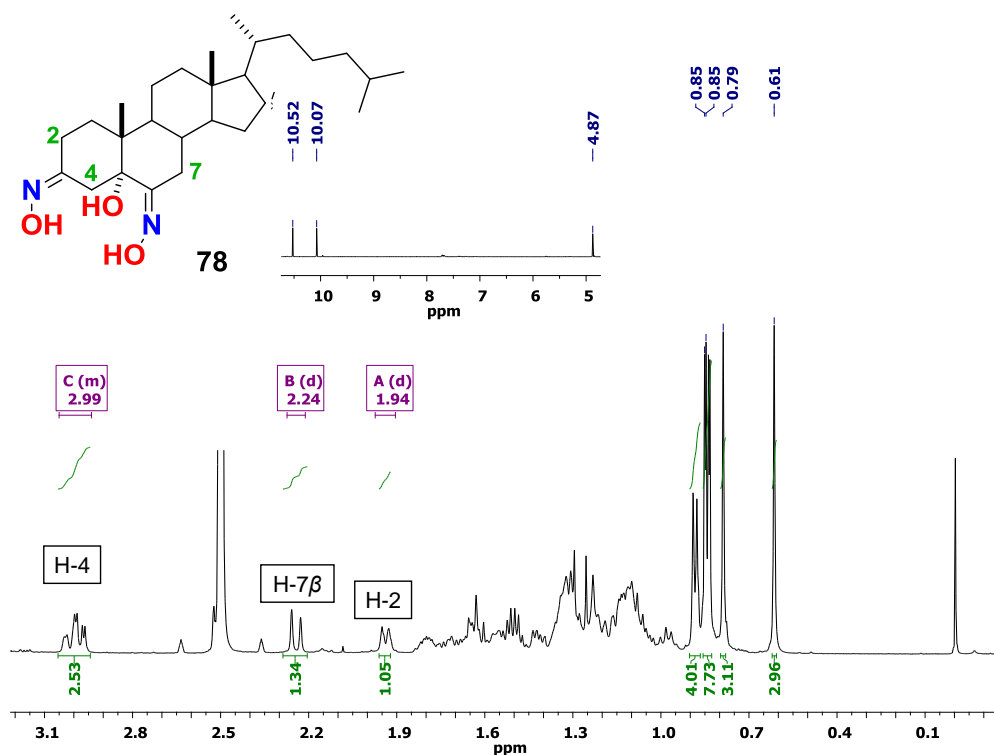


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) del compuesto 78.

En el espectro de RMN de ^{13}C , se corroboró el cambio del grupo funcional cetona al grupo oxima esto debido a las dos señales que se encuentran a campos bajos con desplazamientos de 155.9 ppm y 159.1 ppm. La señal asignada al C-5, se observó en 75.5 ppm, característico para carbonos base oxígeno (**Figura 43**). La asignación del resto de señales se realizó a partir de datos reportados en la literatura.

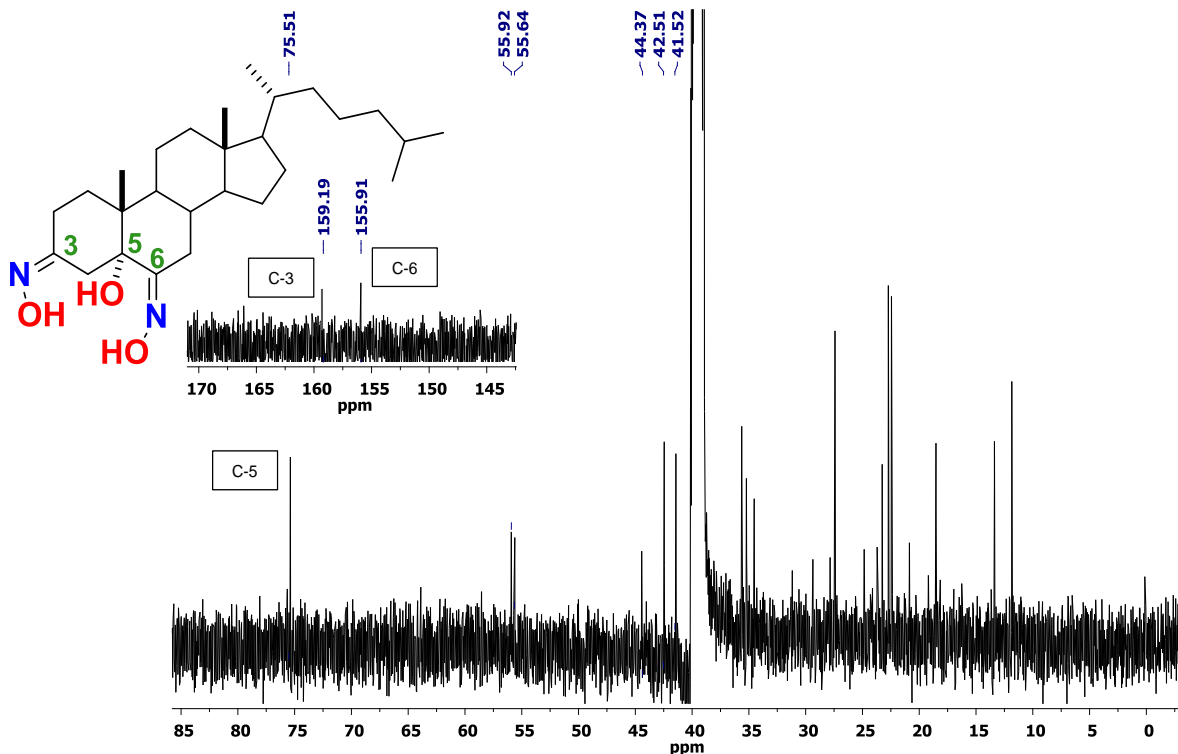


Figura 43. Espectro de RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆) del compuesto 78.

Por último, en el espectro de masas mediante la técnica ESI-MS-(+) del crudo de reacción fue posible observar el pico (ion molecular) esperado con una relación m/z de 447.3578 $[M+H]^+$, con fórmula molecular $C_{27}H_{47}N_2O_3$ y un error de masa de 1.8 ppm. En el espectro, también se observaron los picos con una relación m/z de 338.3419 (erucamida) y 429.3477 (posiblemente de la dioxima con Δ^5) (Figura 44).

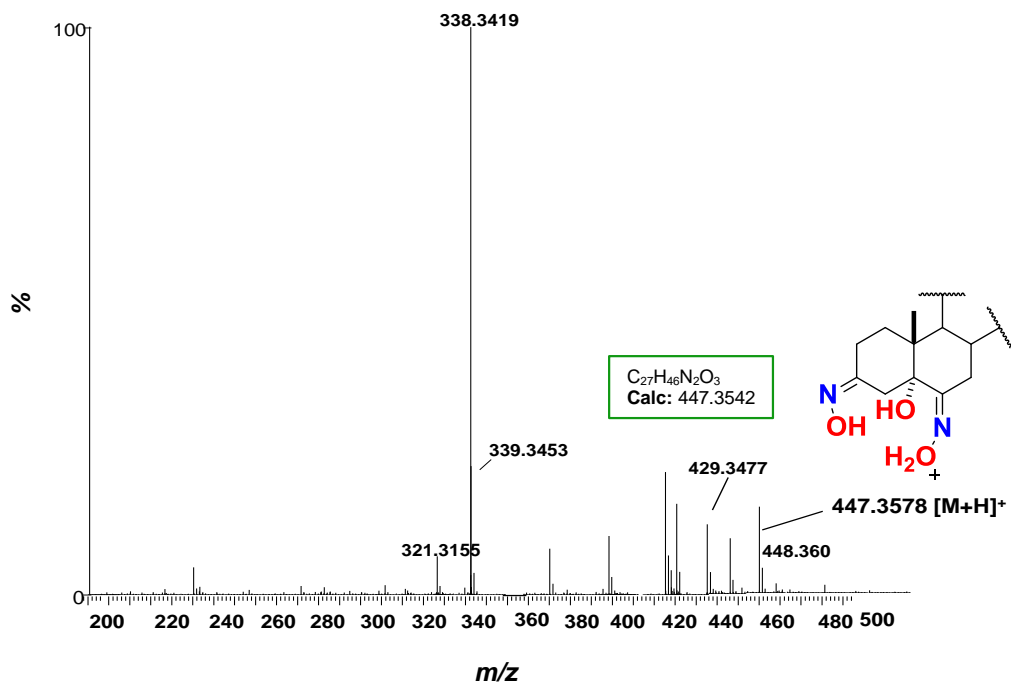
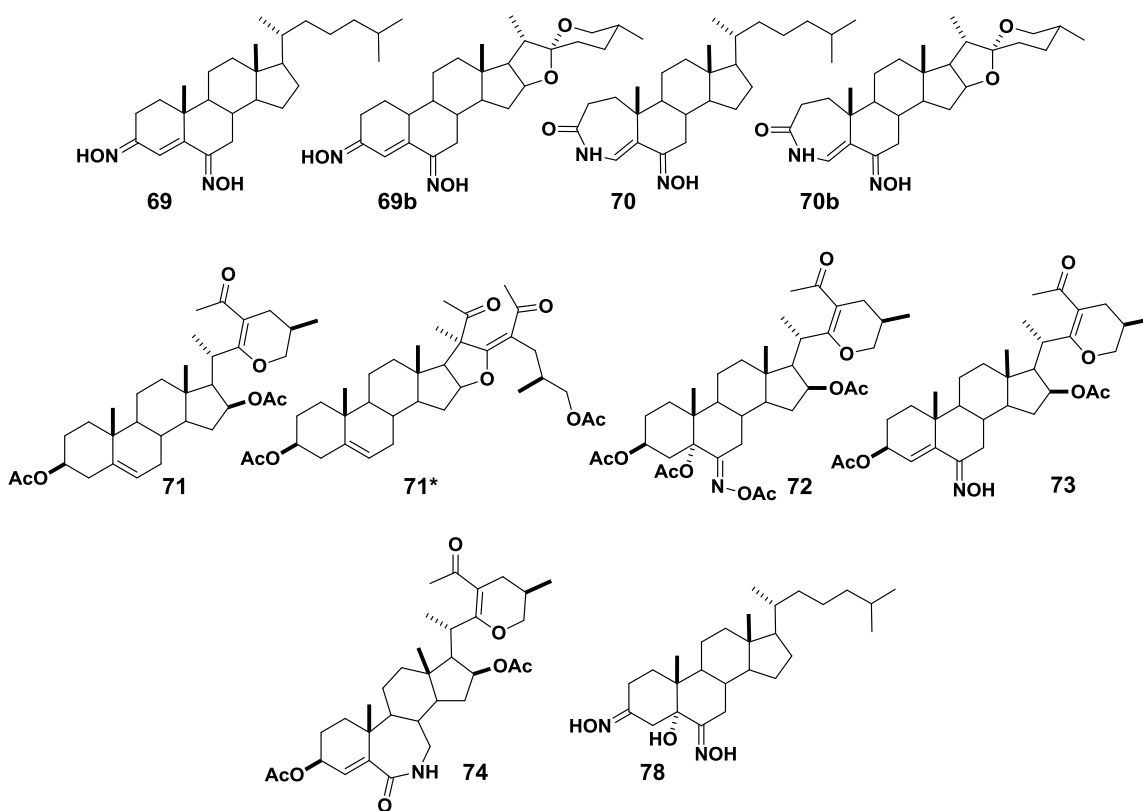


Figura 44. Espectro ESI-MS-(+) del compuesto 78.

7.2.- Evaluación biológica mediante el ensayo por MTT

Los compuestos **69**, **69b**, **70**, **70b**, **71**, **71***, **72**, **73**, **74** y **78** se sometieron al ensayo de viabilidad celular frente a las líneas MCF-7 (cáncer de seno) y CMSP (células sanas), comparando los resultados con un control de DMSO, control positivo (H_2O_2) y un control negativo (medio). Los ensayos se realizaron por triplicado teniendo un aproximado de 2×10^4 células de MCF-7 por pocillo y un aproximado de 1.5×10^5 de CMSP por pocillo.



7.2.1.- Evaluación biológica mediante el ensayo por MTT de 69, 69b, 70 y 70b

Las células MCF-7 fueron incubadas a diferentes concentraciones de los compuestos oxima y lactama derivados del colesterol y diosgenina (1.9 - $50 \mu\text{g/mL}$), realizando diluciones seriadas por 48 h y por triplicado. Los resultados mostraron un efecto dosis dependiente en la mayoría de los compuestos, es decir, a mayor concentración el porcentaje de células cancerígenas es menor. A diferencia de esta tendencia, en **69** no es tan marcada, esto debido a la poca solubilidad del compuesto en el medio a altas concentraciones dificultando así la interacción de

éste con las células. En el ensayo de MTT, el análisis estadístico reveló que los compuestos **69**, **69b**, **70** y **70b** disminuyeron la viabilidad de las células MCF-7 ($P < 0.001$) (**Figura 45**). La tendencia indica que la molécula **69**, la cual posee dos grupos oxima (C-3 y C-6) y un Δ^5 , provoca muerte celular a una menor concentración (3.9 $\mu\text{g/mL}$, 62.6%) que el derivado con un grupo lactama (**70**). Por el contrario, al cambiar de cadena lateral a una tipo espirostánica el efecto de muerte celular se da a la inversa, siendo el grupo lactama **70b** favorecido (3.9 $\mu\text{g/mL}$, 61.9%). Con respecto a la morfología de las células, al comparar el control, el control de DMSO, control positivo y los tratamientos aplicados se evidenció por un lado, que el disolvente empleado (DMSO) no influyó con el daño observado en los tratamientos. Mientras que por otro lado, fue evidente que el H_2O_2 dañó de manera significativa a las células provocando la pérdida de adherencia de las mismas. De manera similar se comportaron las células al ser tratadas con **69**, **69b**, **70** y **70b** mostrando una morfología irregular con fragmentos en el medio de cultivo celular (**Figura 46**).

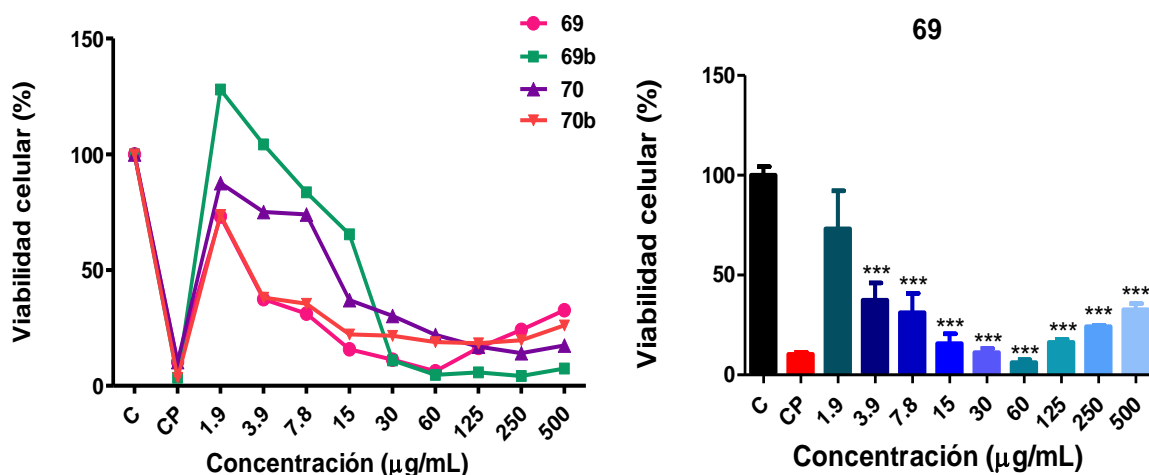


Figura 45. Ensayo de viabilidad de las células cancerosas MCF-7 a diferentes concentraciones de los compuestos **69**, **69b**, **70** y **70b** después de 48 h ($P < 0.001$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD, $***P < 0.001$, $**P < 0.05$, ns = no significativo; comparado con el control (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA)

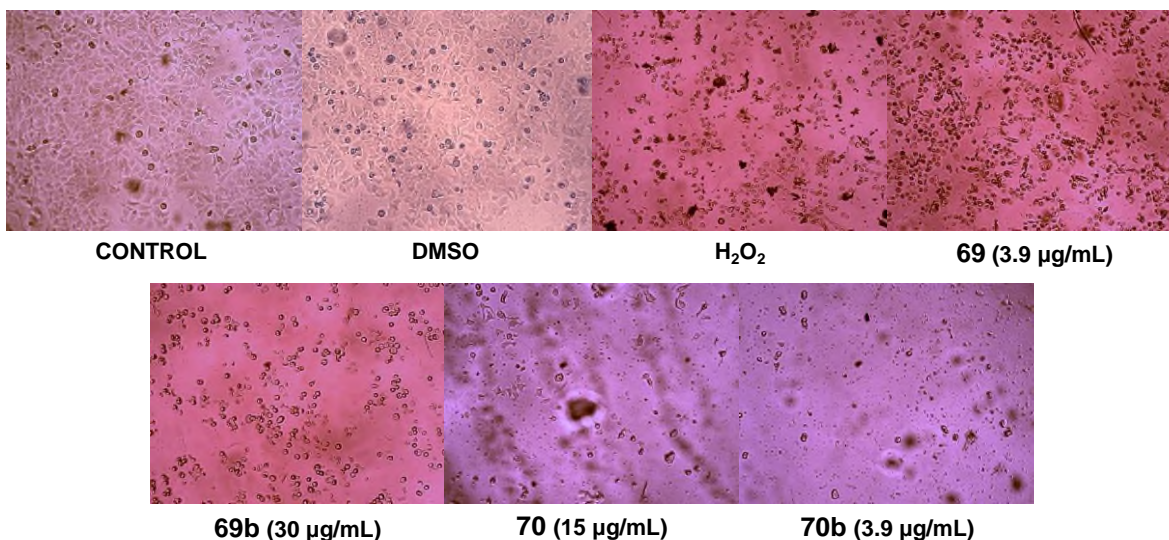


Figura 46. Cambio en la morfología de las células MCF-7 después 48 h en el control, el H₂O₂ y en los tratamientos a las concentraciones indicadas.

Posteriormente, se realizaron ensayos con las células mononucleares obtenidas de muestras sanguíneas humanas incubadas a concentraciones a las cuales los compuestos de interés mostraban un porcentaje de viabilidad bajo (7.8-60 µg/mL), esto con la finalidad de descartar citotoxicidad a dichas concentraciones. El reactivo de MTT, se adicionó a los tratamientos (20 µL) pasado un lapso de 48 h y la lectura a 595 nm en un lapso de 6 a 8 h. Los resultados mostraron que el H₂O₂ provocó un daño estructural en las células normales. Mientras que, los compuestos **69**, **69b**, **70** y **70b** exhibieron altos niveles de viabilidad celular en las células normales ($\geq 50\%$) (**Figura 47**). Por ejemplo, el compuesto **69** tiene una viabilidad de 31.2% en células cancerosas a una concentración de 7.8 µg/mL, mientras que en las células normales tiene una viabilidad del 49.7 %. El mismo comportamiento, se da para **69b** (MCF-7: 30 µg/mL, 11.01%; CMSP: 30 µg/mL, 58.0%), **70** (MCF-7: 15 µg/mL, 37.0%; CMSP: 15 µg/mL, 64.6%) y **70b** (MCF-7: 7.8 µg/mL, 35.5%; CMSP: 7.8 µg/mL, 62.9%). En algunos casos como en la evaluación de **69**, se presentó cristalización del esteroide a concentraciones de 30 µg/mL y 60 µg/mL que interfirieron con la correcta interacción con las células (**Figura 48**).

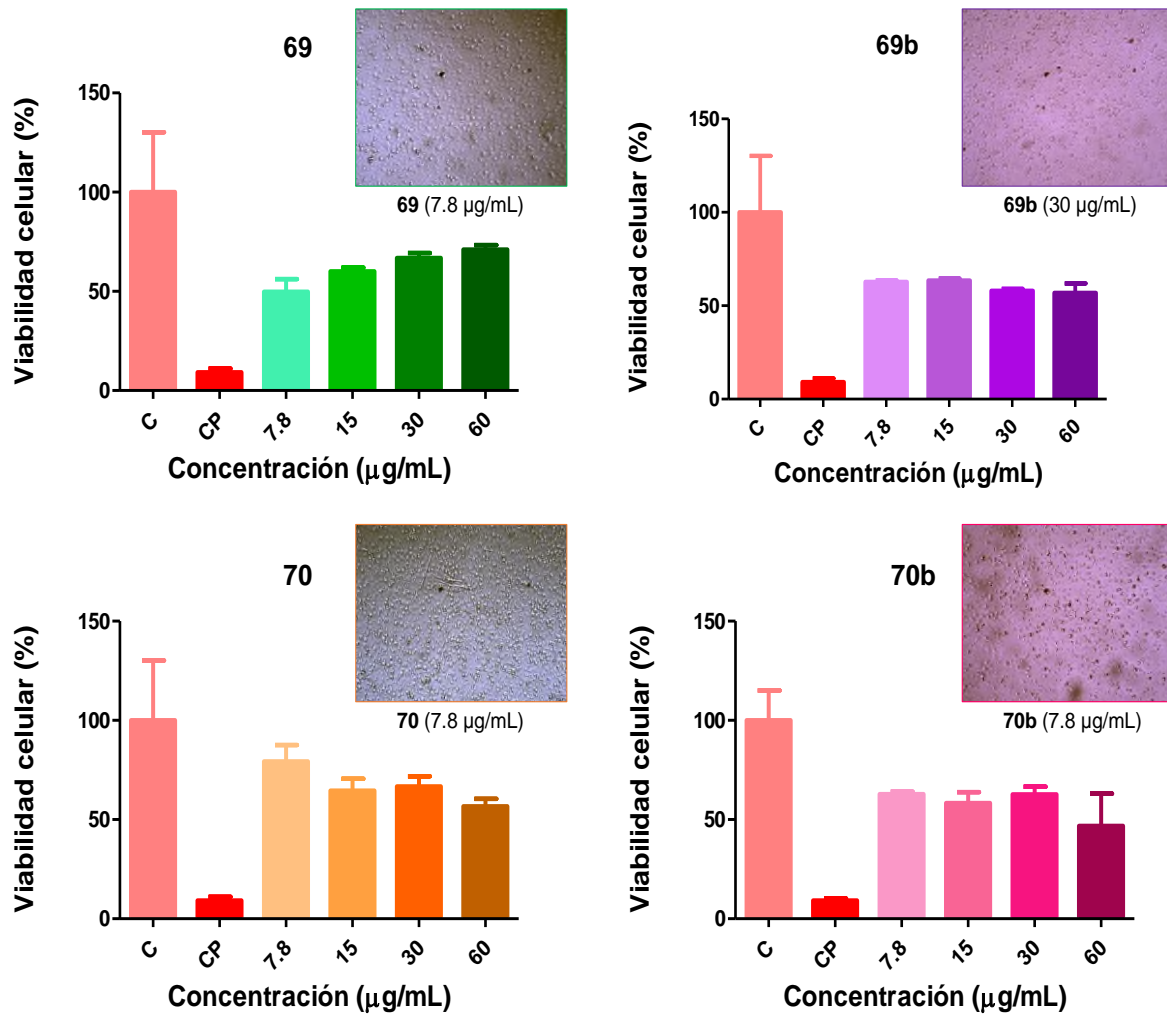


Figura 47. Ensayo de viabilidad de las CMSP a diferentes concentraciones de los compuestos **69**, **69b**, **70** y **70b** después de 48 h ($P < 0.05$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA)

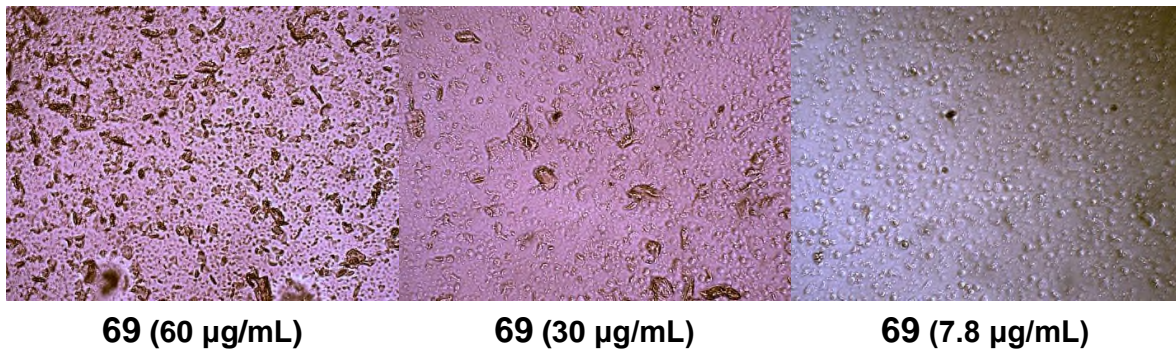


Figura 48. Cambio en la morfología de las CMSP y la precipitación del compuesto **69** a altas concentraciones.

7.2.2.- Evaluación biológica mediante el ensayo por MTT de **71**, **71***, **72**, **73** y **74**

Ahora bien, para este ensayo las células MCF-7 fueron incubadas a diferentes concentraciones en un rango de 0.95 µg/mL-1000 µg/mL, realizando diluciones seriadas a 48 h y por triplicado. Los resultados mostraron un efecto dosis-dependiente en **71***, **72**, **73** y **74**. En particular, con **71** posee variaciones en el efecto que no se relacionan con la dosis del tratamiento dado, es decir, el porcentaje de viabilidad aumenta y disminuye sin importar su concentración. Por otro lado, en esta ruta en específico los compuestos **71*** y **74** mostraron una particularidad y es que a bajas concentraciones (**71***: 15 µg/mL y 30 µg/mL, **74**: 1.9 µg/mL) desarrollaron una proliferación de células MCF-7 (103.9% y 103.0%, 106.8%; respectivamente). Debido a que esta línea celular posee tres receptores nucleares (ER α , PR, GR), existe una relación estrecha entre éstos y las hormonas esteroideas.⁷⁵ Por lo cual, es muy probable que dichos compuestos induzcan la expresión de algunos de los NRs causando el aumento de las células cancerígenas. Específicamente, es mayor la capacidad citotóxica expresada por los compuestos evaluados en esta ruta de síntesis, en donde, se llega a un máximo de actividad con el compuesto **73** (MCF-7: 3.9 µg/mL, 48.25 %), disminuyendo al pasar al grupo lactama **74** (MCF-7: 3.9 µg/mL, 86.67 %) (**Figura 49**). El cambio descrito en las tablas de viabilidad celular vs concentración se ilustra en la **Figura 50** en donde es posible visualizar el desprendimiento que sufren las células MCF-7 de la placa después de aplicados los tratamientos. No obstante, dicho daño no es comparable al sufrido por el H₂O₂, el cual como ya se ha mencionado provoca lisis en la célula vía radicales libres. En el caso de los tratamientos, la morfología podría indicar apoptosis como tipo de muerte celular. Esto es debido a que se observan formas irregulares en el medio (fragmentación celular), lo anterior es similar a lo expuesto a trabajos relacionados con esteroides de tipo hormonal.^{76, 77}

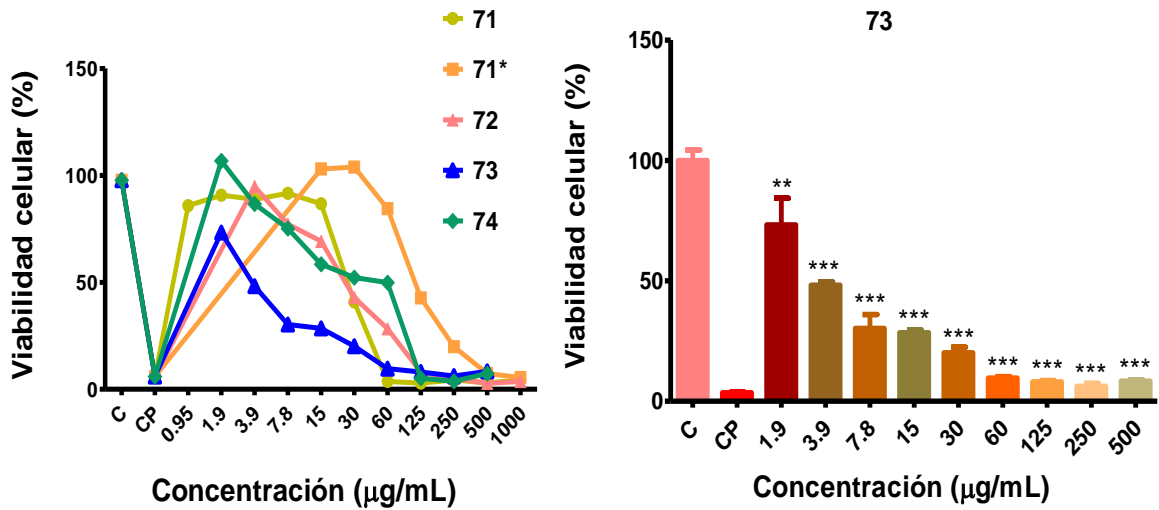


Figura 49. Ensayo de viabilidad de las células cancerosas MCF-7 a diferentes concentraciones de los compuestos **71**, **71***, **72**, **73** y **74** después de 48 h ($P < 0.001$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD, $***P < 0.001$, $**P < 0.05$, ns = no significativo; comparado con el control (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA)

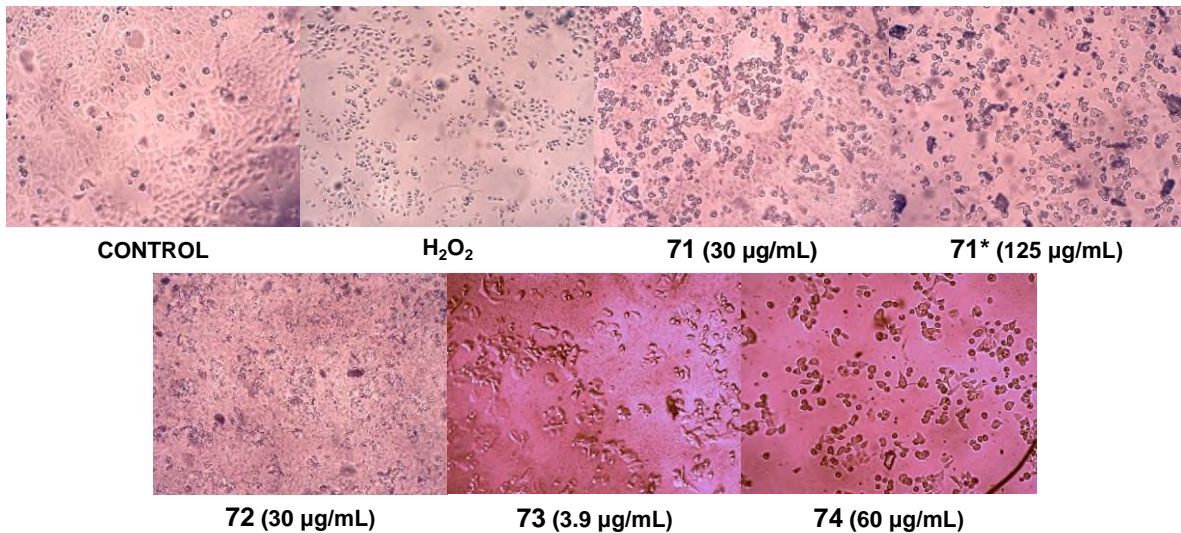



Figura 50. Cambio en la morfología de las células MCF-7 después 48 h en el control, el H_2O_2 y en los tratamientos a las concentraciones indicadas de la ruta 2 de síntesis.

Las células mononucleares se presentaron con las mismas características que en el ensayo de la ruta anterior, realizándose por triplicado y con un periodo de incubación de 48 h. Los resultados mostrados para esta ruta en particular son variados, comenzando con los compuestos **71***, **72** y **74** los cuales muestran un



comportamiento independiente a la dosis administrada. Esto debido posiblemente, a la existencia de diversas células mononucleares en el sistema inmune cuya característica principal y que las diferencian de otras células linfocíticas es que poseen un solo núcleo. Por ejemplo, células T, células B, células NK y monocitos que cumplen diferentes funciones para el sistema inmune diferenciándose en el organismo por dichas funciones. Por ende, la variedad de células mononucleares puede fungir como un determinante para el comportamiento de los compuestos esteroideos. Otra particularidad es lo ocurrido con el compuesto **71**, ya que no se vio afectada la viabilidad de las células mononucleares y, por el contrario, todas las concentraciones indujeron a las células mononucleares a proliferar; indicando un proceso inmunoestimulante (**Figura 51**)⁷⁸. Tal proceso se ha venido desarrollando en los últimos años como una estrategia para el aumento de los mecanismos de defensa naturales.⁷⁹ A pesar de que la mayoría de estos inmunoestimulantes son obtenidos a partir de cepas bacterianas; el resultado obtenido por **71** da la pauta a pensar en compuestos de tipo esterooidal con tal capacidad en el sistema inmunológico. De manera general, los compuestos de esta ruta de síntesis muestran porcentajes de viabilidad aceptables para las CMSP. Específicamente, **73** el cual fue el compuesto con mayor capacidad citotóxica en la línea cancerosa MCF-7, al tomar una concentración de 15 µg/mL se obtuvo una viabilidad de 28.4% y a esta misma concentración en CMSP; la viabilidad fue 84.4%. Por tanto, los compuestos presentan cierta selectividad a células cancerosas y esto denota la importancia de seguir buscando nuevos derivados con estos grupos funcionales.

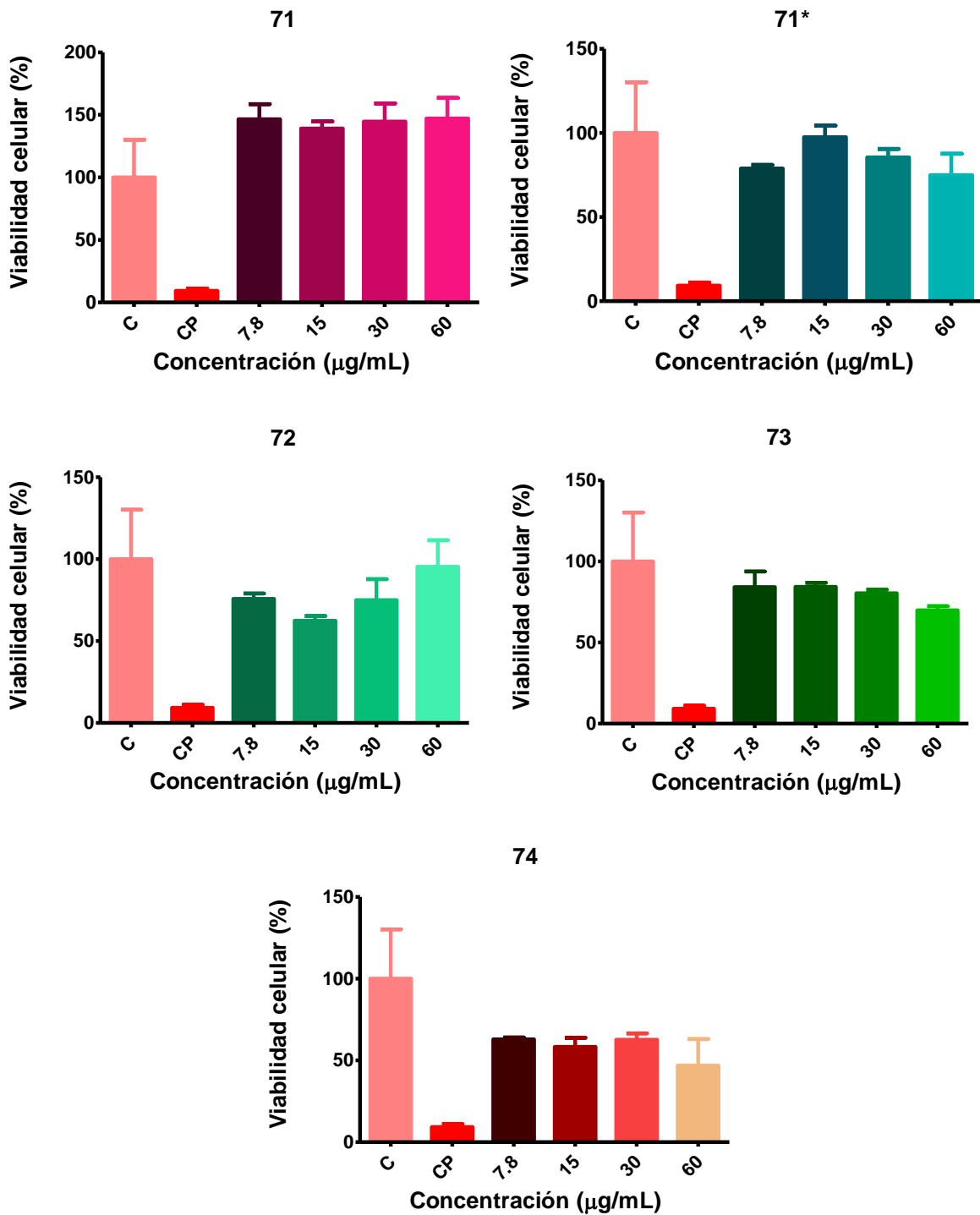


Figura 51. Ensayo de viabilidad de las CMSP a diferentes concentraciones de los compuestos **71**, **71***, **72**, **73** y **74** después de 48 h ($P < 0.05$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA)

7.2.3.- Evaluación biológica mediante el ensayo por MTT de **78**

Para este estudio se utilizaron concentraciones de **78** en un rango de 1.9-500 µg/mL. Los resultados mostraron un efecto dosis dependiente y el análisis estadístico mostró un efecto citotóxico significativo frente a la línea celular de cáncer MCF-7 ($P < 0.001$) (**Figura 52**). Este efecto citotóxico se atribuye a los compuestos oxigenados o también llamados oxистерoides. En 2010, Carvalho y colaboradores realizaron un estudio de esteroides donde los anillos A y B estaban oxigenados ya sea con grupos epoxi, alcoholes y grupos cetónicos. En dicho trabajo, llegaron a la conclusión que los compuestos oxigenados tienen la habilidad de inducir la muerte celular y que en particular la cadena lateral de colesterol potencia el nivel de citotoxicidad.⁸⁰ Bischoff y colaboradores en 2000, evaluaron la actividad citotóxica de los compuestos oxigenados derivados de esteroides y los componentes celulares involucrados para lograr una muerte celular comparándolos con los agentes alquilantes. La hipótesis se basa en que los grupos funcionales con oxígeno modulan las señales en la célula e inducen apoptosis de manera más selectiva que un agente alquilante de una manera más selectiva mediante la sobreexpresión de NR.⁸¹ En este ensayo, se corroboró la actividad de **78** frente a la línea celular MCF-7 ya que logró una inhibición de viabilidad celular del 49.98% a una concentración de 7.8 µg/mL. En relación con esto, se observó la morfología de las células control vs control positivo vs **78**, en donde a diferencia de los anteriores compuestos; **78** mostró un nivel de citotoxicidad menor a muy bajas concentraciones dejando en algunos casos la morfología característica de las células MCF-7 (**Figura 53**).

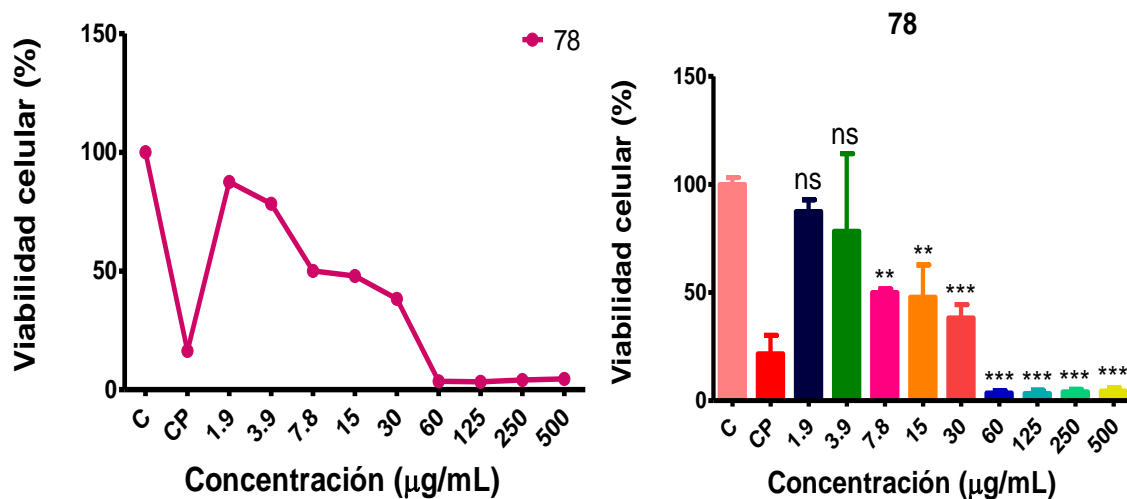


Figura 52. Ensayo de viabilidad de las células cancerosas MCF-7 a diferentes concentraciones del compuesto **78** después de 48 h ($P < 0.001$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA).

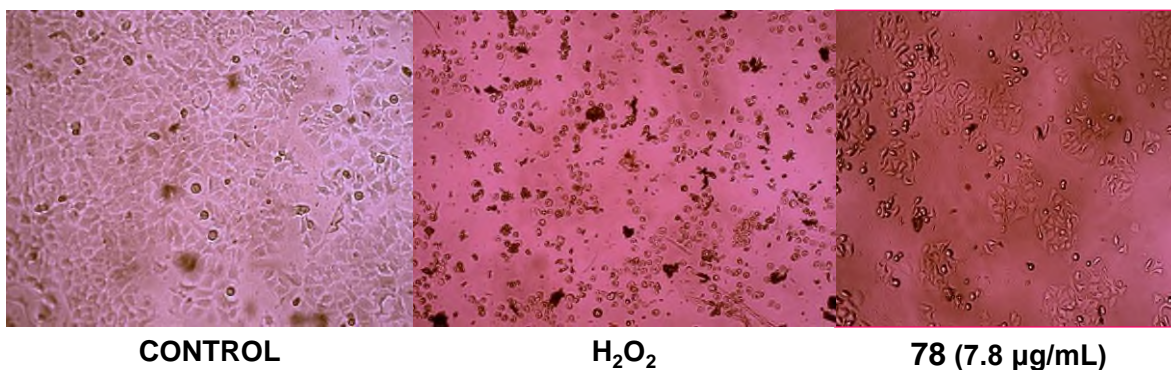


Figura 53. Cambio en la morfología de las células MCF-7 después 48 h en el control, el H₂O₂ y en **78** a una concentración de 7.8 µg/mL.

Las concentraciones tomadas para el ensayo de las células mononucleares se basaron en la viabilidad celular de cáncer MCF-7 (7.8-60 µg/mL), los resultados mostraron una citotoxicidad moderada a leve en un rango de 30.25% a 23.80%. Por ende, al igual que los anteriores compuestos, **78** resultó una molécula selectiva ya que distingue a las células cancerosas MCF-7 de las CMSP (**Figura 54**).

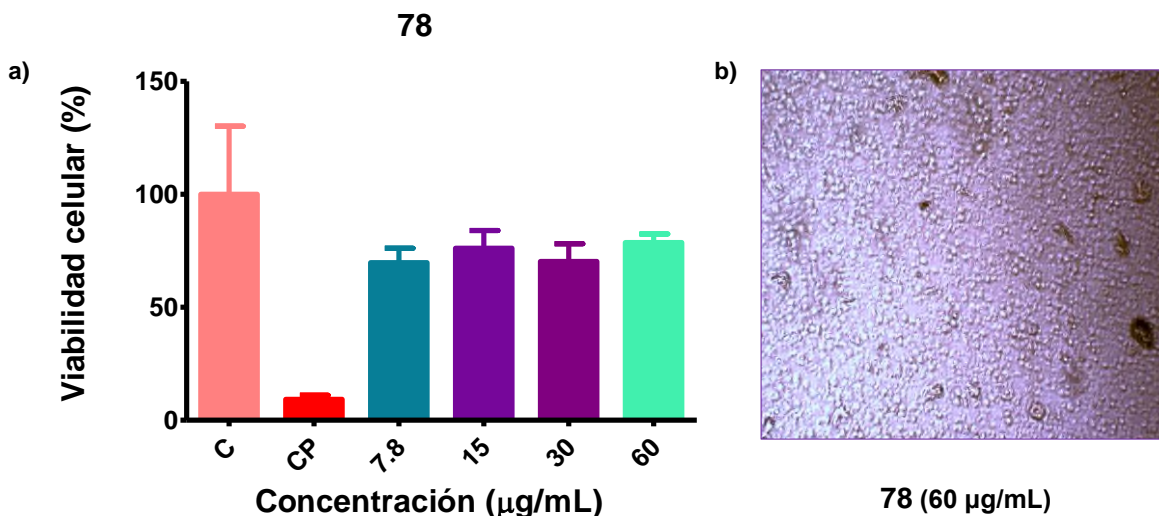


Figura 54. a) Ensayo de viabilidad de las CMSP a diferentes concentraciones del compuesto **78** después de 48 h ($P < 0.001$), mediante el método de MTT. Las gráficas indican SD (datos estadísticos obtenidos por 1-way ANOVA). b) Morfología de las células mononucleares de sangre periférica después 48 h de tratamiento a una concentración de 60 µg/mL.

En la **Tabla 2**, se muestran los resultados de CI_{50} para los 10 compuestos evaluados mediante la técnica de MTT en las líneas celulares MCF-7 y CMSP. Los resultados exhiben que la línea celular de cáncer MCF-7 presentó una mayor sensibilidad frente al grupo oxima. Específicamente, las oximas **69**, **73** y **78** exhibieron los mejores valores de actividad citotóxica siendo de 8.2 µM, 7.9 µM y 25.5 µM, respectivamente. Como se puede observar, el compuesto más activo de este grupo es **73**, el cual se caracteriza por contener un grupo oxima en C-6 y una cadena lateral epoxicolestánica. Dicho comportamiento, concuerda con lo reportado por Thi Ha y colaboradores⁶⁰ en el estudio realizado a esteroides con un grupo hidroxiiimino en C-6 mostrando que exhiben una fuerte citotoxicidad frente a las líneas HeLa, Hep-G2 y T98G. Ahora, comparando las dioximas **69**, **69b** y **78**; se observa que el grupo hidroxilo en C-5 en **78** y la cadena lateral tipo espiroestánica en **69b**, causó una pérdida de la capacidad citotóxica comparándola con **69**. Se observó que al cambiar de grupo funcional oxima a lactama, hubo una pérdida de actividad (**69**: $CI_{50} = 8.2 \mu\text{M}$ vs **70**: $CI_{50} = 33.3 \mu\text{M}$; **73**: $CI_{50} = 7.9 \mu\text{M}$ vs **74**: $CI_{50} = 51.5 \mu\text{M}$), a excepción de **70b**, que tiene una lactama en el anillo A mostrando un CI_{50} de 9.5

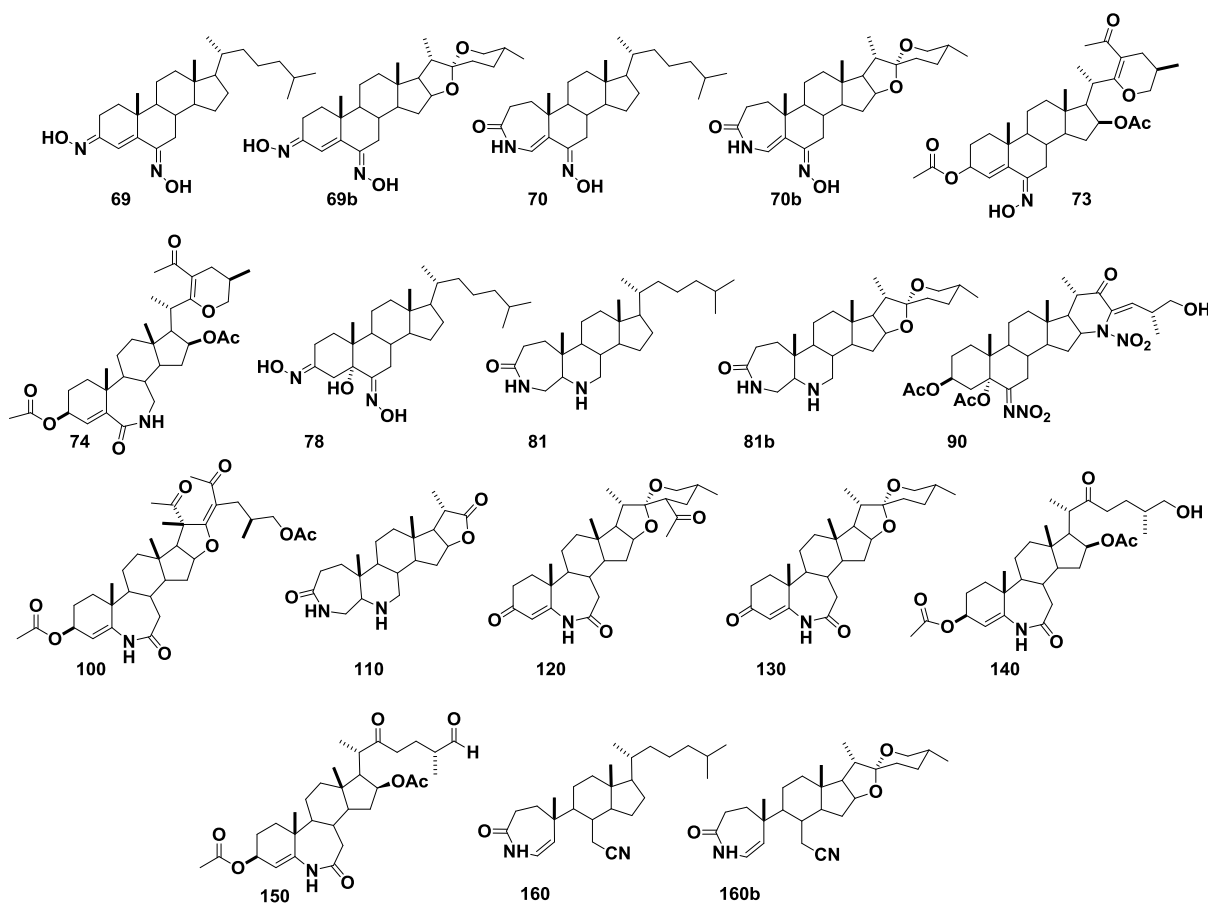
μM . Con base a esto, el grupo lactámico conteniendo una cadena lateral de diosgenina fue fundamental para aumentar la citotoxicidad

Tabla 2. Actividad citotóxica (μM) de los compuestos sintetizados frente a las líneas MCF-7 y CMSP.

Cl₅₀ (μM)	Línea celular	
	MCF-7	Mononucleares
69	8.2	>100
69b	41.6	84.5
70	33.3	>100
70b	9.5	>100
71	45.2	>100
71*	224.4	>100
72	37.4	>100
73	7.9	>100
74	51.5	52.5
78	25.5	>100

7.3.- Análisis de acoplamiento molecular

Se realizó el análisis computacional con una variedad de compuestos azaesteroidales y de igual manera los sintetizados en este trabajo (**69**, **69b**, **70**, **70b**, **74**, **78**, **81**, **81b**, **90**, **110**, **120**, **130**, **140** y **150**), con el propósito de evaluar su posible actividad como inhibidores de las enzimas 5β -reductasa (PDB ID: 3BUR), 17β -HSD1 (PDB ID: 3HB5), CYP19A1 (PDB ID: 3S79) y CYP17A1 (PDB ID: 3SWZ). Esto, debido a que en la literatura está descrita la actividad biológica en este sentido de diversos esteroides nitrogenados. Cabe señalar que, la enzima íntimamente relacionada con la hiperplasia benigna prostática y el cáncer de próstata es la enzima 5α -reductasa.^{73, 82} Sin embargo, dicha enzima al momento de realizar los acoplamientos no se encontraba en la base de datos del programa Protein Data Bank. Es por lo que, se decidió por un homólogo de éste, la enzima 5β -reductasa.



7.3.1- Validación del sitio activo en la enzima 5 β -reductasa

La enzima 5 β -reductasa se validó con el ligando cristalizado (testosterona), los cofactores de glicerol (Gol) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP). Las interacciones más cercanas observadas para el ligando cristalizado son tres residuos de aminoácidos (Tyr132: puente de hidrógeno, Ser225: alquílica y Asn227: alquílica). Por tanto, se procedió a realizar la validación con las coordenadas de cada uno de estos residuos obteniendo valores de afinidad relativamente buenos con el residuo Tyr132A y el oxígeno como átomo a utilizar en el centro de la caja, adquiriendo las coordenadas cartesianas XYZ. Una vez identificado el residuo (132A Tyr O), se copiaron las coordenadas al programa AutoDock Vina para realizar la validación consiguiendo las coordenadas en X= 21.726, Y=-18.074 y Z =-13.391 probando en tamaños de caja en x, y, z de 10 Å, 12.5 Å, 15 Å, 17 Å, 20 Å, 25 Å, 30 Å, 40Å, 50 Å y 60 Å. El valor de RMSD es un parámetro utilizado para medir un alineamiento estructural, el cual está basado en la comparación de la forma tridimensional de una molécula. Por ende, los valores de RMSD grandes aluden a diferencias entre las estructuras comparadas y define una incorrecta validación. Se obtuvo que en una caja de 10 Å y un total de 1000 poses (formas en que se coloca en el sitio activo, recordando que es un ligando flexible, moviendo todos los enlaces rotables, para generar una pose), se obtiene un valor de energía de afinidad de -4.5 Kcal/mol y un valor de RMSD (Root Mean Square Deviation) =0 Å (con un total de 21 átomos alineados). (**Tabla 3**).

Tabla 3. Datos de energía y valores de RMSD de la enzima 5 β -reductasa (residuo de Tyr132A/O) y su ligando cristalizado (testosterona).

VALOR DE RMSD/3BUR/TYR132A/O						
Modos						
No. de caja	10	100	500	1000	1000R2	1000R3
10	1.69	0	0	0	0	0.001
12.5	3.162	3.005	2.945	2.613		
15	2.162	3.224	2.97	3.117		
17	2.615	3.224	2.872	2.831		
20	2.654	2.471	2.526	2.298		
25	1.999	2.427	2.427	2.637		
30	0.741	2.256	1.705	2.257		
40	3.191	3.193	3.192	3.191		
50	3.205	3.201	3.204	2.659		
60	3.199	3.213	3.209	3.2		

VALOR DE ENERGÍA (Kcal/mol)/3BUR/TYR132A/O						
Modos						
No. de caja	10	100	500	1000	1000R2	1000R3
10	-0.7	-4.5	-4.5	-4.5	-4.5	-4.5
12.5	-4.8	-4.8	-4.8	-4.8		
15	-5.2	-5.2	-5.2	-5.2		
17	-5.6	-5.6	-5.6	-5.6		
20	-5.8	-5.8	-5.8	-5.8		
25	-5.8	-6.2	-6.6	-6.6		
30	-12.8	-12.8	-12.8	-12.8		
40	-12.8	-12.8	-12.8	-12.8		
50	-12.8	-12.8	-12.8	-12.8		
60	-12.8	-12.8	-12.8	-12.8		

En la **Figura 55**, se muestra la optimización del acoplamiento molecular entre el ligando cristalizado de la enzima (verde) y el calculado para la validación del sitio activo (azul) utilizando un número de caja de 10 Å y 1000 poses, observando la completa alineación de los átomos y validando con ello la cavidad de la enzima.

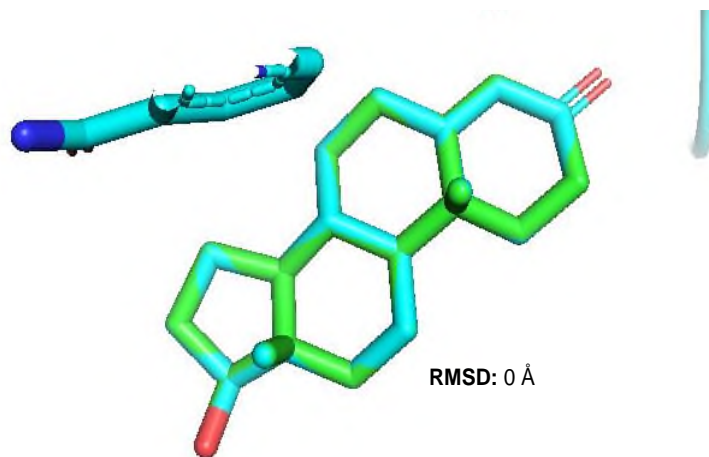


Figura 55. Cálculo de validación del algoritmo de acoplamiento molecular (Presentación del cálculo de RMSD, cálculo realizado en el programa PyMOL molecular Graphics System 2016).

7.3.1.1.- Acoplamiento molecular de la enzima 5 β -reductasa con los ligandos azaesteroidales

Previamente a un acoplamiento, es fundamental buscar la estructura más estable con la finalidad de obtener un mínimo de energía local conformacional y espacial que utilicen estas variaciones en los resultados del acoplamiento. Para ello, se realizó una optimización geométrica encontrando el mínimo de energía (energía Hartree), para cada uno de los compuestos y/o ligandos, teniendo como ejemplo el compuesto **81** (**Figura 56**). Posterior a esto, se configuró el formato AutoDock Vina con las coordenadas encontradas en la validación y se procedió al acoplamiento de la enzima (sin el ligando cristalizado), más los 16 compuestos diseñados en este trabajo; ambos en formato pbdqt (**Tabla 4**). Los resultados muestran una baja afinidad con la enzima, destacando entre todos ellos a los compuestos **70** (11.3 Kcal/mol), **78** (12 Kcal/mol), **81** (5.3 Kcal/mol) y **110** (11.6 Kcal/mol). La similitud estructural que guardan estos ligandos consiste en que son poco voluminosos en comparación con el resto y específicamente, **70**, **78** y **81** poseen una cadena lateral tipo colestánica. Caso contrario, **90** (133 Kcal/mol) al poseer tantos enlaces rotables, gran volumen y, además poseer una cadena lateral tipo espirostánica; influyó en un valor alto de energía. El ligando **81**, quien obtuvo el valor de afinidad más bajo, sólo logró interactuar con dos únicos y principales aminoácidos (Pro133 y Arg134) (**Figura 57**). Las interacciones hidrofóbicas se producen al existir un plegamiento

de polipéptidos dando como resultado que los radicales hidrófobos se acerquen debido a la exclusión de moléculas de agua; dando así enlaces no covalentes. En 2012, Anugolu y colaboradores⁸³ realizaron un estudio de acoplamiento molecular de azol-derivados con la enzima en cuestión destacando que los sustituyentes donadores y aceptores de hidrógeno de carácter estéricos, electrostáticos e hidrofóbicos juegan un papel significativo en el diseño de una actividad anticancerígena novedosa, potente y selectiva de ciertos compuestos. Además de esto, describen que la presencia de un enlace NH del ligando con el OH del aminoácido Ser220 es fundamental para potenciar una actividad. Además, Di Costanzo y colaboradores⁸⁴ en 2008, realizaron un estudio de la enzima 5 β -reductasa y su implicación en catálisis aludiendo que, las interacciones con Tyr58 y Glu120 son importantes en el proceso de reducción del doble enlace carbono-carbono presente en C-4 sustancial para el proceso de activación de andrógenos. En consecuencia, los ligandos oxima y lactámicos al no poseer ningún tipo de interacción con alguno de los aminoácidos descritos en la literatura, no lograron una correcta afinidad con la enzima añadiendo que ninguno de los ligandos se logró posicionar en la cavidad de la enzima ni tener alguna interacción con los co-factores, lo que restó afinidad.

Tabla 4. Interacciones entre la enzima 5 β -reductasa y los ligandos **69-160b**.

Molécula	G (Kcal/mol)	Donador	Receptor	Distancia (Å)	Tipo
69	14.1	:LIG1:H	A:ARG134:O	2.81	Puente de hidrógeno
		A:TYR132	:LIG1	4.30	Pi-Alquílico
		A:TRP140	:LIG1:C	5.34	Pi-Alquílico
		:LIG1:C	A:GLU130:OE2	1.27	Desfavorable
69b	116.6	:LIG1:N	A:TYR132:CD1	1.47	Desfavorable
		:LIG1:O	A:PRO133:CA	1.97	Desfavorable
		A:TYR132	:LIG1	5.05	Pi-Alquílico
70	6.5	:LIG1:C	A:ARG134:O	2.22	Desfavorable
		:LIG1:N	A:GLU130:OE2	5.04	Intercambio de cargas

		A:GOL331:O 2	:LIG1:O	2.88	Puente de hidrógeno
70b	60.1	:LIG1:N	A:GLU130:OE2	5.34	Intercambio de cargas
		:LIG1:H	A:GOL331:O2	1.74	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	A:TYR132:O	3.66	Enlace carbono- hidrógeno
73	50.6	:LIG1:C	A:TYR132:CD1	1.96	Desfavorable
		A:GOL331:O 2	:LIG1:O	1.30	Desfavorable, Puente de hidrógeno
		:LIG1:H	A:GOL331:O3	3.08	Puente de hidrógeno
74	40.4	:LIG1:C	A:ARG134:HN	1.26	Desfavorable
		A:LYS126:N	:LIG1:O	2.15	Puente de hidrógeno
		A:TYR132	:LIG1:C	5.02	Pi-Alquílico
78	12	A:GOL331:O	:LIG1:O	3.30	Puente de hidrógeno
		A:GOL331:O	:LIG1:O	2.57	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C21	A:ARG134:O	2.14	Desfavorable
81	5.3	:LIG1:C	A:PRO133	4.63	Alquílico
		:LIG1:C	A:PRO133	3.59	Alquílico
		:LIG1:C	A:ARG134	4.22	Alquílico
81b	88.9	:LIG1:O	A:LYS126:NZ	2.27	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	A:TYR132	3.20	Pi-Sigma
		:LIG1	A:ARG134	5.26	Alquílico
90	131	:LIG1:C	A:TYR132	4.02	Pi-Alquílico
		A:LEU141:N	:LIG1:O	2.93	Puente de hidrógeno
		A:GOL331:O	:LIG1:O	3.22	Desfavorable

100	73.1	:LIG1:C	A:GLU130:OE2	2.72	Enlace carbono- hidrógeno
		:LIG1:C	A:PRO133	4.24	Alquílico
		:LIG1:C	A:TRP140	5.38	Pi-alquílico
110	11.6	:LIG1:O	A:GLU136:N	2.80	Puente de hidrógeno
		:LIG1:O	A:GOL331:O3	2.66	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	A:TYR132	4.99	Pi-Alquílico
120	70.7	:LIG1:C	A:PRO133:CB	2.23	Desfavorable
		A:ARG134:N	:LIG1:O	1.93	Desfavorable
		A:PRO133:C	:LIG1:O	2.39	Enlace carbono- hidrógeno
130	37.1	:LIG1:C	A:GOL331:O2	2.19	Desfavorable
		:LIG1:C	A:TYR132	2.92	Pi-Sigma
140	36.7	A:LYS126:N	:LIG1:O	2.50	Puente de hidrógeno
		:LIG1:H	A:ARG134:O	2.08	Puente de hidrógeno
		A:TYR132:C	:LIG1:C	1.93	Desfavorable
150	24.2	A:LYS126:N	:LIG1:O	2.50	Puente de hidrógeno
		A:GLY138:C	:LIG1:O	3.20	Enlace carbono- hidrógeno
		A:GLU130:O	:LIG1:C	1.84	Desfavorable
160	11.3	:LIG1:C	A:TYR132:O	2.09	Desfavorable
		A:LYS126:N Z	:LIG1:O	3.23	Puente de hidrógeno
160b	69.5	:LIG1:N	A:ARG134:O	1.46	Desfavorable
		:LIG1:C	A:ARG134:NH 2	2.15	Desfavorable
		A:LYS126:N Z	:LIG1:O	3.38	Puente de hidrógeno

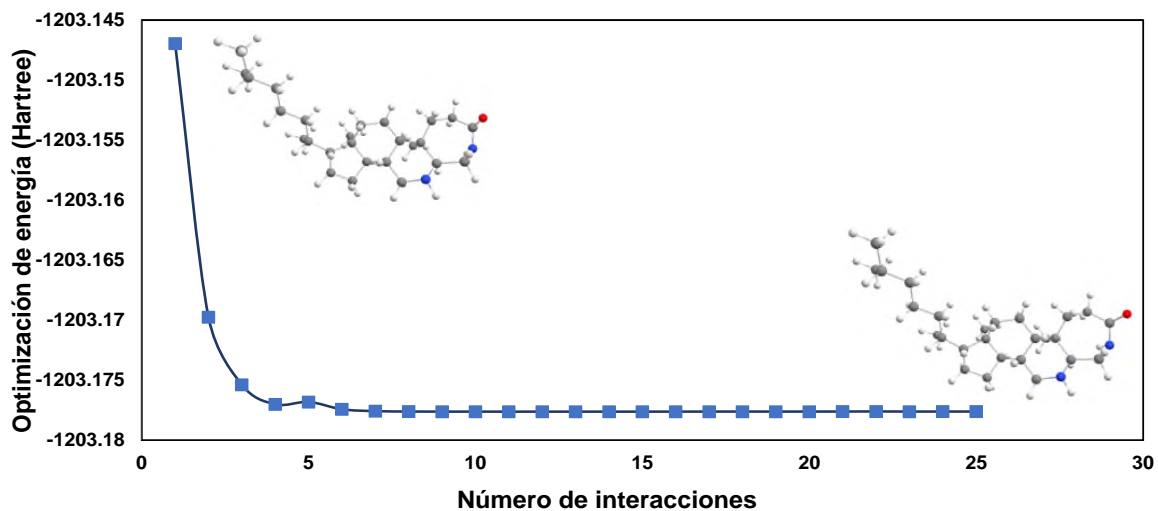


Figura 56. Optimización de energía para el ligando 81.

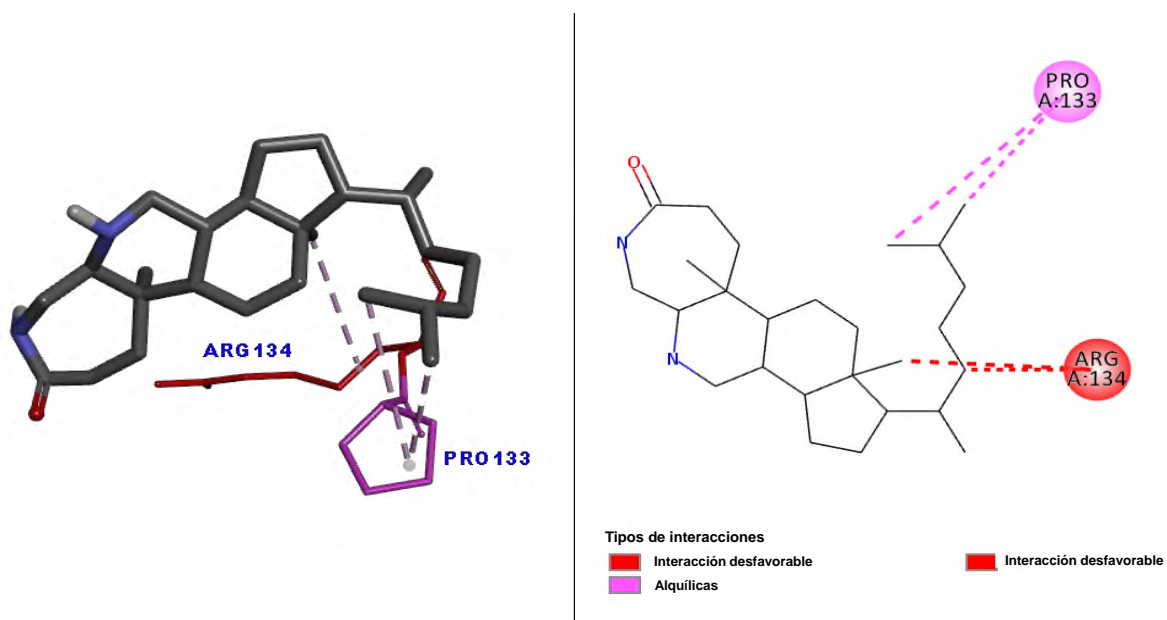


Figura 57. Acoplamiento del ligando 81 con el sitio activo de la enzima 5 β -reductasa visualizada en Discovery Studio (<https://www.3ds.com/>).

7.3.2.- Validación del sitio activo en la enzima 17 β -HSD1

Ahora bien, la enzima de 17 β -HSD tipo I seleccionada del Protein Data Bank con código 3HB5, se validó teniendo como ligando cristalizado al E₂B (variante del estradiol), ocupando las coordenadas del residuo Asn125X. El nitrógeno, funge como el átomo central de la caja del cual se obtuvieron las coordenadas cartesianas XYZ. Se definieron los valores en X=3.939, Y=3.155 y Z=-13.191 y mediante el programa AutoDock Vina, se validó el sitio activo de la enzima con su ligando cristalizado. Se probaron cajas de tamaño 10, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 con número de 10, 100, 500 y 1000 poses. En comparación con la enzima anteriormente descrita, la 17 β -HSD obtuvo valores de RMSD <2 Å en todos los parámetros empleados. Entonces debido a los resultados descritos, se optó por una caja de 25 con un número de 1000 poses para el acoplamiento, el cual, se realizó por triplicado para corroborar los datos de RMSD y energía (**Tabla 5**).

Tabla 5. Datos de energía y valores de RMSD de la enzima 17 β -HSD (residuo de Asn152/N) y su ligando cristalizado (E₂B).

VALOR DE RMSD/3HB5/ASN152X/N						
No. de caja	Modos					
	10	100	500	1000	1000R2	1000R3
10	1.586	3.958	0	3.935		
20	0.077	0.084	0.083	0.001		
25	0.092	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
30	3.713	0.001	0.001	0.001		
40	3.376	0.091	0.001	0.001		
50	4.263	0.088	0.087	0.006		
60	0.077	0.087	0.084	0.088		

VALOR DE ENERGÍA (Kcal/mol)/3HB5/ASN152X/N						
No. de caja	Modos					
	10	100	500	1000	1000R2	1000R3
10	98.3	95.8	88.1	95.4		
20	-13.4	-13.4	-13.4	-13.4		
25	-13.4	-13.4	-13.4	-13.4	-13.4	-13.4
30	-10.6	-13.4	-13.4	-13.4		
40	-10.6	-13.4	-13.4	-13.4		
50	-9	-13.4	-13.4	-13.4		
60	-13.4	-13.4	-13.4	-13.4		

La validación del sitio activo se realizó con el ligando cristalizado de la enzima (verde) y el calculado para la validación del sitio activo (azul), obteniendo un valor de RMSD de 0.001 (con un total de 21 átomos alineados) (**Figura 58**). Se obtuvo una energía máxima de afinidad de -13.4 kcal/mol indicando con ello un proceso espontáneo. Por tanto, se considera como exitosa la optimización del acoplamiento molecular entre el ligando cristalizado de la enzima y el que fue calculado para la validación del sitio activo.

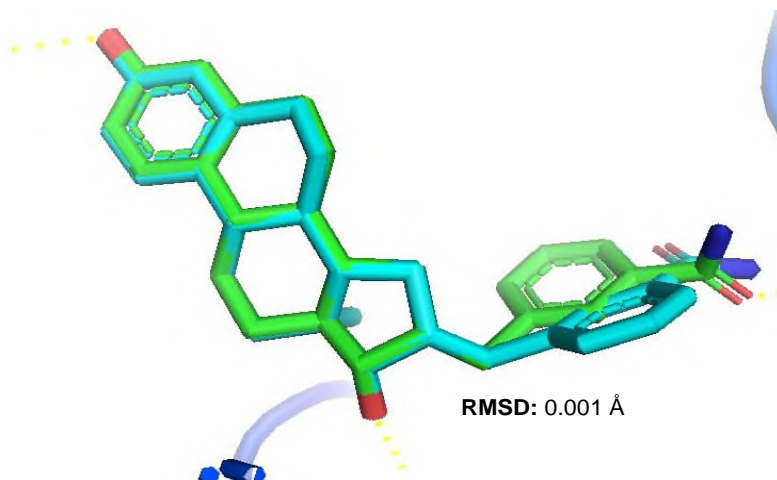


Figura 58. Cálculo de validación del algoritmo de acoplamiento molecular (Presentación del cálculo de RMSD, cálculo realizado en software The PyMOL molecular Graphics System 2016) del ligando cristalizado.

7.3.2.1.- Acoplamiento molecular de la enzima 17β -HSD con los ligandos azaesteroidales

La enzima 17β -HSD, está involucrada en la síntesis de hormonas estrogénicas y androgénicas y de acuerdo con lo descrito por Poirier⁸⁵ ha sido establecida como blanco terapéutico en el cáncer de seno dependiente de estrógenos. El ligando cristalizado derivado del estradiol posee la aromaticidad característica de los estrógenos y un mayor volumen haciendo que la cavidad de la enzima donde ocurre el acoplamiento sea mayor. En 2010, Möller y colaboradores⁸⁶ mencionaron que las modificaciones del andamio esteroideo en las posiciones 6, 16 y 17 mediante compuestos sulfonados, bencénicos o con átomos de flúor les proporcionan a los ligandos la capacidad de ser inhibidores efectivos de la enzima 17β -HSD. No obstante, los ligandos empleados en el acoplamiento a pesar de no mostrar tales

características obtuvieron valores cercanos al valor de energía del ligando cristalizado (-13.4 Kcal/mol). Tal es el caso de los ligandos **81** (9.9 Kcal/mol), **120** (-9.1 Kcal/mol), **160** (-9.0 Kcal/mol) y **160b** (-9.4 Kcal/mol) (**Tabla 6**). Cabe destacar que todos los ligandos utilizados presentaron afinidad con la enzima, sin embargo el compuesto **81** presentó la energía de afinidad más baja y una constante de ionización de 5.42×10^{-8} . Las interacciones que se destacan mediante el programa Discovery Studio son con Met193, quien posee una interacción de tipo puente de hidrógeno dado por uno de los protones ácidos del carbono alfa al grupo carboxilo del aminoácido y el átomo de oxígeno del grupo lactama. También, con el cofactor NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, por sus siglas en inglés) y el protón del grupo amida. De acuerdo con Mazumdar y colaboradores,⁵⁰ un aminoácido importante es Tyr155 que forma enlaces π - π con el anillo de bencilamida e interacciona con el grupo OH en C-3 del E₂B proporcionando estabilidad al complejo ligando-receptor. Así también, se reporta que la presencia de His221 es clave para la reorganización y estabilización del complejo.⁸⁷ En la mayoría de los casos, ambos o uno de los residuos de aminoácidos (Tyr155, Hiss221) están presentes en las interacciones provocando una mayor afinidad y estabilidad en el complejo ligando-receptor (**Figura 59**).

Tabla 6. Interacciones entre la enzima 17 β -HSD y los ligandos **69-160b**.

Molécula	G (Kcal/mol)	Donador	Receptor	Distancia (Å)	Tipo
69	-7.6	:LIG1:C	X:PHE151	3.66	Pi-sigma
		X:PRO150	:LIG1	4.79	Alquílico
69b	-7.8	:LIG1:H	X:LEU149:O	2.12	Puente de hidrógeno
		X:ASP153:CA	:LIG1:O	3.54	Enlace carbono-hidrógeno
		:LIG1:H	X:LEU149:N	2.51	Desfavorable
70	-8.1	:LIG1:N	X:GLU282:OE1	3.52	Intercambio de cargas

		X:HIS221:ND1	:LIG1:O	2.89	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	X:TYR155	3.97	Pi-Sigma
70b	-8.8	:LIG1:H	X:GLU100:OE2	2.41	Puente salino, Intercambio de cargas
		:LIG1:H	X:GLY97:O	2.82	Puente de hidrógeno
		:LIG1:H	X:ASP153:OD2	2.07	Puente de hidrógeno
73	-8.0	:LIG1:C	X:VAL276	3.87	Alquílico
		X:PHE151	:LIG1:C	4.33	Pi-alquílico
74	-7.5	X:PRO150:CD	:LIG1:O	3.34	Enlace carbono-hidrógeno
		X:PHE151	:LIG1:C	4.04	Pi-alquílico
78	-7.9	:LIG1:C	X:PRO150	3.65	Alquílico
		:LIG1:C	X:ARG214	3.75	Alquílico
		X:PHE151	:LIG1:C	4.05	Pi-alquílico
81	-9.9	:LIG1:H	X:MET193:CA	3.54	Enlace carbono-hidrógeno
		:LIG1:H	X:NAP360:O7N	2.70	Puente de hidrógeno
		X:TYR155	:LIG1:C	5.39	Pi-alquílico
81b	-8.0	:LIG1:C	X:HIS280:NE2	3.75	Enlace carbono-hidrógeno
		X:ARG214:NE	:LIG1:H	2.22	Desfavorable
		X:PHE151	:LIG1:C	3.97	Pi-alquílico
90	-6.7	:LIG1:H	:LIG1:O	2.33	Puente de hidrogeno
		:LIG1:C	X:PHE151	3.55	Pi-Sigma
		X:HIS280	:LIG1	4.70	Pi-alquílico

100	-7.7	X:GLY148:CA	:LIG1:O	3.04	Enlace carbono- hidrógeno
		:LIG1:C	X:ASP153:O	3.56	Enlace carbono- hidrógeno
		:LIG1:C	X:PHE160	3.80	Pi-Sigma
110	-8.4	X:GLY148:CA	:LIG1:O	3.63	Enlace carbono- hidrógeno
		X:THR211:CA	:LIG1:O	3.44	Enlace carbono- hidrógeno
		X:PRO150	:LIG1	4.64	Alquílico
120	-9.1	:LIG1	X:PRO150	4.46	Alquílico
		X:PHE284	:LIG1:C	4.13	Alquílico
130	-8.7	X:VAL276	:LIG1	4.60	Alquílico
		X:HIS280	:LIG1:C	5.16	Pi-alquílico
140	-7.3	X:LEU149:N	:LIG1:O	3.07	Puente de hidrógeno
		X:THR211:OG1	:LIG1:O	3.27	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	X:ARG214	4.10	Alquílico
150	-6.8	X:HIS280:CD2	:LIG1:O	3.37243	Enlace carbono- hidrógeno
		:LIG1:C	X:PHE151	3.35366	Pi-Sigma
		:LIG1:C	X:PRO98	4.7703	Alquílico
160	-9.0	X:TYR155:O H	:LIG1:N	2.86	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	X:MET147	4.91	Alquílico
160b	-9.4	:LIG1:H	X:MET147:SD	3.08	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	X:PHE259	3.53	Pi-Sigma
		:LIG1:C	X:VAL196	3.93	Alquílico

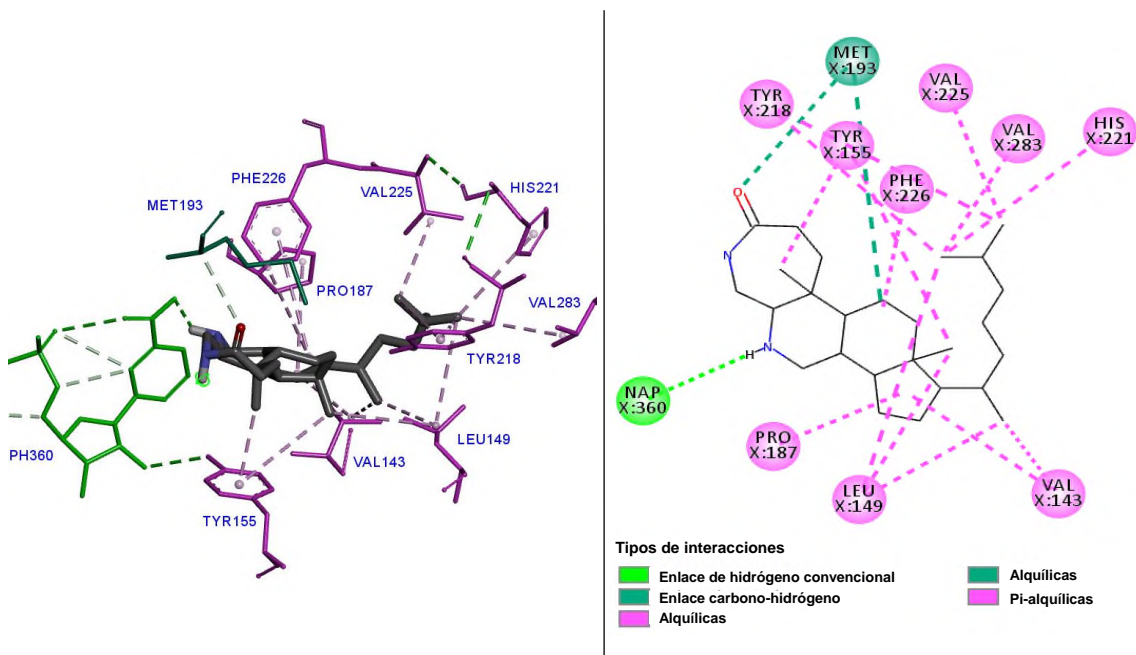


Figura 59. Acoplamiento del ligando **81** con el sitio activo de la enzima 17β -HSD visualizada en Discovery Studio (<https://www.3ds.com/>).

7.3.3- Validación del sitio activo en la enzima CYP19A1

La producción de estrógenos en el ser humano es mediada por una enzima que pertenece al citocromo P450, llamada aromatasa, la cual realiza la conversión de andrógenos a estrógenos por medio de una aromatización del anillo A. Es por lo que, la inhibición de dicha enzima es una de las técnicas empleadas para evitar niveles altos de estrógenos en el cuerpo, la utilizada en este trabajo fue extraída del Protein Data Bank con código PDB: 3S79. La validación de dicha enzima se logró teniendo como ligando cristalizado a la androstenediona (ASD). La androstenediona cristalizada obtenida en 2D posee una única interacción (Met374A: puente de hidrógeno), debido a esto, se realizó la búsqueda de las coordenadas con ese único residuo aminoacídico teniendo como átomo central al hidrógeno del grupo amino. Las coordenadas en X= 84.440, Y= 60.863 y Z= 42.608 se corrieron mediante el programa AutoDock Vina obteniendo así los valores mostrados en la **Tabla 7**. El mejor valor de RMSD y energía fueron 0 Å y -13.2 kcal/mol, respectivamente. Estos valores se encontraron para una caja de 30 y un número de 1000 poses, cómo en

los casos anteriores se realizó por triplicado para así corroborar una adecuada elección de los parámetros en el acoplamiento molecular.

Tabla 7. Datos de energía y valores de RMSD de la enzima CYP19A1 (residuo de Met374/NH) y su ligando cristalizado (ASD).

VALOR DE RMSD/3S79/NH						
Modos						
No. de caja	10	100	500	1000	1000R2	1000R3
10	1.116	2.764	2.533	2.867		
20	2.879	2.899	2.901	2.896		
25	0.001	0	0.001	0.001		
30	0	0.001	0	0	0	0
40	2.264	0.001	0	0		
50	2.617	0.001	0.001	0.001		
60	2.779	0	0.001	0		

VALOR DE ENERGÍA (Kcal/mol)/3S79/NH						
Modos						
No. de caja	10	100	500	1000	1000R2	1000R3
10	52.5	48.8	53.1	49.9		
20	-9.3	-9.3	-9.3	-9.3		
25	-13.1	-13.1	-13.1	-13.2		
30	-13.1	-13.1	-13.2	-13.1	-13.2	-13.2
40	-9	-13.1	-13.1	-13.1		
50	-9.1	-13.1	-13.2	-13.1		
60	-8.1	-13.2	-13.1	-13.2		

A pesar de los resultados, al acoplar los ligandos con la enzima CYP19A1, estos quedaban fuera de los límites marcados. Por tal motivo, se optó por manejar un límite de caja de 25. Esto debido a que los valores de energía y RMSD fueron aceptables y con poco margen de desviación, tanto en la caja 25 como en la 30 se observa una completa alineación de los átomos del ligando cristalizado y del calculado (**Figura 60**).

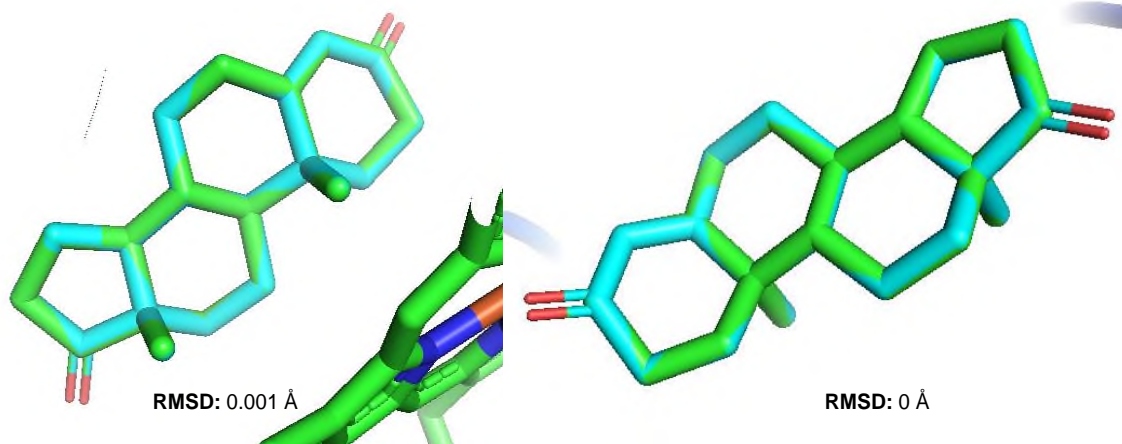


Figura 60. Cálculo de validación del algoritmo de acoplamiento molecular del ligando cristalizado en una caja de 25 (izquierda) y una caja de 30 (derecha) (Presentación del cálculo de RMSD, cálculo realizado en el programa PyMOL molecular Graphics System 2016).

7.3.3.1.- Acoplamiento molecular de la enzima CYP19A1 con los ligandos azaesteroidales

En la literatura, los compuestos que poseen una potente actividad inhibitoria frente a la enzima CYP19A1 es el exemestano (-11.30 kcal/mol), siguiendo con androstendiona (-11.04 kcal/mol).⁸⁸ Exhibiendo que, algunos grupos funcionales con nitrógeno generalmente arrojan múltiples enlaces rotables y exhiben un número mayor de conformaciones que provoca energías de unión en la cavidad enzimática positivas. Por el contrario, los andamios esteroideos con grupos funcionales poco rotables tienen poca movilidad y una sola conformación para poder interactuar en la cavidad.⁵¹ Además, se ha reportado la síntesis de compuestos 16,17-seco-16,17-dinitrilos con capacidad inhibitoria promisorio frente a CYP19A1 (PDB ID: 3EQM), alcanzando valores de afinidad de hasta -11.20 Kcal/mol. Esta capacidad inhibitoria se lo atribuyen a la interacción con el grupo hemo de la proteína y a los grupos nitrilo de los ligandos que poseen una capacidad singular para formar contactos polares con múltiples grupos funcionales de la enzima.⁸⁹ En 2010, Ahmad y colaboradores⁹⁰ realizaron estudios de acoplamiento molecular de xenobióticos PAE's y la comparación con diversos compuestos ya conocidos como inhibidores de CYP19A1 (exemestano, letrozol y anastrozol). Los resultados obtenidos por Ahmad destacan las interacciones por puente de hidrógeno con el residuo Ala438, aminoácidos como

Met374, Ser478, Phe221 y Val373; denominados aminoácidos favorecedores a una afinidad significativa. Mientras que, los aminoácidos Leu477 y Thr310 son aquellos que decrecen dicha afinidad debido a que provocan impedimento estérico. Los valores obtenidos por los ligandos azaesteroidales empleados fueron pobres en afinidad y las principales interacciones fueron de tipo alquílicas, desfavorables y en algunos casos de tipo puente de hidrógeno. En particular, se destacan los compuestos **70** (-2.9 Kcal/mol), **81** (-2.3 Kcal/mol) y **160** (-3.8 Kcal/mol), los cuales mostraron interacciones con el grupo hemo de la proteína y de aminoácidos como Trp224, Ala306 y Asp309. El confórmero más estable de **160** (**Figura 61**), muestra el mejor valor de afinidad teniendo interacciones de tipo alquílicas con el grupo Hem600, de tipo puente de hidrógeno con Asp309 y Ser478 y, además, sin poseer interacciones desfavorables (**Figura 62**). La bolsa hidrofóbica reconocida en esta enzima genera interacciones desfavorables con los ligandos, esto explica la baja afinidad presentada en la **Tabla 8**, representada por los valores de energía libre de Gibbs.

Tabla 8. Interacciones entre la enzima CYP19A1 y los ligandos **69-160b**.

Molécula	G (Kcal/mol)	Donador	Receptor	Distancia (Å)	Tipo
69	-0.9	:LIG1:C	A:LEU372:O	2.20	Desfavorable
		:LIG1:C	A:HEM600	3.95	Pi-Sigma
		:LIG1:H4	A:ASP309:OD2	2.47	Puente de hidrógeno
69b	12.9	:LIG1:C	A:ASP309:O	2.14	Desfavorable
		:LIG1:C	A:HEM600:CM A	4.29	Alquílico
		A:MET374:N	:LIG1:O	3.35	Puente de hidrógeno
70	-2.9	:LIG1:C	A:HEM600	3.63	Pi-Sigma
		A:TRP224	:LIG1:C	3.64	Pi-alquílico
70b	13.4	:LIG1:N	A:THR310:CG2	2.18	Desfavorable
		:LIG1:O	A:HEM600:NC	2.08	Desfavorable
		:LIG1:N	A:THR310:OG1	2.69	Puente de hidrógeno

73	5.3	:LIG1:C	A:SER90:CB	2.13	Desfavorable
		:LIG1:H	:LIG1:O	2.15	Puente de hidrógeno
		A:SER118:CB	:LIG1:O	3.30	Enlace carbono-hidrógeno
74	12.4	A:ARG115:NH	:LIG1:O	2.23	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	A:HEM600	3.52	Pi-Sigma
		:LIG1:C	A:ASP309:CB	1.90	Desfavorable
78	1.5	:LIG1:C	A:THR310:CG2	2.34	Desfavorable
		A:THR310:OG	:LIG1:N	3.34	Puente de hidrógeno
		A:HEM600:CM A	:LIG1	4.54	Alquílico
81	-2.3	:LIG1:H	A:ALA306:O	2.42	Puente de hidrógeno
		A:HEM600:CM A	:LIG1	4.70	Alquílico
81b	15.5	:LIG1:H	A:ASP309:OD2	1.83	Puente de hidrógeno
		A:MET374:SD	:LIG1:O	2.74	Sulfuro-X
		:LIG1:C	A:HEM600	3.41	Pi-Sigma
90	23.8	A:PHE221:CE	:LIG1:C	2.15	Desfavorable
		A:VAL373:CG2	:LIG1:O	1.95	Desfavorable
		:LIG1:O	A:HEM600:O1A	2.94	Puente de hidrógeno
100	15.1	A:LYS390:CE	:LIG1:O	3.61	Enlace carbono-hidrógeno
		A:ASP232:OD 2	:LIG1:C	1.78	Desfavorable
110	-1.9	A:SER90:OG	:LIG1:O	2.20	Puente de hidrógeno
		A:ASP232:N	:LIG1:O	3.35	Puente de hidrógeno
		A:GLY117:N	:LIG1:H	2.03	Desfavorable
120	9.9	:LIG1:H	A:LEU372:O	2.03	Puente de hidrógeno

		A:ARG115:CD	:LIG1:O	3.43	Enlace carbono- hidrógeno
		A:THR310:OG 1	:LIG1:O	2.05	Desfavorable
		:LIG1:C	A:VAL370:CG1	2.06	Desfavorable
130	9.0	A:ARG115:CD	:LIG1:O	2.80	Enlace carbono- hidrógeno
		:LIG1:C	A:HEM600:CM D	3.05	Alquílico
		:LIG1:H	A:ASP309:O	2.32	Puente de hidrógeno
140	1.6	A:MET374:SD	:LIG1:O	2.47	Sulfuro-X
		A:HEM600:CM A	:LIG1:C	4.11	Alquílico
		:LIG1:H	A:ASP309:O	2.60	Puente de hidrógeno
150	1.7	A:MET374:SD	:LIG1:O	2.55	Sulfuro-X
		A:LEU372:O	:LIG1:C	2.07	Desfavorable
		:LIG1:H	A:ASP309:OD2	2.96	Puente de hidrógeno
160	-3.8	:LIG1:C	A:ALA306:O	2.71	Enlace carbono- hidrógeno
		A:HEM600	:LIG1:C	4.31	Pi-alquílico
		A:ASN136:ND 2	:LIG1:N	3.14	Puente de hidrógeno
160b	3.1	A:SER118:CA	:LIG1:O	3.14	Enlace carbono- hidrógeno

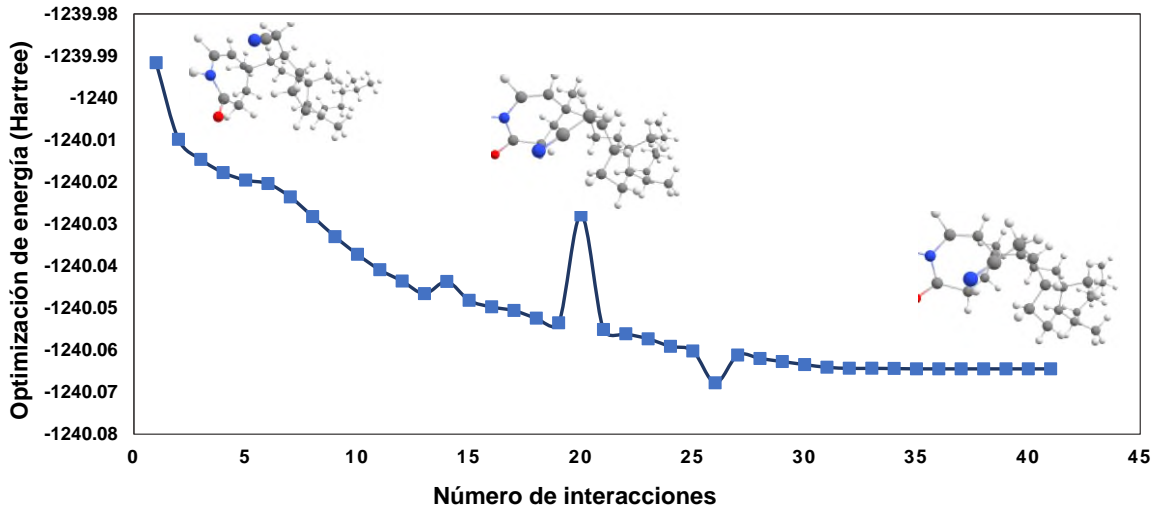


Figura 61. Optimización de energía para el ligando 160.

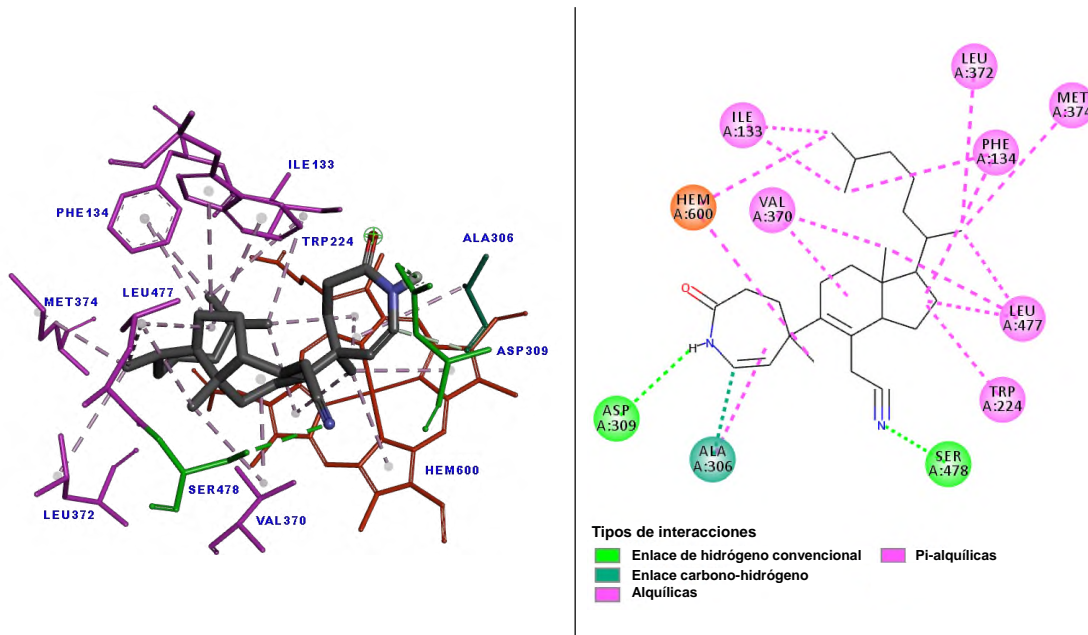


Figura 62. Acoplamiento del ligando 160 con el sitio activo de la enzima CYP19A1 visualizada en Discovery Studio (<https://www.3ds.com/>).

7.3.4- Validación del sitio activo en la enzima CYP17A1

La enzima CYP17A1 pertenece al grupo de enzimas del citocromo P450, en el caso de la enzima CYP17 se puede definir como específica para moléculas como la pregnenolona y la progesterona. El código PDB obtenido para el enzima en el Protein Data Bank es el de 3SWZ, teniendo como ligando cristalizado a una variante de los andrógenos (código PDB=TOK-001) y como grupo prostético a la hemoglobina. Al evaluar los distintos residuos de aminoácidos que interaccionan con TOK-001, las coordenadas de Asn202 fueron las que mantuvieron al ligando calculado dentro de la cavidad enzimática. Por tal motivo, se empleó dicho residuo teniendo como átomo central al oxígeno del ácido carboxílico arrojando los valores en X=13.764, Y=-4.766 y Z=36.227. Posteriormente, se ejecutó la validación con ayuda del programa AutoDock Vina variando el número de cajas (10-60) y los modos (10, 100, 500 y 1000) (**Tabla 9**).

Tabla 9. Datos de energía y valores de RMSD de la enzima CYP17A1 (residuo de Asn202/OD1) y su ligando cristalizado (TOK-001).

VALOR DE RMSD/3SWZ/OD1						
Modos						
No. de caja	10	100	500	1000	1000R2	1000R3
10	3.588	0.161	3.904	3.777		
20	2.767	2.282	4.004	3.487		
25	0.161	0.161	0.16	0.161	0.162	0.162
30	0.171	3.956	3.957	2.837		
40	3.519	3.992	2.739	3.991		
50	2.009	3.913	3.916	3.913		
60	3.389	3.914	3.915	3.913		

VALOR DE ENERGÍA (Kcal/mol)/3SWZ/OD1						
Modos						
No. de caja	10	100	500	1000	1000R2	1000R3
10	35.8	39.2	33.6	34.7		
20	-4.2	-2.5	-4.2	-4.2		
25	-12.9	-12.9	-12.9	-12.9	-12.9	-12.9
30	-12.6	-12.6	-12.6	-12.6		
40	-9.4	-12.9	-12.9	-12.9		
50	-11.1	-12.6	-12.6	-12.6		
60	-11	-12.6	-12.6	-12.6		

La validación del sitio activo se realizó con el ligando cristalizado TOK-001 (verde) y el calculado para la validación del sitio activo (azul), obteniendo un valor mínimo de RMSD y energía de 0.160 y -12.9 Kcal/mol, respectivamente para una caja de 25. En la **Figura 63**, se observa una alineación de 20 átomos de TOK-001 y aunado a los valores de RMSD y energía, se considera como exitosa y espontánea la validación del sitio activo.

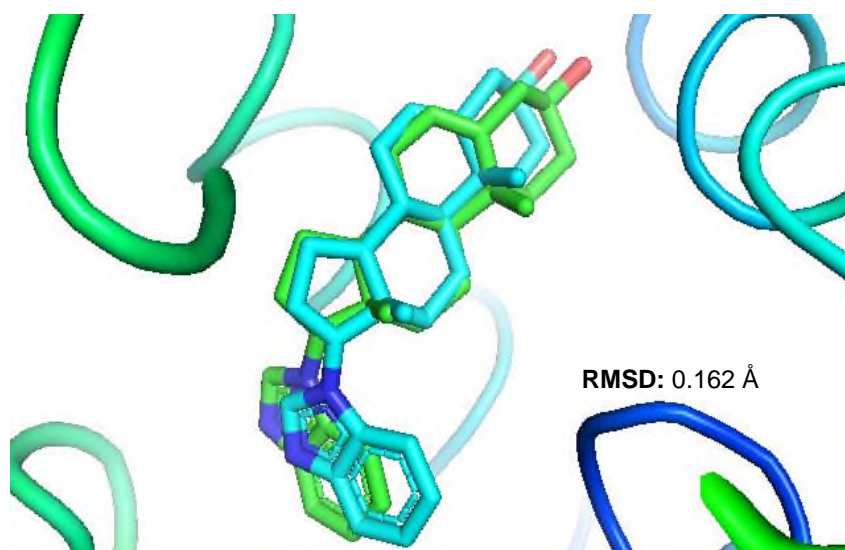


Figura 63. Cálculo de validación del algoritmo de acoplamiento molecular (Presentación del cálculo de RMSD, cálculo realizado en software The PyMOL molecular Graphics System 2016).

7.3.4.1.- Acoplamiento molecular de la enzima CYP17A1 y los ligandos azaesteroidales

En estudios recientes se ha destacado un enfoque hacia la síntesis de nuevos inhibidores de la enzima CYP17A1, tomando en cuenta a los sustratos naturales. Al respecto, las modificaciones en la posición C-17 con heterociclos de átomos privilegiados (N, O y S), tienden a interactuar con el grupo hemo de la enzima y poseer una afinidad de enlace sobresaliente.⁹¹ La abiraterona es un potente inhibidor de la enzima CYP17A1 aprobado por la FDA el cual posee similitud estructural con TOK-001, la diferencia más notoria es la molécula de imidazol y benzimidazol que poseen respectivamente.⁹¹ En el caso de la variedad de compuestos evaluados en este trabajo denotan en general una afinidad de media a alta entre el complejo ligando-receptor. Los compuestos **69** (-9.4 Kcal/mol), **70** (-9.7

Kcal/mol), **78** (-10.3 Kcal/mol), **81** (-11.0 Kcal/mol), **110** (-12.1 Kcal/mol), **160** (-10.1 Kcal/mol) y **160b** (-10.8 Kcal/mol) mostraron los mejores valores incluso cercanos al ligando cristalizado. La relación estructural determina que aquellos compuestos con un grupo lactama en el anillo A y un grupo oxima, amino o nitrilo se ven favorecidos sobre aquellos que poseen grupos lactámicos en el anillo B del esteroide. Particularmente para esta enzima, los grupos dioxima **69** y **78** tuvieron valores de afinidad significativos y el solo hecho de tener un grupo OH en C-5 aumentó las interacciones entre el complejo ligando-receptor. Dado que el ligando **110** fue quien obtuvo el mejor valor, se muestra como ejemplo en la optimización de la geometría mediante el programa Chemcraft; obteniendo -1154.6896044 Hartree como mínimo de energía (**Figura 64**). Posteriormente, las mismas coordenadas encontradas en la validación del sitio activo se emplean para el acoplamiento del confórmero más estable del ligando **110** y la enzima CYP17A1. Dentro de la cavidad de la enzima, el ligando adquirió un total de 4 modos o formas de acomodarse, influyendo con esto en el valor de afinidad que de hasta -12.1 kcal/mol y una constante de ionización de 1.327×10^{-9} . Las interacciones mostradas por la enzima y el ligando son en su mayoría de tipo alquílicas. No obstante, existe una interacción de tipo puente de hidrógeno que se forma entre el residuo Arg239 y el átomo de oxígeno del carbonilo presente en la lactama (verde). (**Figura 65**). Comparando a **110** con **81**, el grupo funcional lactona del anillo E en **110** influye en la capacidad de interactuar con la cavidad enzimática. Mostrando así, que los heterociclos de átomos privilegiados (N, O y S) si provocan un aumento en la afinidad con la enzima CYP17A1 y anteponiendo este tipo de cadena lateral sobre la colestánica. Por tanto, la bolsa hidrofóbica es lo suficientemente adecuada para la interacción de los ligandos con la enzima, esto se demuestra con los valores de energía libre de Gibbs negativas y las escasas interacciones desfavorables descritas en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Interacciones entre la enzima CYP17A1 y los ligandos **69-160b**.

Molécula	G (Kcal/mol)	Donador	Receptor	Distancia (Å)	Tipo
69	-9.4	:LIG1:O	A:ASN202:OD1	2.94	Desfavorable
		:LIG1:C	A:HEM600	3.48	Pi-Sigma
		A:PHE114	:LIG1	4.88	Pi-alquílico
69b	-7.9	:LIG1:H	A:GLU203:O	2.41	Puente de hidrógeno
		LIG1:H	A:ASP207:OD2	2.02	Puente de hidrógeno
		A:PHE169	:LIG1:C	4.22	Pi-alquílico
70	-9.7	:LIG1:N	A:ASP298:OD1	3.12	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	A:HEM600:CMD	4.38	Alquílico
		:LIG1:N	A:ARG239:NH1	4.46	Desfavorable
70b	-7.5	A:PHE169	:LIG1	5.36	Pi-alquílico
		:LIG1:H	A:PHE169:N	2.14	Desfavorable
73	-7.3	:LIG1:C	B:PHE169	3.73	Pi-Sigma
		:LIG1:C	A:LEU485	3.97	Alquílico
74	-7.2	A:PHE169:N	:LIG1:O	3.00	Puente de hidrógeno
		A:SER168:CB	:LIG1:O	3.18	Enlace carbono-hidrógeno
		A:PHE169	:LIG1:C	4.21	Pi-alquílico
78	-10.3	A:ARG239:NH1	:LIG1:N	3.39	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	A:HEM600	3.73	Pi-Sigma
		:LIG1:C	A:ALA367	4.44	Alquílico
81	-11.0	A:ALA113	:LIG1:C	4.32	Alquílico
		A:TYR201	:LIG1:C	5.36	Pi-alquílico
81b	-7.7	:LIG1:H	A:VAL482:O	2.80	Puente de hidrógeno
		A:GLY301:CA	:LIG1:O	3.41	Enlace carbono-hidrógeno
		A:ILE371:CD1	:LIG1:C	2.37	Desfavorable
90	-6.3	A:LYS312:NZ	:LIG1:O	3.37	Puente de hidrógeno
		:LIG1:O	A:GLU203:O	3.15	Puente de hidrógeno
		:LIG1:O	:LIG1:O	2.90	Desfavorable
100	-6.8	A:LEU485	:LIG1	4.99	Alquílico
		A:PHE169	:LIG1:C	5.14	Pi-alquílico

110	-12.1	A:ARG239:NH1	:LIG1:O	3.16	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	A:HEM600	3.93	Pi-Sigma
		:LIG1	A:ILE371	5.49	Alquílico
120	-6.8	:LIG1:H	A:SER488:OG	2.26	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	A:PHE169	3.79	Pi-Sigma
130	-8.7	A:ARG239:NH1	:LIG1:O	2.43	Puente de hidrógeno
		A:GLY301:CA	:LIG1:O	2.96	Enlace carbono-hidrógeno
		A:TYR201	:LIG1:C	4.99	Pi-alquílico
140	-6.4	A:SER168:OG	:LIG1:O	3.23	Puente de hidrógeno
		A:ASN196:ND2	:LIG1:O	3.21	Puente de hidrógeno
		B:HIS160:CE1	:LIG1:O	3.48	Enlace carbono-hidrógeno
150	-6.7	A:SER168:OG	:LIG1:O	3.37	Puente de hidrógeno
		A:ASN196:ND2	:LIG1:O	3.28	Puente de hidrógeno
		A:PHE169	:LIG1	5.25	Pi-alquílico
160	-10.1	:LIG1:H	A:ASN202:OD1	2.92	Puente de hidrógeno
		A:ARG239:NH1	:LIG1:O	3.28	Puente de hidrógeno
		:LIG1:C	A:HEM600	3.76	Pi-Sigma
160b	-10.8	:LIG1:C	A:HEM600	3.87	Pi-Sigma
		:LIG1	A:VAL482	5.19	Alquílico
		A:ARG239	:LIG1	5.01	Alquílico

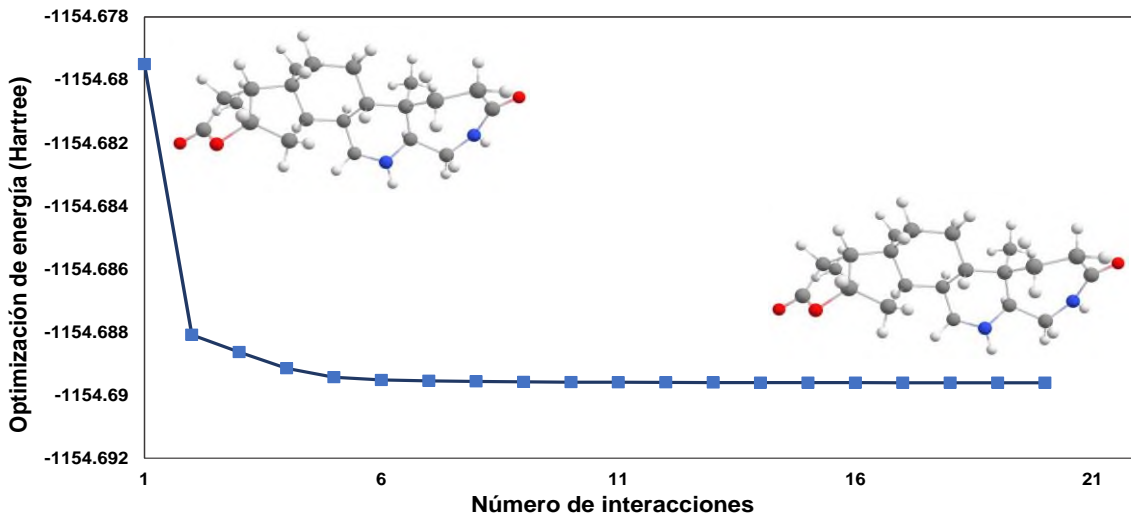


Figura 64. Optimización de energía para el ligando 110.

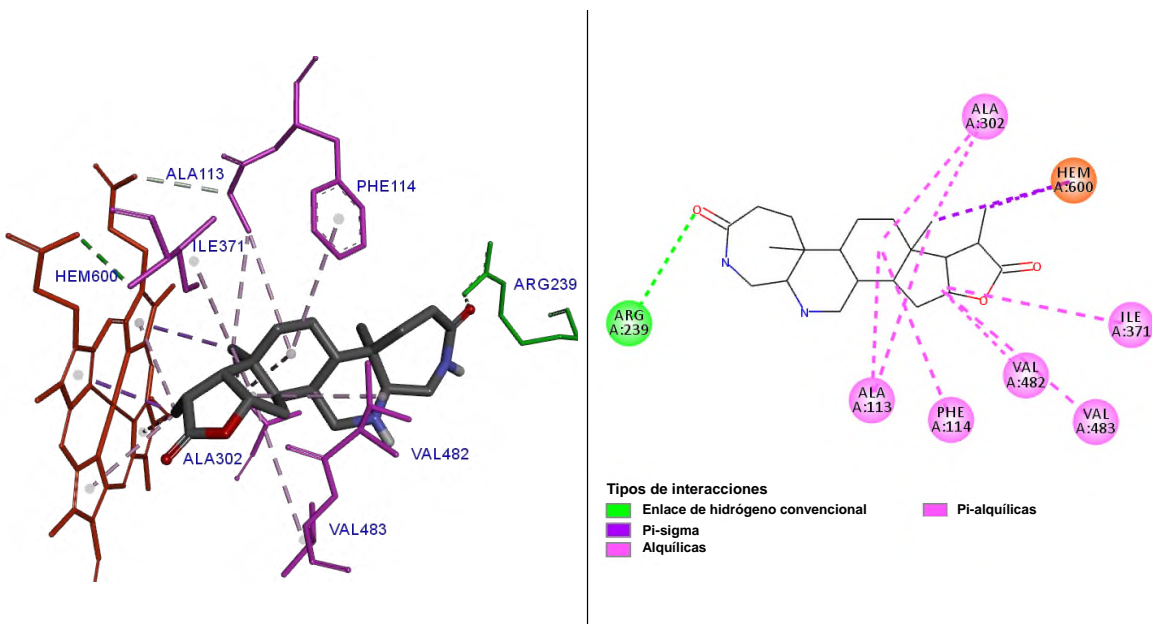


Figura 65. Acoplamiento del ligando 110 con el sitio activo de la enzima CYP17A1 visualizada en Discovery Studio (<https://www.3ds.com/>).

En la **Tabla 11**, se muestran los resultados de acoplamiento molecular de los 18 ligandos y las 4 enzimas empleadas mostrando como los ligandos encajan de manera satisfactoria en la cavidad propuesta en dos de ellas; las enzimas 17β -HSD y CYP17A1. Los ligandos que de manera general mostraron energías de afinidad cercanas al ligando cristalizado son: **70, 81, 110, 120, 160** y **160b**. Estructuralmente, esto denota que al poseer una cadena lateral tipo colestánica, una A-homolactama y un grupo amino en el anillo B potencia la afinidad entre el receptor y los ligandos evaluados. Seguido de un grupo seco-nitrilo y/o un grupo oxima en C-6, además de una cadena lateral tipo lactona como es el caso de **110**. En el caso particular de los compuestos sintetizados en este trabajo (**69, 69b, 70, 70b, 73, 74** y **78**), mostraron valores de afinidad de regulares a buenos; destacando a **70** (-8.1 Kcal/mol), **70b** (-8.8 Kcal/mol) y **73** (-8.0 Kcal/mol) para la enzima 17β -HSD. Mientras que en la enzima CYP17A1, se destacan a **69** (-9.4 Kcal/mol), **70** (-9.7 Kcal/mol) y **78** (-10.0 Kcal/mol). El ligando **90**, quien tiene grupos nitro en su estructura se muestran con una mayor cantidad de interacciones desfavorables repercutiendo en una pobre afinidad con las 4 enzimas; siendo dicho grupo funcional el que confiere múltiples enlaces rotables y por tanto una alta promiscuidad con la enzima no encajando de forma adecuada en el sitio de acción.

Tabla 11. Energías de afinidad (Kcal/mol) de los ligandos **69-160b**.

PDB	Proteína	Energía de afinidad del ligando cristalizado (Kcal/mol)	Energía de afinidad de los ligandos oxima y lactama (Kcal/mol)																	
			69	69b	70	70b	73	74	78	81	81b	90	100	110	120	130	140	150	160	160b
3BUR	5 β -reductasa	TES: -4.5	14.1	116.6	6.5	60.1	50.6	40.4	12.0	5.3	88.9	131.0	73.1	11.6	70.7	37.1	36.7	24.2	11.3	69.5
3HB5	17β -HSD	E2B: -13.4	-7.6	-7.8	-8.1	-8.8	-8.0	-7.5	-7.9	-9.9	-8.0	-6.7	-7.7	-8.4	-9.1	-8.7	-7.3	-6.8	-9.0	-9.4
3S79	CYP19	ASD: -13.2	-0.9	12.9	-2.9	13.4	5.3	12.4	1.5	-2.3	15.5	23.8	15.1	-1.9	9.9	9.0	1.6	1.7	-3.8	3.1
3SWZ	CYP17	TOK: -12.9	-9.4	-7.9	-9.7	-7.5	-7.3	-7.2	-10.3	-11.0	-7.7	-6.3	-6.8	-12.1	-6.8	-8.7	-6.4	-6.5	-10.1	-10.8

7.4.- Análisis de parámetros de adsorción, metabolismo y actividad

La expresión *in silico* significa “hecho por computadora o vía simulación computacional”, atribuyendo ciertas características a compuestos que son estudiados en distintas plataformas. Esta investigación consiste en la evaluación de descriptores farmacocinéticos, incluida la regla de cinco de Lipinski, cálculo de puntuación de bioactividad y toxicidad a través de métodos computacionales.

7.4.1.- Molinspiration

Este programa proporciona detección virtual basada en fragmentos, predicción de bioactividad y visualización de datos dando información mediante ciertos parámetros relacionado a propiedades fisicoquímicas o reglas de Lipinski.⁹² Por ejemplo, el coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$) se utiliza en los estudios QSAR y en el diseño racional de medicamentos como medida de la hidrofobicidad molecular. La hidrofobicidad afecta la absorción del fármaco, la biodisponibilidad, las interacciones hidrófobas entre el fármaco y el receptor, el metabolismo de las moléculas y su toxicidad.⁹² En este parámetro se desea un valor entre 1 a 5, tomando como valor ideal entre 2 y 3 dado que se desea que el compuesto bioactivo no sea ni tan hidrofílico que no genere acción alguna ni tan lipofílico que tienda a acumularse en las células. Otro parámetro muy importante es el TPSA, el cual sirve para la predicción de las propiedades de transporte de fármacos. El área de la superficie polar se define como una suma de las superficies de los átomos polares (generalmente oxígenos, nitrógenos e hidrógenos unidos) en una molécula. Se ha demostrado que este parámetro se correlaciona muy bien con la absorción intestinal humana, la permeabilidad de las mono-capas de Caco-2 y la penetración de la barrera hematoencefálica.⁹³ Por tanto, se considera que un $PSA < 140$ es igual a una buena permeabilidad en membrana celular y un $PSA < 90$ es igual a una buena permeabilidad en membrana cerebral. El peso molecular es otro parámetro importante para una mayor o menor absorción, siendo un valor no mayor a 500 umas el que se desea en los fármacos. Así también, se desea un número de aceptores de puentes de hidrógenos no mayor a 10 y de donadores de puentes de hidrógenos no mayor a 5. Otro parámetro fundamental es el número de enlaces

rotables, el cual, no debe exceder de 5 o en su defecto tener un valor múltiplo de 5; con esto se piensa que el compuesto tendrá una adecuada difusión pasiva a través de las membranas celulares y una absorción eficaz en el intestino. De acuerdo con esto, los ligandos que cumplen de manera favorable con los criterios mencionados son: **70b, 81b, 110, 120, 130 y 160b** los cuales de manera predictora podrían ser compuestos con adecuada difusión pasiva a través de las membranas celulares y una absorción eficaz del intestino a la sangre. Mientras tanto, aquellos compuestos que poseen un rango de ajuste intermedio o que violan de 1 a 2 parámetros son: **69, 69b, 70, 73, 74, 78, 81, 140, 150 y 160**. El ligando **81**, quien obtuvo los mejores valores en el Docking en casi todas las enzimas posee solamente una violación a la regla que es el de LogP infiriendo un carácter lipofílico, haciendo de este un buen candidato a pruebas biológicas con posible actividad importante. Finalmente, los ligandos con 3 o más violaciones a los parámetros descritos son los ligandos **90 y 100** definiendo una pobre o nula absorción y permeabilidad del compuesto (**Tabla 12**).

Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos obtenidos del programa Molinspiration Cheminformatics de los compuestos **69-160b**.

	Mi LogP	TPSA (A ²)	n Atoms	MW (umas)	n ON	n OHNH	n viol.	n rotb	V (A ³)
69	7.23	65.18	31	428.66	4	2	1	5	444.0
69b	5.54	83.65	33	456.63	6	2	1	0	440.3
70	6.38	61.69	31	428.66	4	2	1	5	444.1
70b	4.69	80.16	33	456.63	6	2	0	0	440.4
73	6.2	111.51	41	569.74	8	1	2	7	546.4
74	5.41	108.0	41	569.74	8	1	2	7	546.5
78	6.47	85.41	32	446.68	5	3	1	5	457.9
81	6.14	41.12	29	402.67	3	2	1	5	431.5

81b	4.46	59.59	31	430.63	5	2	0	0	427.7
90	4.54	197.2	45	632.71	14	2	4	8	569.0
100	5.27	125.1	44	611.78	9	1	3	9	581.7
110	1.76	67.4	26	360.50	5	2	0	0	348.3
120	4.4	81.71	35	483.65	6	1	0	1	463.7
130	4.75	64.6	32	441.61	5	1	0	0	428.1
140	4.51	119.0	39	545.72	8	2	1	10	529.2
150	4.97	115.8	39	543.70	8	1	1	10	523.4
160	6.15	52.89	30	412.66	3	1	2	7	440.0
160b	4.46	71.36	32	440.63	5	1	0	2	436.8

n=número

7.4.2.- admetSAR

La absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET) son parámetros que juegan un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Sin embargo, la evaluación experimental de los perfiles de ADMET resulta costosa, y sobre todo la carga de trabajo no puede satisfacer la demanda en la detección y optimización de fármacos. Junto con el alto nivel de detección *in vitro*, las técnicas computacionales que pueden filtrar/predecir los perfiles ADMET se han convertido en un enfoque alternativo.⁹⁴ Es por lo que, se opta por un análisis en el programa admetSAR la cual es una base de datos de código abierto, buscando por nombre y estructura, y que se actualiza continuamente, recopila, cura y administra los datos de propiedades asociadas a perfiles ADMET disponibles de la literatura publicada. Al someter los ligandos propuestos a la base de datos, los resultados muestran que todos presentan una permeabilidad a la BBB y esto es debido a la similitud estructural que poseen con los esteroides sintetizados por el organismo. La BBB es una barrera altamente selectiva cuya función es la de separar la sangre

circundante del fluido extracelular dejando pasar solamente a moléculas de agua, algunos gases, glucosa, aminoácidos y moléculas liposolubles (ej. esteroides). Otro parámetro importante es la solubilidad, tanto este parámetro como el anterior son dependientes de las propiedades fisicoquímicas, desafortunadamente de manera opuesta. Por ejemplo, la lipofilidad de una molécula define una buena permeabilidad, sin embargo, restringe a la solubilidad acuosa⁹⁵ y esto se ve reflejado en todos los azaesteroides, los cuales poseen permeabilidad en BBB, Caco-2 e HIA, pero los valores de log S son pobres. De acuerdo con su distribución, los azaesteroides se encontrarán principalmente a nivel intracelular en mitocondrias y lisosomas. Esto debido a que, las hormonas esteroideas se encuentran comúnmente en dicha región intracelular. En el tema del metabolismo, dichos ligandos están mediados principalmente por la familia de CYP450, tal es el caso de las enzimas CYP450 1A2, CYP450 2C9, CYP450 2D6, CYP450 2C19 y CYP450 3A4 que se encuentran implicadas en el metabolismo de xenobióticos entre los que destacan los antiinflamatorios y compuestos sulfonados para el caso de CYP 2C9; inhibidores de protones y antiepilépticos para el caso de CYP 2C19 y fármacos de origen esteroideo para el caso de CYP 2D6. Conforme a esto, los ligandos azaesteroidales poseen una probabilidad de ser sustratos solo con CYP450 3A4 siendo esta enzima una de las más importantes en la metabolización de fármacos y dicho resultado infiere que los ligandos podrán ser metabolizados de manera adecuada. En este mismo contexto, la capacidad de inhibir alguna de estas enzimas podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades. De acuerdo con la base de datos el ligando **90**, inhibe a la enzima CYP450 3A4 lo que puede repercutir en un aumento en la concentración de un medicamento a nivel plasmático. Conforme a los demás parámetros, el ligando **100** posee una alta promiscuidad con enzimas CYP; todos los ligandos poseen una baja inhibición del HERG (gen que regula la polarización del potencial cardíaco). Además, no poseen probabilidad de ser tóxicos, mutagénicos o carcinogénicos (**Tabla 13**).

Tabla 13. Valores de ADMET de los compuestos 69-160b.

ADMET	69	69b	70	70b	73	74	78	81	81b	90	100	110	120	130	140	150	160	160b
ABSORCIÓN																		
BBB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Permeabilidad Caco-2 (cm/s)	0.83	0.54	0.77	0.60	0.67	1.08	0.66	0.70	0.78	0.49	0.93	0.71	1.16	1.08	0.65	0.87	1.27	1.18
Solubilidad acuosa (Log S)	-4.1	-4.2	-3.7	-3.8	-4.2	-4.1	-3.7	-3.4	-3.6	-3.6	-4.0	-3.6	-3.9	-4.1	-4.2	-4.3	-3.5	-4.3
DISTRIBUCIÓN																		
L. intracelular	M	M	M	M	M	M	M	L	L	M	M	L	M	M	M	M	M	M
METABOLISMO																		
Sustrato de CYP450																		
CYP450 2C9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP450 2D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP450 3A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inhibidor de CYP450																		
CYP450 1A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP450 2C9	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP450 2D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CYP450 2C19	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP450 3A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP IP	Alta	Baja	Alta	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Alta	Baja	Baja	Baja	Alta	Alta	Baja	Baja
EXCRECIÓN	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
TOXICIDAD																		
Inhibidor de HERG	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja
Toxicidad AMES	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Carcinogénico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Biodegradable	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toxicidad oral aguda	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
LD ₅₀ rata (mol/kg)	2.40	2.52	2.64	2.62	2.60	2.63	2.65	2.62	2.67	2.74	2.63	2.80	2.55	2.45	2.63	2.66	2.60	2.78
pLC ₅₀ peces (mg/L)	0.79	1.16	1.10	1.16	0.70	0.76	1.22	1.81	1.82	0.92	0.57	1.73	0.54	0.99	1.02	0.65	1.17	1.00

L=lisosoma, M=mitocondria, SD=sin datos.

7.4.3.- PASS online

El programa llamado PASS online, es una base de datos en donde nos muestra las posibles actividades de un compuesto dependiendo de su estructura expresando los datos con valores de 0-1, siendo 1 el valor máximo. De acuerdo con estas probabilidades, se realizó una comparación con el fármaco comercial Finasterida (5). Los resultados muestran una relación con los datos obtenidos del acoplamiento molecular, en donde, los compuestos poseen una mejor actividad como inhibidores de las enzimas CYP17 y 17 β -HSD (los resultados de 5 β -reductasa y CYP19 no aparecen en la mayoría de los compuestos y debido a esto, no se anexan en la tabla). Así mismo, se muestran valores de probabilidad intermedios para los compuestos analizados como posibles tratamientos en los desórdenes relacionados con la próstata. Aunado a los resultados *in vitro*, la mayoría de las moléculas en el estudio *in silico* muestran una probabilidad significativa como potenciales antineoplásicos (un compuesto antineoplásico es aquel que impide el desarrollo, crecimiento, o proliferación de células tumorales malignas), muy por encima del compuesto 5. Aunado a esto, las moléculas oxima y lactama mostraron probabilidades deficientes frente al cáncer de seno (**Tabla 14**). No obstante, esto no necesariamente sugiere que estos compuestos no puedan poseer dicha actividad ya que las predicciones de actividad se sustentan en una base de datos de moléculas que de manera estructural se asemejen. Entonces, esto puede indicar que en la base de datos no existan compuestos de la misma naturaleza estructural que hayan sido evaluados para el cáncer de mama. Por tanto, los resultados *in silico* que se complementan con los resultados de acoplamiento molecular indican que los compuestos evaluados son prometedores como inhibidores de enzimas, específicamente, para las enzimas CYP17 y 17 β -HSD. Además, muestran actividad alta como antiproliferativos destacando a **70b** y **73** (mismos que tuvieron valores de IC₅₀ relevantes), y además a **130** y **140** (compuestos que no se sintetizaron en este trabajo). Demostrando con ello, la importancia de las predicciones o análisis *in silico* frente a los estudios *in vitro* dando la pauta a pensar en posibles ensayos *in vivo* y preclínicos.

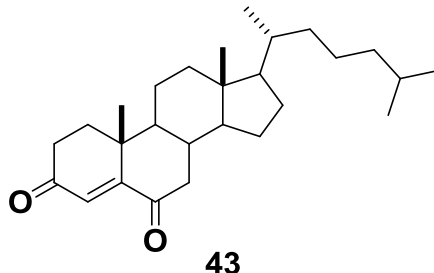
Tabla 14. Predicción de la actividad mediante el programa PASS online de los compuestos **69-160b**.

COMPUESTO	T. desordenes de la próstata		Anti-neoplásico		Inhibidor de CYP17		Inhibidor de 17 β -HSD		Cáncer de seno	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
5	0.98	0.02	0.22	0.08	0.56	0.01	0.76	0.03	-	-
69	0.73	0.05	0.48	0.08	0.59	0.01	0.79	0.03	-	-
69b	0.59	0.01	0.84	0.01	0.56	0.01	0.34	0.22	0.39	0.03
70	0.63	0.01	0.62	0.04	0.62	0.01	0.74	0.04	-	-
70b	0.43	0.03	0.86	0.01	0.60	0.00	-	-	0.32	0.05
73	0.59	0.01	0.80	0.01	0.60	0.01	0.37	0.20	0.42	0.03
74	0.48	0.02	0.66	0.03	0.58	0.01	0.44	0.16	0.36	0.04
78	0.60	0.01	0.42	0.01	0.52	0.02	0.78	0.03	0.17	0.11
81	0.75	0.05	0.11	0.07	0.55	0.01	0.75	0.04	-	-
81b	0.61	0.01	0.68	0.03	0.52	0.02	0.29	0.26	0.25	0.07
90	0.35	0.05	0.27	0.17	0.44	0.03	0.34	0.22	0.19	0.1
100	0.58	0.01	0.78	0.01	0.52	0.02	0.44	0.16	0.47	0.02
110	0.67	0.01	0.52	0.07	0.53	0.02	0.61	0.09	-	-
120	0.65	0.01	0.72	0.02	0.67	0.00	0.59	0.09	0.39	0.03
130	0.66	0.01	0.82	0.01	0.60	0.01	0.66	0.07	0.47	0.02
140	0.65	0.01	0.84	0.01	0.53	0.01	0.63	0.08	0.47	0.02
150	0.60	0.01	0.78	0.01	0.53	0.02	0.57	0.10	0.40	0.03
160	0.57	0.02	0.27	0.1	0.51	0.02	0.68	0.06	-	-
160b	0.29	0.08	0.76	0.02	0.48	0.02	-	-	0.34	0.04

Pa=Probabilidad de actividad, Pi=Probabilidad de inactividad, Pa>Pi confirma la actividad significativa.⁹⁶

8. PARTE EXPERIMENTAL

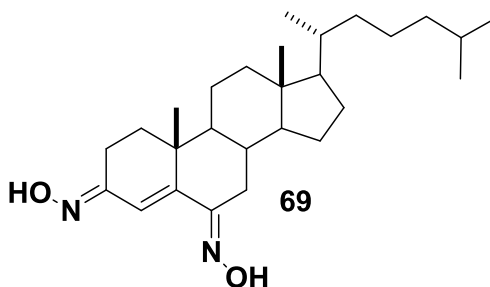
8.1. Procedimiento para generar al colest-4-en-3,6-diona (43)



En un matraz de bola de 100 mL se disolvió a **42** (1 g, 2.58 mmol) en una mezcla de acetona/CH₂Cl₂ (10/25 mL); se añadió gota a gota el reactivo Jones (6 mL, 2.19 M). La reacción se mantuvo en agitación constante durante 1 h, pasado este tiempo se adicionó alcohol isopropílico (5 mL) virando la reacción de café a verde azulado. Después, el crudo se hizo pasar por una cama de Celita® y florisil® arrastrando el compuesto con CH₂Cl₂. Posteriormente, se llevó a separación por CC utilizando una fase móvil Hex/AcOEt (85:15) y finalmente se evaporó a presión reducida obteniendo así **43** (0.84 g, 82% de rendimiento).

Colest-4-en-3,6-diona (43). θ_{mp} . 85-90 °C; IR (cm⁻¹): 1713 (C=O), 1683 (C=O), 1467 (C=C), 1266 (C-O); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.13 (s, 1H, H-4), 1.45 (s, 3H, CH₃-19), 0.89 (d, 3H, J_{20-21} = 6.8 Hz, CH₃-21), 0.84 (d, 3H, $J_{25-26,27}$ = 7.0 Hz, CH₃-26 o CH₃-27), 0.82 (d, 3H, $J_{25-26,27}$ = 6.5 Hz, CH₃-26 o CH₃-27), 0.68 (s, 3H, CH₃-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 202.6 (C-3), 199.7 (C-6), 161.3 (C-5), 125.6 (C-4), 56.7 (C-14), 56.1 (C-17), 51.1 (C-9), 47.0 (C-2), 42.7 (C-13), 40.0 (C-10), 39.6 (C-24), 39.3 (C-12), 36.2 (C-22), 35.8 (C-8), 35.7 (C-1), 34.4 (C-20), 34.1 (C-7), 31.1 (C-25), 28.2 (C-16), 24.1 (C-15), 24.0 (C-23), 23.0 (C-26), 22.7 (C-27), 21.1 (C-11), 18.8 (C-21), 17.7 (C-19), 12.1 (C-18); ESI-MS calculado para C₂₇H₄₂O₂ ([M+H]⁺): 399.3218, encontrado: 399.3580.

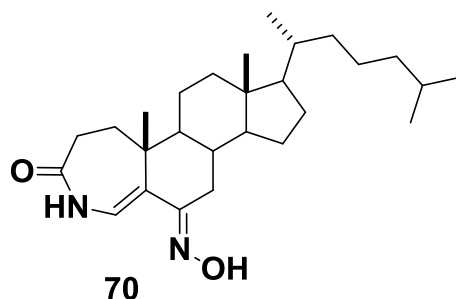
8.2.- Procedimiento para generar al (3E,6E)-3,6-dihidroxiiminocolest-4-eno (69)



En un matraz de bola de 100 mL se disolvió a **43** (0.8 g, 2.59 mmol) en etanol (20 mL) luego, se añadió NaOAc (0.31 g, 3.78 mmol) y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (0.26 g, 3.74 mmol). La disolución se mantuvo en reflujo mientras que la reacción se siguió por CCF y se dio por terminada al cabo de 1 h. Finalmente, se evaporó la mitad del volumen de etanol a presión reducida y se adicionó a un matraz Erlenmeyer con agua fría favoreciendo la formación de un precipitado. La mezcla se dejó en refrigeración por 24 h, el precipitado se filtró y se secó a vacío. Se realizó una recrystalización de éste con metanol, obteniendo a **69** (0.7 g, 86% de rendimiento).

(3E,6E)-3,6-Dihidroxiiminocolest-4-eno (69). θ_{mp} . 141-144 °C; IR (cm^{-1}): 2943 (C-H), 1686 (C=N), 1680 (C=N), 1603 (C=C); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.20 (s, 1H, H-4), 3.17 (dd, 1H, $J_{7\beta-7\alpha}= 15.25$ Hz, $J_{7\beta-8\beta}= 4.5$ Hz, H-7 β), 2.89 (d, 1H, $J_{2\alpha-1\beta}= 14$ Hz, H-2 α), 0.89 (s, 3H, H-19), 0.88 (d, 3H, $J_{20-21}= 6.5$ Hz, CH_3 -21), 0.83 (d, 3H, $J_{26,27-25}= 7.0$ Hz, CH_3 -26 o CH_3 -27), 0.82 (d, 3H, $J_{26,27-25}= 6.5$ Hz, CH_3 -26 o CH_3 -27), 0.64 (s, 3H, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 154.4 (C-3), 153.8 (C-6), 145.4 (C-5), 118.9 (C-4), 56.1 (C-14), 55.6 (C-17), 50.5 (C-9), 42.0 (C-13), 39.0 (C-7), 38.4 (C-24), 37.6 (C-12), 35.7 (C-22), 35.3 (C-20), 33.3 (C-1), 32.4 (C-10), 29.1 (C-8), 27.8 (C-16), 27.5 (C-25), 23.7 (C-23), 23.4 (C-15), 22.6 (C-26), 22.4 (C-27), 20.9 (C-11), 18.5 (C-21), 18.4 (C-2), 17.4 (C-19), 11.7 (C-18); ESI-MS calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 429.3436, encontrado: 429.3481.

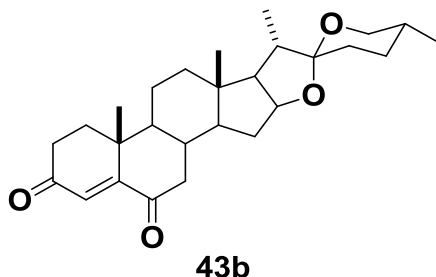
8.3.- Procedimiento para generar al 3-aza-3-oxo-6-hidroxiimino-A-homocolest-4-eno (70)



En un matraz de bola de 50 mL se disolvió a **69** (0.1 g, 0.23 mmol) en dioxano (4 mL), luego se adicionó SOCl_2 (67 μL , 0.93 mmol) manteniendo la reacción en agitación durante un periodo de 24 h. La reacción se vertió en agua (10 mL), posteriormente, se realizaron extracciones con AcOEt (3 x 20 mL). La fase orgánica recolectada se lavó con solución saturada de NaCl (2 x 30 mL), NaHCO_3 (1 x 20 mL) y un último lavado con agua (1 x 30 mL). El disolvente se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. Finalmente, el crudo se purificó por CC utilizando como fase móvil Hex/AcOEt en una proporción 30:70 obteniendo a **70** (0.06 g, 60% de rendimiento).

3-aza-3-oxo-6-hidroxiimino-A-homocolest-4-eno (70). IR (cm^{-1}): 3192 (N-H), 2932 (C-H), 1704 (C=O), 1633 (C=C), 1460 (C=N). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.93 (s, 1H, NH), 5.76 (s, 1H, H-4), 0.91 (s, 3H, CH_3 -19), 0.88 (d, 3H, $J_{20-21}=6.5$ Hz, CH_3 -21), 0.84 (d, 3H, $J_{26,27-25}=6.5$ Hz, CH_3 -26 o CH_3 -27), 0.83 (d, 3H, $J_{26,27-25}=6.5$ Hz, CH_3 -26 o CH_3 -27), 0.65 (s, 3H, CH_3 -18); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 173.4 (C-3), 154.2 (C-6), 149.2 (C-5), 119.1 (C-4), 55.8 (C-14), 54.8 (C-17), 49.6 (C-9), 42.1 (C-13), 41.0 (C-24), 40.1 (C-12), 35.5 (C-1), 35.2 (C-22), 34.0 (C-20), 33.5 (C-2), 27.4 (C-10), 27.3 (C-25), 24.9 (C-16), 24.8 (C-15), 23.2 (C-26 o 27), 22.7 (C-8), 22.4 (C-7), 19.9 (C-23), 18.4 (C-21), 18.1 (C-19), 11.6 (C-18). ESI-MS calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 429.3436, encontrado: 429.3473.

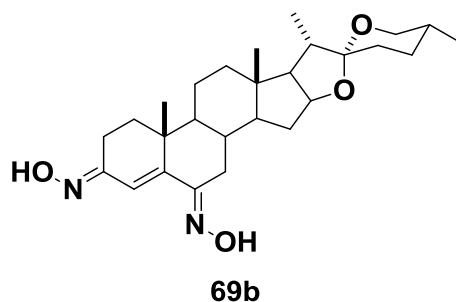
8.4 Procedimiento para generar al (25*R*)-espirost-4-en-3,6-diona (43b)



En un matraz de bola de 100 mL se disolvió a **63** (1 g, 2.41 mmol) en una mezcla de acetona/CH₂Cl₂ (10/15 mL), se adicionó el reactivo de Jones gota a gota (4.5 mL, 2.18 M). La reacción se mantuvo en agitación constante durante 1 h, pasado este tiempo se adicionó alcohol isopropílico (5 mL) virando la reacción de café a verde azulado. Después, el crudo se hizo pasar por una cama de Celita® y florisil® arrastrando el compuesto con CH₂Cl₂. Posteriormente, se llevó a separación por CC utilizando una fase móvil Hex/AcOEt (80:20) y finalmente se evaporó a presión reducida obteniendo a **43b** (1.01 g, 98.3% de rendimiento).

(25*R*)-espirost-4-en-3,6-diona (43b). θ_{mp} . 175-180 °C; IR (cm⁻¹): 1710 (C=O), 1469 (C=C), 1268 (C-O); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.16 (s, 1H, H-4), 4.40 (dd, 1H, $J_{15\alpha-16}=14.8$ Hz, $J_{16-17}=7.2$ Hz, H-16), 3.45 (dd, 1H, $J_{25\alpha-26\beta}=4.4$ Hz, $J_{26\beta-26\alpha}=11$ Hz, H-26 β), 3.34 (dd, 1H, $J_{25\alpha-26\alpha}=J_{26\beta-26\alpha}=11$ Hz, H-26 α), 2.68 (d, 1H, $J_{7\beta-7\alpha}=14$ Hz, $J_{7\beta-8}=2.0$ Hz, H-7), 1.16 (s, 3H, CH₃-19), 0.96 (d, 3H, $J_{20-21}=7.2$ Hz, CH₃-21), 0.81 (s, 3H, CH₃-18), 0.77 (d, 3H, $J_{25-27}=6.4$, CH₃-27); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 201.9 (C-6), 199.4 (C-3), 160.6 (C-5), 125.6 (C-4), 109.3 (C-22), 80.2 (C-16), 66.9 (C-26), 61.8 (C-17), 56.2 (C-14), 50.8 (C-9), 46.8 (C-20), 41.6 (C-7), 40.4 (C-13), 39.7 (C-12), 39.1 (C-10), 35.4 (C-1), 33.9 (C-8), 33.6 (C-2), 31.4 (C-15), 31.3 (C-23), 30.2 (C-25), 28.7 (C-24), 20.7 (C-11), 17.5 (C-18), 17.1 (C-27), 16.2 (C-19), 14.4 (C-21); ESI-MS calculado para C₂₇H₃₈O₄ ([M+H]⁺): 427.2804, encontrado: 427.2848.

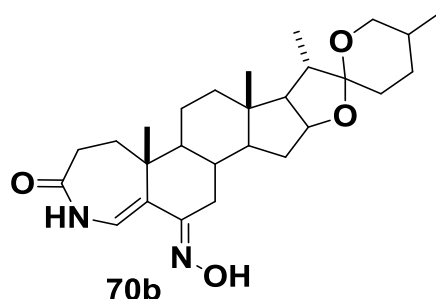
8.5.- Procedimiento para generar al (3E,6E)-3,6-dihidroxiiminoespirost-4-eno (69b)



En un matraz de bola de 100 mL se disolvió a **43b** (0.5 g, 1.17 mmol) en etanol (20 mL), luego se adicionó $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (0.244 g, 3.52 mmol) y NaOAc (0.288 g, 3.51 mmol) a la mezcla. La reacción se mantuvo a reflujo hasta el consumo de la materia prima (1 h). Para terminar la reacción se añadió ésta a un matraz Erlenmeyer con agua fría (10 mL), la mezcla se mantuvo en refrigeración por 12 h, lo que favoreció la formación de un precipitado blanco. Por último, se realizó la purificación del precipitado por CC empleando como fase móvil una mezcla Hex/AcOEt (60:40) obteniendo a **69b** (0.47 g, 90% de rendimiento).

(3E,6E)-3,6-dihidroxiiminoespirost-4-eno (69b). θ_{mp} 170-180 °C; IR (cm^{-1}): 3206 (OH), 2923 (C-H), 1646 (C=N), 1454 (C=C), 1051 (C-O), 867 (N-O); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.46 (s, 1H, H-4), 4.40 (dd, 1H, $J_{15\alpha-16}=14.6$ Hz, $J_{16-17}=7.0$ Hz, H-16), 3.45 (dd, 1H, $J_{25\alpha-26\beta}=2.8$ Hz, $J_{26\beta-26\alpha}=8.0$ Hz, H-26 β), 3.35 (dd, 1H, $J_{25\alpha-26\alpha}=8.2$ Hz, $J_{26\alpha-26\beta}=16.6$ Hz, H-26 α), 3.33 (dd, 1H, $J_{7\beta-7\alpha}=15.0$ Hz, $J_{7\beta-8\beta}=4.5$ Hz, H-7 β) 3.06 (d, 1H, $J=20.5$ Hz, H-2); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 156.6 (C-6), 154.2 (C-3), 147.0 (C-5), 119.5 (C-4), 109.4 (C-22), 80.6 (C-16), 66.8 (C-26), 61.8 (C-14), 56.3 (C-17), 51.1 (C-9), 41.6 (C-20), 40.4 (C-13), 39.4 (C-1), 38.3 (C-10), 33.5 (C-12), 32.5 (C-8), 31.5 (C-15), 31.2 (C-23), 30.2 (C-25), 29.8 (C-7), 28.7 (C-24), 21.0 (C-11), 18.6 (C-2), 17.5 (C-19), 17.1 (C-27), 16.3 (C-18), 14.4 (C-21). ESI-MS calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 457.3022, encontrado: 457.3070.

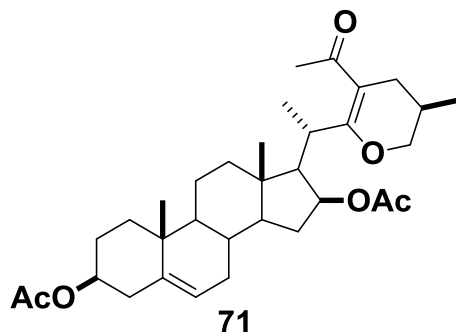
8.6.- Procedimiento para generar al 3-aza-3-oxo-6-hidroxiimino-A-homoespirost-4-eno (70b)



En un matraz de bola de 50 mL se disolvió a **69b** (0.1 g, 0.219 mmol) en dioxano (3 mL), luego se adicionó SOCl_2 (0.06 mL, 0.84 mmol). La reacción se mantuvo en agitación constante hasta el consumo de la materia prima. Posteriormente, el crudo se vertió a un matraz Erlenmeyer con agua. La disolución fue neutralizada con hidróxido de amonio y extraída con CH_2Cl_2 (3 x 20 mL), la fase orgánica fue lavada con solución saturada de NaCl (2 x 30 mL), NaHCO_3 (1 x 20 mL) y un último lavado con agua (1 x 30 mL). Se retiró el agua remanente con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo se purificó por CC utilizando como fase móvil una mezcla Hex/AcOEt (20:80), obteniendo a **70b** (0.044 g, 45% de rendimiento).

3-aza-3-oxo-6-hidroxiimino-A-homoespirost-4-eno (70b). IR (cm^{-1}): 3273 (N-H), 1667 (C=O), 1629 (C=C), 1165 (C-O), 979 (C-N); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.21 (s, 1H, OH), 7.72 (s, 1H, NH), 5.93 (s, 1H, H-4), 4.33 (dd, 1H, $J_{15\alpha-16}=16$ Hz, $J_{16-17}=7.6$ Hz, H-16), 3.45 (dd, 1H, $J_{25\alpha-26\beta}=5.2$ Hz, $J_{26\beta-26\alpha}=4.4$ Hz, H-26 β), 3.34 (dd, 1H, $J_{25\alpha-26\alpha}=J_{26\alpha-26\beta}=11.2$ Hz, H-26 α), 2.92 (dd, 1H, $J_{7\beta-7\alpha}=18.2$ Hz, $J_{7\beta-8\alpha}=3.2$ Hz, H-7), 1.03 (s, 3H, CH_3 -19), 0.93 (d, 3H, $J_{20-21}=7.6$ Hz, CH_3 -21), 0.77 (s, 3H, CH_3 -18), 0.76 (d, 3H, $J_{25-27}=6.4$ Hz, CH_3 -27); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 175.5 (C-3), 155.9 (C-6), 149.6 (C-5), 120.2 (C-4), 109.1 (C-22), 79.8 (C-16), 66.9 (C-26), 62.3 (C-17), 55.4 (C-14), 50.5 (C-9), 41.8, 50.0, 40.5, 40.2, 39.7, 33.9, 33.5, 32.5, 31.3, 30.2, 28.7, 22.8, 20.1, 18.3, 17.1, 16.2, 14.5; ESI-MS calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 457.3022, encontrado: 427.2848.

8.7.- Procedimiento para generar al diacetato de (25*R*)-23-acetil-22,26-epoxicolest-5,22-dien-3 β ,16 β -diilo (71)

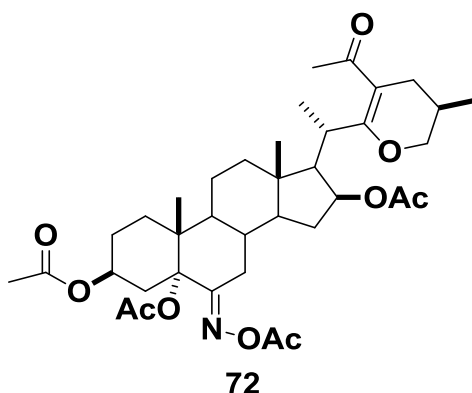


En un matraz de bola de 250 mL se disolvió a **63** (1 g, 2.41 mmol) en anhídrido acético glacial (10 mL), se adicionó BF₃·OEt₂ (3 mL) y se dejó en agitación constante durante 50 min. La reacción se terminó adicionándola en un matraz Erlenmeyer con agua fría y se dejó en agitación durante 24 h. Se realizaron extracciones con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL), la fase orgánica resultante se lavó con solución saturada de NaCl (2 x 30 mL) y con agua (1 x 30 mL). Por último, la fase orgánica se secó utilizando Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a presión reducida. Se purificó el crudo por CC, utilizando una fase móvil de Hex/AcOEt con una proporción 85:15 y 50:50, obteniendo a **71** (1.2 g, 90.6% de rendimiento).

Diacetato de (25*R*)-23-acetil-22,26-epoxicolest-5,22-dien-3 β ,16 β -diilo (71). θ_{mp} 86-90 °C; IR (cm⁻¹): 1732 (C=O, éster), 1680 (C=O), 1571 (C=C), 1243 (C-O), 1025 (C-H); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.58 (d, 1H, J_{6-7} = 8 Hz, H-6), 5.14 (ddd, 1H, $J_{15\beta-16}$ = 3.5 Hz, $J_{15\alpha-16}$ = J_{16-17} = 8 Hz, H-16), 4.57 (m, 1H, H-3), 4.08 (m, H-1, H-20), 3.95 (dd, 1H, $J_{25-26\beta}$ = 3.5 Hz, $J_{26\alpha-26\beta}$ = 10.5 Hz, H-26 β), 3.41 (dd, 1H, $J_{26\alpha-25}$ = $J_{26\beta-26\alpha}$ = 10.5 Hz, H-26 α), 2.17 (s, 3H, CH₃-23²), 2.00 (s, 3H, CH₃CO₂-3), 1.80 (s, 3H, CH₃CO₂-16), 1.21 (d, 3H, J_{20-21} = 7.0 Hz, CH₃-21), 1.11 (s, 3H, CH₃-19), 0.98 (d, 3H, J_{25-27} = 8.0 Hz), 0.87 (s, 3H, CH₃-18); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 198.2 (C-23¹), 171.4 (C-22), 170.7 (CH₃COO-3), 170.6 (CH₃COO-16), 139.7 (C-5), 122.2 (C-6), 106.9 (C-23), 86.1 (C-16), 73.8 (C-3), 71.3 (C-26), 55.9 (C-17), 54.2 (C-14), 50.0 (C-9), 42.2 (C-13), 39.7 (C-12), 38.0 (C-4), 36.9 (C-1), 36.5 (C-10), 34.8 (C-15), 32.9 (C-20), 31.6 (C-24), 31.5 (C-7), 31.3 (C-8), 29.8 (C-23²), 27.7 (C-2), 26.5 (C-25),

21.2 (CH₃COO-3), 21.0 (CH₃COO-26), 20.8 (C-11), 19.4 (C-21), 19.3 (C-19), 16.8 (C-27), 12.9 (C-18); ESI-MS calculado para C₃₃H₄₈O₆ ([M+H]⁺): 541.3484, encontrado: 541.3525.

8.8.- Procedimiento para generar al diacetato de (25*R*)-23-acetil-6-acetoxiimino-22,26-epoxicolest-5,22-dien-3 β ,16 β -diilo (72)

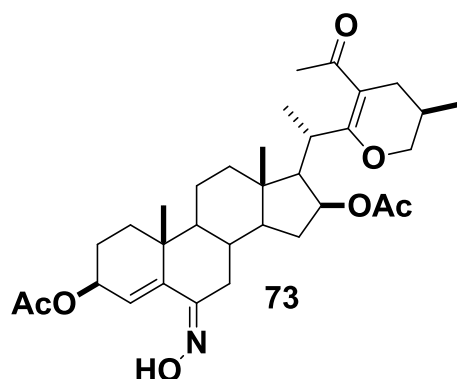


En un matraz de bola de 100 mL se disolvió a **71** (0.894 g, 1.65 mmol) en anhídrido acético glacial (15 mL), luego se adicionaron BF₃·OEt₂ (1.6 mL), AcOH (5 mL) y NaNO₂ (0.91 g, 13.19 mmol), el cual se agregó en lapsos de 15 min completando un tiempo de 3 h. La reacción se terminó adicionándola en un matraz Erlenmeyer con agua fría y se dejó en agitación durante 24 h. Se realizaron extracciones con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL), la fase orgánica resultante se lavó con solución de NaHCO₃ (2 x 30 mL), solución saturada de NaCl (2 x 30 mL) y con agua (2 x 30 mL). Después, la fase orgánica se secó utilizando Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a presión reducida. Por último, se purificó el crudo por CC, utilizando una fase móvil de Hex/AcOEt (60:40) obteniendo a **72** (0.745 g, 83.3% de rendimiento).

Diacetato de (25*R*)-23-acetil-6-acetoxiimino- 22,26-epoxicolest-5,22-dien-3 β ,16 β -diilo (72). θ_{mp} = 135-145 °C; IR (cm⁻¹): 1735 (C=O, éster), 1727 (C=O), 1660 (C=N), 1569 (C=C), 1371 (N-O), 1239 (C-O), 736 (C-H); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.11 (ddd, 1H, $J_{15\beta-16}$ = 4.5 Hz, $J_{15\alpha-16}$ = J_{16-17} = 8.3 Hz, H-16), 4.82 (m, 1H, H-3), 4.07 (m, 1H, H-20), 3.96 (dd, 1H, $J_{25-26\beta}$ = 2.5 Hz, $J_{26\alpha-26\beta}$ = 13.5 Hz, H-26 β), 3.42 (dd, 1H, $J_{26\alpha-25}$ = $J_{26\beta-26\alpha}$ = 11 Hz, H-26 α), 3.04 (dd, 1H, $J_{7\alpha-7\beta}$ = 13.8 Hz, $J_{7\beta-8}$ = 4.0 Hz, H-7 β), 2.66 (ddd, 1H, $J_{4\beta-4\alpha}$ = 14.2 Hz, $J_{3\alpha-4\alpha}$ = 3.5 Hz, $J_{2\alpha-4\alpha}$ = 1.0 Hz, H-4 β), 2.17 (s, 3H, CH₃CO₂-N), 2.16 (s, 3H, CH₃-23²), 2.08 (s, 3H, CH₃CO₂-5), 1.97 (s, 3H, CH₃CO₂-3), 1.83 (s, 3H, CH₃CO₂-16), 1.14 (d, 3H, J_{20-21} = 7 Hz, CH₃-21), 0.94 (d, 3H, J_{25-27} = 6 Hz, CH₃-27), 0.89 (s, 3H, CH₃-19), 0.86 (s, 3H, CH₃-18); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ : 198.3 (C-23¹), 170.9 (C-22), 170.6 (CH₃CCOO-16), 170.5 (CH₃CCOO-3), 169.3 (CH₃CCOO-N), 169.2 (CH₃CCOO-5), 165.2 (C-6), 106.9 (C-23), 86.0 (C-5), 74.6 (C-16), 71.5 (C-3), 69.4 (C-26), 55.8 (C-17), 53.8 (C-14), 45.6 (C-9), 43.2 (C-10), 43.0 (C-13), 39.5 (C-12), 35.6 (C-8), 34.5 (C-15), 32.7 (C-20), 31.6 (C-24), 30.3 (C-1), 29.7 (C-23²), 29.7 (C-4), 29.6 (C-11), 28.2 (C-7), 26.5 (C-25); 26.2 (C-2), 21.5 (CH₃COO-5), 21.2 (CH₃COO-3), 21.1 (CH₃COO-16), 20.0 (CH₃COO-N), 19.3 (C-21), 16.8 (C-27), 14.2 (C-19), 13.2 (C-18); ESI-MS calculado para C₃₇H₅₃NO₁₀ ([M+H]⁺): 672.3703, encontrado: 672.3525.

8.9.- Procedimiento para generar al diacetato de (6Z)-23-acetil-22,26-epoxi-6-hidroxiiminocolest-4,22-dien-3 β ,16 β -diilo (73)



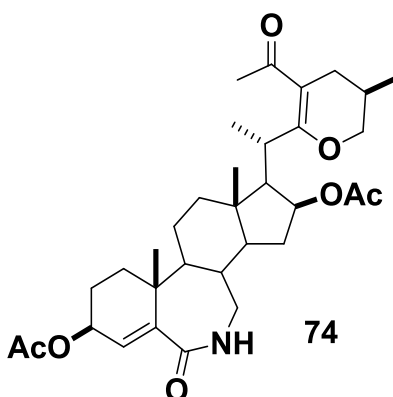
En un matraz balón de 100 mL se disolvió a **72** (0.15 g, 0.22 mmol) en una mezcla de MeOH-CH₂Cl₂ (1:1) (10mL), se adicionó Na₂CO₃ (0.14 g, 1.32 mmol) y se mantuvo a reflujo por 6 h. La reacción se terminó adicionándola a un matraz con agua fría. Después, se realizaron extracciones con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL), la fase orgánica recolectada se lavó con agua (2 x 30 mL), solución salina saturada (1 x 10 mL), luego se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. La purificación del crudo se llevó a cabo por CC utilizando como fase móvil un sistema a gradiente Hex/AcOEt (6:4, 5:5 y 4:6), obteniendo a **73** (0.04 g, 32% de rendimiento).

(6Z)-23-acetil-22,26-epoxi-6-hidroxiiminocolest-4,22-dien-3 β ,16 β -diilo (73).

θ_{mp} = 185°C; IR (cm⁻¹): 3400 (O-H), 2900 (C-H), 1731 (C=O), 1568 (C=N), 1448 (C=C), 1373 (N-O), 1235 (C-O). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.27 (s, 1H, OH), 5.63 (s, 1H, H-4), 5.16 (ddd, 1H, $J_{15\beta-16}$ = 1.5 Hz, $J_{15\alpha-16}$ = J_{16-17} = 6 Hz, H-16), 4.96 (m, 1H, H-3), 3.97 (m, 2H, H-20, H-26 β), 3.38 (dd, 1H, $J_{25-26\alpha}$ = $J_{26\beta-26\alpha}$ = 10 Hz, H-26 α), 2.33 (dd, 1H, $J_{7\alpha-7\beta}$ = 15.7 Hz, $J_{7\beta-8}$ = 4.0 Hz, H-7 β), 2.12 (s, 3H, CH₃-23²), 2.02 (s, 3H, CH₃CO₂-3), 1.77 (s, 3H, CH₃CO₂-16), 1.09 (d, 3H, J_{20-21} = 7 Hz, CH₃-21), 0.90 (d, 3H, J_{25-27} = 6.5 Hz, CH₃-27), 0.88 (s, 3H, CH₃-19), 0.82 (s, 3H, CH₃-18). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 197.7 (C-23¹), 170.2 (C-22), 169.7 (CH₃C=O-3), 169.3 (CH₃C=O-16), 151.8 (C-6), 138.5 (C-5), 125.8 (C-4), 106.8 (C-23), 74.1 (C-16), 70.8 (C-3), 69.6 (C-26), 55.2 (C-17), 52.8 (C-14), 41.9 (C-9), 39.5 (C-12), 38.2 (C-13), 37.8 (C-1), 35.1 (C-10), 34.3 (C-15), 33.5 (C-20), 33.2 (C-24), 32.1 (C-7), 30.6 (C-

8), 29.6 (C-23²), 26.0 (C-2), 24.1 (C-25), 21.0 (CH₃COO-3), 20.8 (CH₃COO-16), 20.3 (C-11), 19.2 (C-21), 18.2 (C-19), 16.6 (C-27), 12.8 (C-18). ESI-MS calculado para C₃₃H₄₇NO₇ ([M+H]⁺): 570.3386, encontrado: 510.3225, 570.3435.

8.10.- Procedimiento para generar al diacetato de (25*R*)-23-acetil-6a-aza-22,26-epoxi-6-oxo-B-homocolest-5,22-dien-3β,16β-diilo (74)

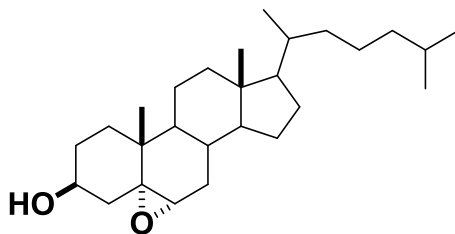


En un matraz balón de 50 mL se disolvió a **73** (0.18 g, 0.22 mmol) en dioxano (2 mL), luego se adicionó SOCl_2 (0.09 mL) a temperatura ambiente y en agitación por 1 h. La reacción se terminó añadiéndola a un matraz Erlenmeyer con agua, después, se realizaron extracciones con AcOEt (3 x 20 mL). La fase orgánica recolectada se lavó con una solución salina saturada (1 x 50 mL) y agua (2 x 20 mL). Posteriormente, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a presión reducida. La purificación del crudo de reacción se llevó a cabo por CC utilizando una fase móvil a gradiente (Hex/AcOEt) obteniendo a **74** (0.1 g, 55.5% de rendimiento).

Diacetato de (25*R*)-23-acetil-6a-aza-22,26-epoxi-6-oxo-B-homocolest-5,22-dien-3β,16β-diilo (74). $\theta_{\text{mp}} = 140^\circ\text{C}-146^\circ\text{C}$; IR (cm^{-1}): 1733 (C=O, éster), 1659 (C=O), 1568 (C=O), 746 (=C-H). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.23 (dd, 1H, $J_{7\alpha-\text{NH}} = J_{7\beta-\text{NH}} = 3$ Hz, NH), 5.93 (d, 1H, $J_{3\alpha-4} = 3$ Hz, H-4), 5.24 (dd, 1H, $J_{2\alpha-3\alpha} = J_{3\alpha-4} = 4.2$ Hz, H-3), 5.06 (ddd, 1H, $J_{15\beta-16} = 4$ Hz, $J_{15\alpha-16} = J_{16-17} = 7.7$ Hz, H-16), 4.08 (m, 1H, H-20), 3.96 (dd, 1H, $J_{25-26\beta} = 2.5$ Hz, $J_{26\alpha-26\beta} = 10.5$ Hz, H-26β), 3.41 (dd, 1H, $J_{25-26\alpha} = J_{26\beta-26\alpha} = 10$ Hz, H-26α), 2.94 (dd, 1H, $J_{\text{NH}-7\alpha} = 7.5$ Hz, $J_{7\beta-7\alpha} = 13.5$ Hz, H-7α), 2.79 (ddd, 1H, $J_{7\alpha-7\beta} = 15.0$ Hz, $J_{\text{NH}-7\beta} = 4$ Hz, $J_{7\alpha-7\beta} = J_{7\beta-8\beta} = 10.5$ Hz, H-7β), 2.16 (s, 3H, C-23²), 2.01 (s, 3H, CH_3CO_2 -3), 1.82 (s, 3H, CH_3CO_2 -16), 1.13 (d, 3H, $J_{20-21} = 6.5$ Hz, CH_3 -21), 1.10 (s, 3H, CH_3 -19), 0.93 (d, 3H, $J_{25-27} = 6.5$ Hz, CH_3 -27), 0.89 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 198.3 (C-23¹), 174.8 (C-6), 170.8 (C-22), 170.6 (CH_3COO -3), 170.5 (CH_3COO -16), 149.8 (C-5), 125.1 (C-4), 106.9 (C-23), 74.5 (C-

16), 71.5 (C-26), 65.0 (C-3), 55.9 (C-17), 50.6 (C-14), 50.5 (C-9), 46.5 (C-7), 42.5 (C-13), 39.5 (C-12), 38.7 (C-8), 36.4 (C-10), 35.4 (C-15), 32.7 (C-20), 31.5 (C-24), 30.1 (C-1), 29.7 (C-23²), 26.5 (C-25), 23.6 (C-2), 22.5 (C-11), 21.3 (CH₃COO-3), 21.1 (CH₃COO-16), 19.9 (C-19), 19.2 (C-21), 16.8 (C-27), 12.9 (C-18). ESI-MS calculado para C₃₃H₄₇NO₇ ([M+H]⁺): 570.3386, encontrado: 510.3216, 592.3242.


8.11 Procedimiento para generar el 5 α ,6 α -epoxicolestan-3 β -ol (75)



75

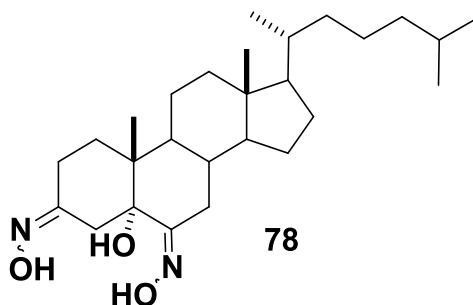
En un matraz balón de 100 mL se disolvió a **40** (1.0 g, 2.38 mmol) en CHCl₃ (13 mL), dejando la disolución en un baño de hielo hasta alcanzar los 0 °C. Mientras que, en un segundo matraz se disolvió *m*CPBA (1.0 g, 6.72 mmol) en CHCl₃ (40 mL). Posteriormente, la mezcla de *m*CPBA se adicionó al matraz balón gota a gota; con ayuda de un embudo de separación. Después de añadido la disolución de *m*CPBA, se dejó la reacción por 6 h y se volvió a poner en un baño de hielo añadiendo lentamente una disolución al 5% de Na₂SO₃ dejando en agitación por 2 h más. Se realizaron extracciones con CHCl₃ (3 x 20 mL) y la fase orgánica recolectada se lavó con solución salina saturada (1 x 50 mL) y agua (2 x 20 mL). Posteriormente, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a presión reducida. Finalmente, la purificación del crudo de reacción se llevó a cabo por CC utilizando como fase móvil a Hex/AcOEt (55:45), obteniendo a **75** (99% de rendimiento).

5 α ,6 α -epoxicolestan-3 β -ol (75). θ_{mp} = 155°C-160°C; IR (cm⁻¹): 3392 cm⁻¹ (O-H), 1369 cm⁻¹ (C-O-C, asimétrica), 1059 cm⁻¹ (C-O-C, simétrica), 1039 cm⁻¹ (C-O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.90 (m, 1H, H-3), 2.90 (d, 1H, H-6 β), 1.05 (s, 3H, CH₃-19), 0.88 (d, 3H, J_{20-21} = 5.2 Hz, CH₃-21), 0.86 (d, 3H, $J_{25-26,27}$ = 5.6 Hz, CH₃-26 o CH₃-27), 0.84 (d, 3H, $J_{25-26,27}$ = 5.6 Hz, CH₃-26 o CH₃-27), 0.60 (s, 3H, CH₃-18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 68.7 (C-3), 65.7 (C-5), 59.3 (C-6), 56.8 (C-14), 55.8 (C-17), 51.3 (C-9), 42.5 (C-13), 39.8 (C-12), 39.5 (C-4), 39.4 (C-24), 36.1 (C-22), 35.7 (C-20), 34.8 (C-10), 32.4 (C-1), 31.0 (C-7), 29.9 (C-2), 29.7 (C-8), 28.1 (C-16), 28.0 (C-



25), 24.0 (C-15), 23.8 (C-23), 22.8 (C-26), 22.5 (C-27), 20.6 (C-11), 18.6 (C-21),
15.9 (C-19), 11.8 (C-18).

8.12.- Procedimiento para generar el (3Z,6Z)-3,6-dihidroxiimino-5 α -colestan-5-ol (**78**)

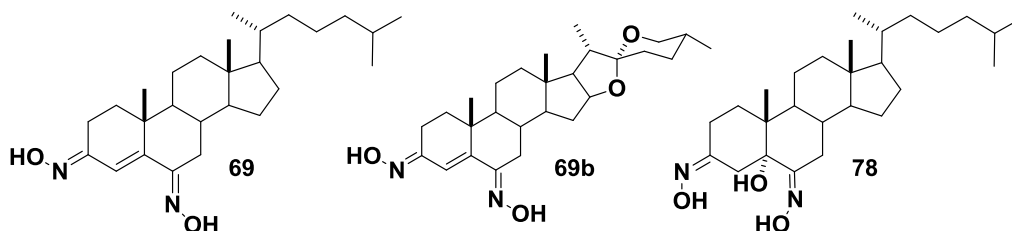


En un matraz balón se disolvió a **77** (0.075 g, 0.18 mmol) en metanol (30 mL), se adicionó $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (0.086 g, 1.24 mmol) y NaOAc (0.1 g, 1.22 mmol) y se colocó a reflujo por 4 h. Luego, la mezcla se añadió a un vaso de precipitados con agua fría observándose la formación de un precipitado. Posteriormente, se realizaron extracciones líquido-líquido utilizando como disolvente orgánico al AcOEt (3 x 30 mL), la fase orgánica se lavó con solución saturada de NaCl (2 x 10 mL) y agua (1 x 20 mL). Después, la fase orgánica se secó utilizando Na_2SO_4 anhidro y se llevó a sequedad a presión reducida. El crudo se purificó por CC utilizando una fase móvil Hex/AcOEt (5:5), obteniendo a **78** (0.04 g, 49% de rendimiento).

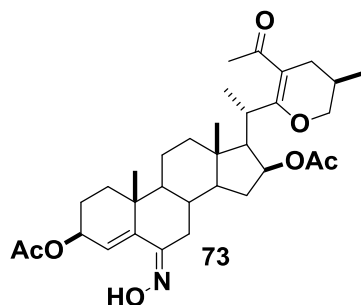
(3Z,6Z)-3,6-dihidroxiimino-5 α -colestan-5-ol (78**)**. IR (cm^{-1}): 3580-3114 (O-H), 1663 (C=N), 1459 (N-O), 1371 (C-N); ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ : 10.52 (s, 1H, NOH), 10.07 (s, 1H, NOH), 4.87 (s, 1H, OH), 2.99 (m, 2H, H-4 α , H-4 β), 2.24 (d, 1H, H-7), 1.24 (d, 1H, H-2), 0.88 (d, 3H, $J_{21-20} = 6.0$ Hz, CH_3 -21), 0.84 (d, 3H, $J_{26,27-25} = 2.5$ Hz, CH_3 -26 o CH_3 -27), 0.85 (d, 3H, $J_{26,27-25} = 2.5$ Hz, CH_3 -26 o CH_3 -27), 0.79 (s, 3H, CH_3 -19), 0.61 (s, 3H, CH_3 -18). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ : 159.2 (C-6), 155.9 (C-3), 75.5 (C-5), 55.9 (C-14), 55.6 (C-17), 44.4 (C-9), 42.5 (C-13), 41.5 (C-24), 40.1 (C-12), 38.9 (C-10), 35.6 (C-22), 35.2 (C-20), 34.5 (C-8), 31.2 (C-1), 29.3 (C-4), 27.9 (C-25), 27.4 (C-2), 24.8 (C-16), 23.7 (C-15), 22.7 (C-23), 22.4 (C-26, C-27), 20.9 (C-11), 19.2 (C-7), 18.5 (C-21), 13.4 (C-19), 11.8 (C-18). ESI-MS calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 447.3542, encontrado: 447.3578.

9. CONCLUSIONES

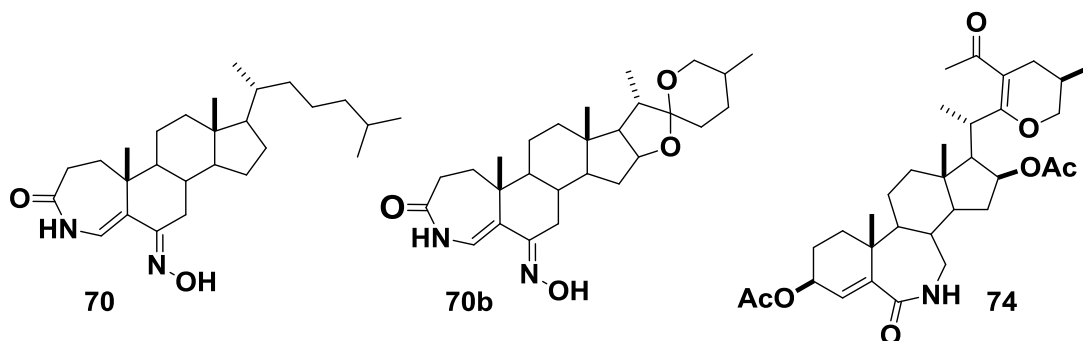
Se sintetizaron tres derivados 3,6-dihidroxiiminos (**69**, **69b** y **78**), dos de los cuales se obtuvieron a partir de colesterol y uno a partir de diosgenina. El mejor resultado de actividad citotóxica de este grupo frente a la línea celular MCF-7 lo mostró la dioxima **69** con un $CI_{50}=8.2 \mu\text{M}$, mientras que el derivado **78** exhibió un $CI_{50} = 25.5 \mu\text{M}$, revelando que el grupo hidroxilo en C-5 le resta actividad citotóxica. Así mismo, fue posible observar que la cadena lateral del colesterol es una característica estructural importante para la actividad biológica dado que al pasar de la cadena lateral colestánica a espiroestánica también provoca una disminución en la actividad teniendo un valor de $CI_{50} = 41.6 \mu\text{M}$.



Dentro del grupo de las oximas esteroidales, se realizó la síntesis y evaluación de la actividad citotóxica de **73**, que estructuralmente se caracteriza por contener un grupo epóxido en la cadena lateral y un grupo hidroxiiimino en el anillo B; se sintetizó en una secuencia de tres pasos a partir de diosgenina y no ha sido previamente reportado en la literatura. **73** fue el compuesto que mostró el mejor valor de actividad citotóxica frente a la línea cancerosa MCF-7 de todos los derivados obtenidos en este trabajo, con valor de $CI_{50} = 7.9 \mu\text{M}$.



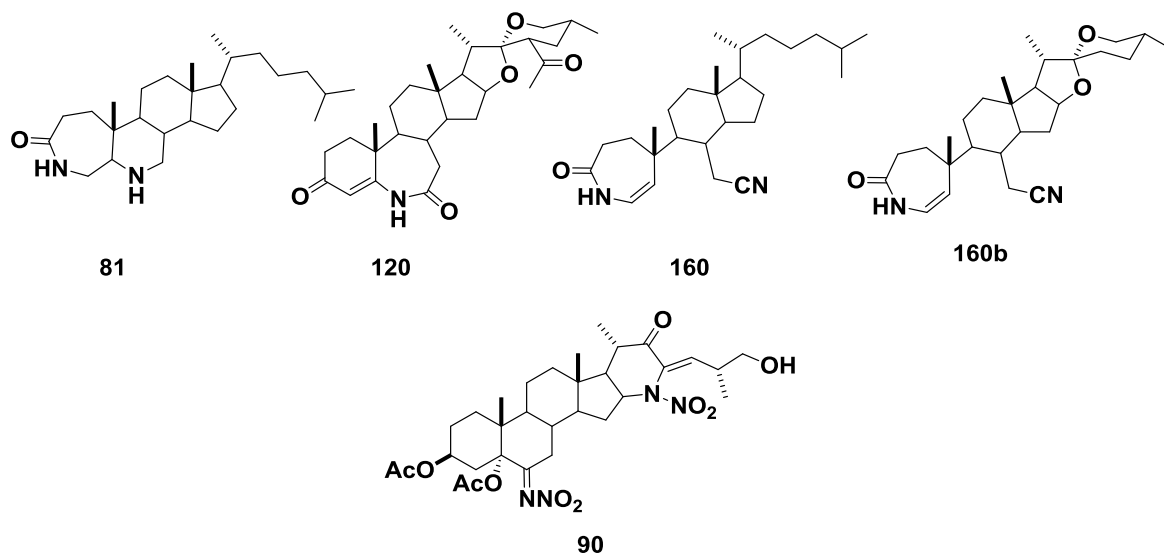
Se sintetizaron tres lactamas (**70**, **70b** y **74**), dos A-homolactamas (**70** y **70b**) y una B-homolactama (**74**). Las A-homolactamas además poseen un grupo oxima en el anillo B y se obtuvieron en una secuencia de tres pasos partiendo de colesterol y diosgenina, el mejor valor obtenido de citotoxicidad frente a la línea tumoral humana MCF-7, lo exhibió la A-homolactama **70b** ($\text{CI}_{50} = 9.5 \mu\text{M}$), cuya cadena lateral es de tipo espirostánica y en menor grado el compuesto **70** ($\text{CI}_{50} = 33.3 \mu\text{M}$). Por su parte la B-homolactama **74** mostró un valor de citotoxicidad regular ($\text{CI}_{50} = 51.5 \mu\text{M}$), mostrando que el cambio de oxima a lactama le restó actividad citotóxica (**74** vs **73**)



Aunado a esto, las CMSP presentaron baja o nula sensibilidad a los compuestos evaluados ($\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{M}$), indicando con ello que los productos con oxima y lactama presentan cierta selectividad al dañar en mayor proporción a las células cancerosas. En consecuencia, resulta de gran interés el seguimiento a estos compuestos y a modificaciones subsecuentes para el desarrollo de alternativas contra el cáncer de mama.

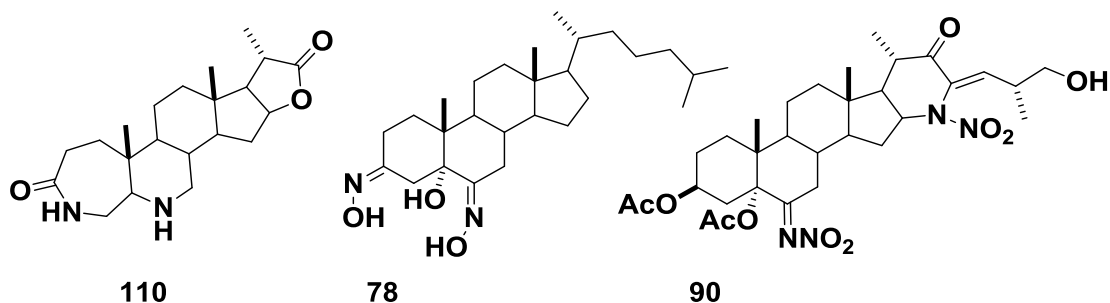
Se realizó el acoplamiento molecular de 4 enzimas relacionadas con la biosíntesis de hormonas esteroideas (5β -reductasa, 17β -HSD, CYP19A1 y CYP17A1), que a su vez son considerados como blancos terapéuticos contra diversos padecimientos como el cáncer, con 18 compuestos oxima y lactamas derivados del colesterol y la diosgenina. En donde los resultados expresaron una afinidad frente a dos de ellas (17β -HSD y CYP17A1), mostrando valores de energía de Gibbs cercanas al ligando cristalizado de cada una de las enzimas.

Los ligandos con mejores valores de afinidad para la enzima 17β -HSD fueron **81** (-9.9 Kcal/mol), **160b** (-9.4 Kcal/mol), **120** (9.1 Kcal/mol) y **160** (-9.0 Kcal/mol), los cuales no fueron sintetizados en este trabajo y, por tanto, resulta de gran interés la síntesis y la evaluación *in vitro* como inhibidor y/o antiproliferativo. El ligando **90** obtuvo el valor de energía más bajo (-6.7 Kcal/mol), destacando con ello que los grupos nitro restan afinidad frente a diversos residuos de aminoácidos sin dejar de mencionar que dichos grupos le confieren rotabilidad a la molécula; lo que posiblemente genere múltiples interacciones desfavorables.



Con respecto a la enzima CYP17A1, los ligandos con mejores resultados de afinidad fueron **110** (-12.1 Kcal/mol), **81** (-11.0 Kcal/mol), **160b** (-10.8 Kcal/mol), **78** (-10.3 Kcal/mol) y **160** (-10.1 Kcal/mol). Para estos ligandos el poseer una lactama en el anillo A y un grupo amino o seco-nitrilo en el anillo B, les confiere una mayor

interacción con los residuos de aminoácidos de la enzima y aún más al poseer un grupo lactona en el anillo E como lo es en el caso de **110**. Nuevamente, el ligando **90** (-6.3 Kcal/mol) obtuvo el valor más bajo de afinidad con respecto al resto de los grupos oxima y lactama.



El análisis *in silico* reveló que **69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81, 81b, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160** y **160b** presentan características farmacocinéticas favorables como una buena difusión pasiva atribuyendo a ser buenos candidatos a fármacos por vía oral. Así mismo, no presentan toxicidad ni cardiotoxicidad al mostrar una baja inhibición del canal HERG (human ether-a-go-go-related gene, por sus siglas en inglés), el cual es un parámetro importante para decidir si se continúa la investigación en los compuestos que prometen ser candidatos a fármacos. Además, estos derivados son metabolizados por la enzima CYP3A4 (perteneciente al grupo de las oxidasas y una de las más importantes para el metabolismo de xenobióticos en el organismo). Por tanto, el que no posean un efecto inhibitor da la pauta a predecir una nula acumulación en el organismo y su eliminación una vez realizada su función. Los resultados de acoplamiento y de actividad antiproliferativa se complementan con los resultados obtenidos mediante el programa PASS online prediciendo a los ligandos como potenciales agentes inhibidores de las enzimas 17β -HSD y CYP17A1 y como agentes antiproliferativos potenciales.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez, P.R. "Nuevas metodologías para la síntesis de azaesteroides". Tesis de doctorado. Facultad de ciencias químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. **2017**.
2. Moss, G.P. Nomenclature of steroids. *Pure & Appl. Chem.* **1989**, 61: 1783-1822.
3. Turner, A.B. Steroids: Reactions and Partial Synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **1991**, 6: 17-51.
4. Poirier, D. New Cancer Drugs Targeting the Biosynthesis of Estrogens and Androgens. *Drug Devel. Res.* **2008**, 69: 304-318.
5. Martin-Smith, M; Sugrue, M. Biological activity in steroids possessing nitrogen atoms: recent advances. *J. Pharm. Pharmacol.* **1964**, 16: 569-595.
6. Catsoulacos, P; Wampler, G. Activity of 3 β -hidroxy-13 α -amino-13,17-seco-5 α -androstane-17-oic-13,17-lactam [*p*-(bis(2-chloroethyl) amino)-phenyl] acetate (NSC290205) in murine solid tumors. *Oncology.* **1982**, 39: 109-112
7. Chesnut, W; Durham, N; Brown, A; Mawdsley, A; Berlin, D. "Antibacterial activity of 15-azasteroids alone and in combination with antibiotics." *Steroids.* **1976**, 27.4: 525-541.
8. Ibrahim-Ouali, M; Rocheblave, L. Recent advances in azasteroids chemistry. *Steroids.* **2008**, 73: 375-407.
9. Niño, J; Correa, Y; Mosquera, O. Antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities of 11 solanaceae plants from colombian biodiversity. *Pharm. Biol.* **2006**, 44: 14-18.
10. Friedman, M; Henika, P; Mackey, B. Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, 41: 61-71.

11. Thompson, I; Phyllis, J; Goodman, M; Tangen, C. The Influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*: 215-224.
12. Krstic, N; Bjelakovic, M; Zizak, Z; Pavlovic, M; Juranic, Z; Pavlovic, V. Synthesis of some steroidal oximes, lactams, thiolactams and their antitumor activities. *Steroids.* **2007**, *72*: 406-414.
13. Trafalis; D; Sambani, C; Kapsimali, V; Economidou, J; Politis, G; Catsoulacos, P. Effects of homo-aza-steroids on acute non-lymphocytic leukaemia cell proliferation *in vitro*. *Blackwell Science Ltd.* **1995**, *91*: 907-914.
14. Guo Cui, Jian; Fan, L; Huang, L; Li Liub, H; Zhou, A. Synthesis and evaluation of some steroidal oximes as cytotoxic agents: Structure/activity studies (I). *Steroids.* **2009**, *74*: 62-72.
15. Mebs, D; Pogoda, W. Variability of alkaloids in the skin secretion of the European fire salamander (*Salamandra salamadra terrestris*). *Toxicon.* **2005**, *45*: 603-606.
16. Sabale, P; Prajapati, P; Kalal, G; Nagar, D. Azasteroids as promising neuromuscular blockers: a review. *J. App. Pharm. Sci.* **2012**, *2*: 164-173.
17. Attard, G; Reid, A.H; Auchus, R.J; Hughes, B.A; Cassidy, A.M; Thompson, E; Oommen, N.B; Folkered, E; Dowsett, M; Arlt, W; de Bono, J.S. Clinical and biochemical consequences of CYP17A1 inhibition with abiraterone given with and without exogenous glucocorticoids in castrate men with advanced prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*: 507-16.
18. Singh, R; Panda, G. An overview of synthetic approaches for heterocyclic steroids. *Tetrahedron.* **2013**, *69*: 2853-2884.
19. Kaur, S; Kapoor, V. K; Bhardwaj, T. R; Kaur, M. A facile route for the synthesis of bisquaternary azasteroids. *Int J Pharm Pharm Sci*, **2013**, *5*: 728-732.
20. Burbiel, J; Bracher, F. Azasteroids as antifungals. *Steroids.* **2003**, *68*: 587-594.

21. Xie, W; Peng, H; Kim, D; Kunkel, M; Powis, G; Zalkow, L. Structure-activity relationship of aza-steroids as PI-PLC inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9: 1073-1083.
22. Thomas, S; Yang, X; Sampson, N. Inhibition of the M. tuberculosis 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase by aza-steroids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21: 2216-2219.
23. Cui, J; Huang, L; Fan, L; Zhou, A. A facile and efficient synthesis of some (6E)-hydroximino-4-en-3-one steroids, steroidal oximes from *Cinachyrella* spp. sponges. *Chemistry Faculty Publications.* **2017**, 374.
24. Palmer, R.A; Lisgarten, D.R; Cockcroft, J.K; Lisgarten, J.N; Talbert, R; Dines, T; Bansal, R; Acharya, P; Suryan, A. Crystal and molecular structure and DFT calculations of the steroidal Oxime 6E-hydroximino-androst-4-ene-3,17-dione (C₁₉H₂₅NO₃) a molecule with antiproliferative activity. *J. Chem Crystallography.* **2018**.
25. Zeferino-Díaz, R; Olivera-Castillo, L; Dávalos, A; Grant, G; Kantún-Moreno, N; Rodríguez-Canul, R; Bernès, S; Sandoval-Ramírez, J; Fernández-Herrera, M.A. 22-oxocholestane oximes as potential anti-inflammatory drug candidates. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 1-24.
26. Huang, Y; Chenb, S; Cuib, J; Gan, C; Liu, Z; Weic, Y; Song, H. Synthesis and cytotoxicity of A-homo-lactam derivatives of cholic acid and 7-deoxycholic acid. *Steroids.* **2011**, 76: 690-694.
27. Camoutsis, C; Trafalis, D; Pairas, G; Papageorgiou, A. On the formation of 4-[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]phenyl acetic acid esters of hecogenin and aza-homo-hecogenin and their antileukemic activity. *IL Farmaco.* **2005**, 60: 826-829.
28. Koutsourea, A; Fousteris, M; Arsenou, E; Papageorgiou, A; Pairas, G; Sotiris; Nikolaropoulou, S. Rational design, synthesis, and in vivo evaluation of the antileukemic activity of six new alkylating steroidal esters. *Bioor. Med. Chem.* **2008**, 16: 5207-5215.

29. Dhingra, N; Bhardwaj, T; Mehta, N; Mukhopadhyay, T; Kumar, A; Kumar, M. Synthesis, antiproliferative, acute toxicity and assessment of antiandrogenic activities of some newly synthesized steroidal lactams. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*: 2229-2236.
30. Cui, J; Lin, Q; Gan, C; Zhan, J; Su, W; Zhao, D; Qi, B; Huang, Y. Synthesis and antiproliferative evaluation of some novel B-nor-D-homosteroids. *Steroids*. **2015**, *98*: 138-142.
31. Huang, Y; Cui, J; Zheng, Q; Zeng, C; Chen, Q; Zhou, A. 6-Hydroximino-4-aza-A-homo-cholest-3-one and related analogue as a potent inducer of apoptosis in cancer cells. *Steroids*. **2012**, *77*: 829-834.
32. Trafalis, D; Geromichalou, E; Dalezis, P; Nikoleousakos, N; Sarli, V. Synthesis and evaluation of new steroidal lactam conjugates with aniline mustards as potential antileukemic therapeutics. *Steroids*. **2016**, *115*: 1-8.
33. Cui, J; Lin, Q; Gan, C; Yao, Q; Su, W; Huang, Y. Synthesis and cytotoxic activity of some 4,6-diaza-A,B-dihomo-steroid bilactams. *Steroids*. **2014**, *79*: 14-18.
34. Dwivedy, I; Singh, A; Singh, M; Ray, S. Synthesis of novel 6-aza-B- and 11-aza-C-homoestrans as antifertility agents. *Steroids*. **1993**, *58*: 69-73.
35. Shroff, A; Harper, C; Allen, G; Blye, R. Synthesis and Antifertility Activity of Some Oximinoandrostenes. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*: 113-115.
36. Lopez, Y; Ruiz-Perez, K; Yopez, R; Santillana, R; Flores-Alamo, M; Iglesias-Arteaga, M. Mechanistic insights and new products of the reaction of steroid sapogenins with NaNO₂ and BF₃. Et₂O in acetic acid. *Steroids*. **2008**, *73*: 657-668.
37. Maloney, R.P; Fang, F.G. Synthesis of a B-homo 6-azaandrost-ene-3-one as a novel steroidal 5 α -reductase inhibitor. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*: 2823-2826.

-
38. Nikolaropoulos, S; Koutsourea, A; Arsenou, E; Fousteris, M. Synthetic approaches for the synthesis of a cytostatic steroidal B–D bilactam. *Steroids*. **2003**, 68: 659-666.
39. Huang, Y; Cui, J; Chen, S; Lin, Q; Song, H; Gan, C; Su, B; Zhou, A. Synthesis and evaluation of some new aza-B-homocholestane derivatives as anticancer agents. *Mar. Drugs*. **2014**, 12: 1715-1731.
40. Martínez-Pascual, R; Meza-Reyes, S; Vega-Baez, J; Merino-Montiel, P; Padrón, J; Mendoza, A; Montiel-Smith, S. Novel synthesis of steroidal oximes and lactams and their biological evaluation as antiproliferative agents. *Steroids*. **2017**, 1-27.
41. Braga, R.C; Andrade, C.H. QSAR and QM/MM approaches applied to drug metabolism prediction. *Mini-Rev. Med. Chem*. **2012**, 12: 573-582.
42. Chan Cua, I. A. modelado de la interacción enzima-ligando (docking) entre la enzima INOS y alcaloides provenientes de algas marinas. ITESCAM. Calkiní, Campeche, México. **2016**
43. Trott, O; Olson, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Computational. Chem*. **2009**, 31: 455-461.
44. Gómez-Chang, E; Larrea, F; Martínez-Montes, F. Vías de señalización asociadas a la esteroidogenesis. *Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol*. **2012**, 15 (1): 24-36.
45. Singh, J; Singh, R; Gupta, P; Rai, S; Ganesh, A; Badrinarayan, P; Konwar, R; Panda, G; Sastry, N. Targeting progesterone metabolism in breast cancer with L-proline derived new 14-azasteroids. *Bioorg. Med. Chem*. **2017**, 1: 2-13.

-
46. Langlois, V; Zhang, D; Cooke, G; Trudeau, V.L. Evolution of steroid 5 α -reductases and comparison of their function with 5 β -reductase. *General and Comparative Endocrinology*. **2010**, 166: 489-497.
47. Jenkins, E; Andersson, E; Imperato-McGinley, J; Wilson, J.D; Russell D.W. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 α -reductase. *J. Clint. Invest.* **1992**, 89: 293-300.
48. Moeller, G; Adamsky, J. Integrated view on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, 301: 7-19.
49. Vihko, P; Herrala, A; Harkonen, P; Isomaa, V; Kaija, H; Kurkela, R; Pulkka, A. Control of cell proliferation by steroids: The role of 17HSDs. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, 248: 141-148.
50. Mazumdar, M; Fournier, D; Zhu, D; Cadot, C; Poirier, D; Lin S. Binary and ternary crystal structure analyses of a novel inhibitor with 17 β -HSD type 1: a lead compound for breast cancer therapy. *J. Biochem.* **2009**, 424: 357-366.
51. Suvannang, N; Nantasenamat, C; Isarankura-Na-Ayudhya, C; Prachayasittikul, V. Molecular Docking of Aromatase Inhibitors. *Molecules*. **2011**, 16: 3597-3617.
52. Roy, P.P; Roy, K. Molecular docking and QSAR studies of aromatase inhibitor androstenedione derivatives. *J. Pharm. Pharmacology*. **2010**; 62: 1717-1728.
53. Miller, W; Auchus, R. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*. **2011**, 32 (1): 81-151.
54. Attard, G; Reid, A; Olmos, D; Bono, J. Antitumor activity with CYP17 blockade indicates that castration-resistant prostate cancer frequently remains hormone driven. *Cancer Res*. **2009**. 69 (12): 4937-4940.
55. DeVore, N; Scott, E. Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001. *Nature*. **2012**, 482: 116-119.

-
56. Korc, I; Bidegain, M; Martell, M. Radicales libres: bioquímica y sistemas antioxidantes, implicancia en la patología neonatal. *Rev. Med. Uruguay*. **1995**, 11: 121-135.
57. Morgan, D.M. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Protocols. Methods in Molecular Biology*. **1998**, 79: 179-183.
58. Thi Ha, D; Salvaraja, B; Quoc Long, P; Quang, N.D; Nghi, D.H; Wook, L.J; Thu Thuy, T.T. Synthesis of two new hydroximinosteroids from cholesterol and their biological evaluation. *Vietnam J. Sci. Techno*. **2019**, 57 (5): 527-538.
59. Ghosh, P; Ghosh, A; Mandal, A; Sultana, S.S; Dey, S; Pal, C. Oxysterols: Synthesis and anti-leishmanial activities. *Steroids*. **2016**, 107: 65-73.
60. Sánchez-Sánchez, L; Hernández-Linares, M.G; Escobar, M; López-Muñoz, H; Zenteno, E; Fernández-Herrera, M.A; Guerrero-Luna, G; Carrasco-Carballo, A; Sandoval-Ramírez, J. Antiproliferative, cytotoxic, and apoptotic activity of steroidal oximes in cervicouterine cell lines. *Molecules*. **2016**, 21: 1533.
61. Parish, E.J; Kizito, S.A; Peng, J; Heidepriem, R.W; Livant, P. A novel chemical synthesis and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectral properties of cholest-4-ene-3,6-dione. *Chem. Phys. Lipids*. **1995**, 76: 129-133.
62. Hernández-Linares, M.G; Sandoval-Ramírez, J; Meza-Reyes, S; Montiel-Smith, S; Guerrero, G. Obtención de oximas de lactonas bisnorcolánicas con potencial actividad antitumoral. *Revista cubana de química*. **2008**, 20 (2): 10-13.
63. Meza-Reyes, S; Sandoval-Ramírez, J; Montiel-Smith, S; Hernández-Linares, G; Viñas-Bravo, O; Martínez-Pascual, R; Fernández-Herrera, M.A; Vega-Baéz, J.L; Merino-Montiel, P; Santillan, R; Farfán, N; Rincón, S; Del Río, R.E. β -Alkoxy- α,β -unsaturated ketone systems in steroidal frameworks and their conversion to 23,24-bisnorcholane lactones. *ARKIVOC*. **2005**, 6: 307-320.


64. Pérez-Díaz, J.O.H; Rárová, L; Muñoz-Ocampo, J.P; Magaña-Vergara, N.E; Farfán, N; Strnad, M; Santillan, R. Synthesis and biological activity of 23-ethylidene-26-hydroxy-22-oxocholestane derivatives from spirostane sapogenins. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*: 67-78.
65. Vágvölgy, M; Martins, A; Kulmány, Á; Zupkó, I; Gáti, T; Simon, A; Tóth, G; Hunyadi, A. Nitrogen-containing ecdysteroid derivatives vs. multi-drug resistance in cancer: Preparation and antitumor activity of oximes, oxime ethers and a lactam. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *17*: 1-26.
66. Poza, J; Rega, M; Paz, V; Alonso, B; Rodríguez, J; Salvador, N; Fernandez, A; Jimenez, C. Synthesis and evaluation of new 6-hydroximinosteroid analogs as cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*: 4722-4740.
67. Savić, M.P; Škorić, D.D; Kuzminac, I.Z; Jakimov, D.Z; Kojić, V.V; Rárová, L; Strnad, M; Djurendić, E.A. New A-homo lactam D-homo lactone androstane derivative: synthesis and evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities in vitro. *Steroids.* **2020**, *20*: 1-32.
68. Bansal, R; Acharya, P.C. Man-made cytotoxic steroids: exemplary agents for cancer therapy. *Chem. Rev.* **2014**, *114*: 6986-7005.
69. Liang, G.P; Guo, J.H; Jiang, W. Novel approach to the synthesis of istaroxime. *Russ. J. Gen. Chem.* **2017**, *87* (11): 2643-2647.
70. Kenny, O; O'Callaghan, Y; O'Connell, N.M; McCarthy, F.O; Maguire, A.R; O'Brien, N.M. Oxidized Derivatives of Dihydrobrassicasterol: Cytotoxic and apoptotic potential in U937 and HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*: 5952-5961.
71. Chávez-Riveros, A; Cruz-Noriega, A; Ramírez-Apan, M.T; Miranda, L.D; Bratoeff, B. Synthesis and cytotoxic effect of pregnenolone derivatives with one or two α,β -unsaturated carbonyls and an ester moiety at C-21 or C-3. *Steroids.* **2018**, *1* (4): 1-9.

72. Carvalho, J.F; Cruz-Silva, M.M; Sá e Melo, M. Efficient trans-diaxial hydroxylation of Δ^5 -steroids. *Tetrahedron*. **2010**, 66: 2455-2462.
73. Chavez-Riveros, A; Bratoeff1, E; Heuze, Y; Soriano, J; Moreno, I; Sanchez-Márquez, A; Cabeza, M. Synthesis and identification of pregnenolone derivatives as inhibitors of isozymes of 5α -reductase. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. **2015**, 348: 808-816.
74. Ahmad, M.S; Pillai, N. K; Chaudhry, Z.H. Beckmann Rearrangement of some steroid α -hydroxy ring B ketoximes: 5-oxo 5,6-seco nitriles. *Aust. J. Chem*. **1974**, 27: 1537-43.
75. Hegde, S.M; Naveen-Kumar, M; Kavya, K; Kiran-Kumar, K.M; Nagesh, R; Patil, R.H; Babu, R.L; Ramesh, G.T; Chidananda-Sharma, S. Interplay of nuclear receptors (ER, PR, and GR) and their steroid hormones in MCF-7 cells. *Mol. Cell. Biochem*. **2016**, 10: 281-02.
76. Latif, A; Gonda, T; Vágvölgyi, M; Kúsz, N; Kulmány, A; Ocsovszki, I; Zomborszki, Z.P; Zupkó, I; Hunyadi, A. Synthesis and In Vitro Antitumor Activity of Naringenin Oxime and Oxime Ether Derivatives. *Int. J. Mol. Sci*. **2019**, 20: 2184.
77. Aghaei, M; Yazdiniapour, Z; Ghanadian, M; Zolfaghari, B; Lanzotti, V; Mirsafae, V. Obtusifoliol related steroids from *Euphorbia sogdiana* with cell growth inhibitory activity and apoptotic effects on breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB231). *Steroids*. **2016**.
78. Fernández-Herrera, M.A; López-Muñoz, H; Hernández-Vázquez, J.M; López-Dávila, M; Escobar-Sánchez, M.L; Sánchez-Sánchez, L; Mario-Pinto, B; Sandoval-Ramírez, J. Synthesis of 26-hydroxy-22-oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioorg. Med. Chem*. **2010**, 18: 2474-2484.

79. Bousquet J, Fiocchi A. Prevention of recurrent respiratory tract infections in children using a ribosomal immunotherapeutic agent: a clinical review. *Paediatr Drugs*. **2006**, 8: 235-43.
80. Carvalho, J.F; Cruz-Silva, M.M; Moreira, J.N; Simoes, S; Sá e Melo, M.L. Sterols as anticancer agents: synthesis of ring-B oxygenated steroids, cytotoxic profile, and comprehensive SAR Analysis. *J. Med. Chem*. **2010**, 53: 7632-7638.
81. Bischoff, P.L; Holl, V; Coelho, D; Dufour, P; Luu, B; Weltin, D. Apoptosis at the interface of immunosuppressive and anticancer activities: The examples of two classes of chemical inducers, oxysterols and alkylating agents. *Curr. Med. Chem*. **2000**, 7: 693-713.
82. Singh, J; Singh, R; Gupta, P; Rai, S; Ganesh, A; Badrinarayan, P; Sastry, N; Konwar, R; Panda, G. Targeting progesterone metabolism in breast cancer with L-proline derived new 14-azasteroids. *Bioorg. Med. Chem*. **2017**.
83. Anugolu, R. K; Gunda, S. K; Mahmood, S. 3D QSAR CoMFA/CoMSIA and docking studies on azole dione derivatives, as anti-cancer inhibitors. *Int. J. Computational Biology and Drug Design*. **2012**, 5: 111-136.
84. Di Costanzo, L; Drury, J. E; Trevor M. Crystal structure of human liver Δ^4 -3-Ketosteroid 5β -reductase (AKR1D1) and implications for substrate Binding and Catalysis. *The J. of Biol. Chem*. **2008**, 283 (24): 16830-16839.
85. Poirier, D. 17β -Hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors: a patent review. *Expert Opin. Ther. Patents*. **2010**, 20 (9): 1123-1145.
86. Möller, G; Husen, B; Kowalik, D; Hirvelä, L; Plewczynski, D; Rychlewski, L; Messinger, J; Thole, H; Adamski, J. Species used for drug testing reveal different inhibition susceptibility for 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *PLoS ONE*. **2010**, 5 (6): 1-10.
87. Li, T; Stephen, P; Zhu, D. W; Shi, R; Lin, S. X. Crystal structures of human 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 complexed with estrone and

NADP⁺ reveal the mechanism of substrate inhibition. *The FEBS Journal*. **2019**, 286: 2155-2166.

- 88.** Kumavath, R; Azad, M; Devarapalli, P; Tiwari, S; Kar, S; Barh, D; Azebedo, V; Kumar, A.P. Novel aromatase inhibitors selection using induced fit docking and extra precision methods: Potential clinical use in ER-alpha-positive breast cancer. *Bioinformation*. **2016**, 12 (6): 324-331.
- 89.** Nikolic, A; Petri, E; Klisuric, O; Celic, A; Jakimov, D; Djurendic, E; Penov-Gaši, K; Sakac, M. Synthesis and anticancer cell potential of steroidal 16,17-seco-16,17-dinitriles: Identification of a selective inhibitor of hormone-independent breast cancer cells. *Bioor. Med. Chem*. **2015**, 23: 703-711.
- 90.** Ahmad, S; Khan, M.F; Parvez, S; Akhtar, M; Raisuddin, S. Molecular docking reveals the potential of phthalate esters to inhibit the enzymes of the glucocorticoid biosynthesis pathway. *J. Appl. Toxicol*. **2016**.
- 91.** Al-Masoudi, N. A; Mahdi, K. M; Abdul-Rida, N. A; Saeed, B. A; Engel, M. A new pregnenolone analogues as privileged scaffolds in inhibition of CYP17 hydroxylase enzyme. Synthesis and *in silico* molecular docking study. *Steroids*, **2015**, 100: 52-59
- 92.** Kumar, N; Mishra, S.S; Sharma, S.C; Hamendra, S P;. Pandiya, H. *In silico* pharmacokinetic, bioactivity and toxicity evaluation of some selected anti-ulcer agents. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res*. **2017**, 9 (2): 68-71.
- 93.** Ertl, P; Rohde, B; Selzer, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem*. **2000**, 43: 3714-3717.
- 94.** Cheng, F; Li, W; Zhou, Y; Shen, J; Wu, Z; Liu, G; Lee, P.W;Tang, T. admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. *J. Chem. Inf. Model*. **2012**, 52: 3099-3105.
- 95.** Norinder, U; Bergström, C.A. Prediction of ADMET Properties. *Chem Med Chem*. **2006**, 1: 920-937.

- 
96. Lotfy, K. Molecular modeling, docking and ADMET of dimethylthiohydantoin derivatives for prostate cancer treatment. *J. Biophys Chem.* **2015**, 6: 91-117.

11. ANEXOS

11.1.-Optimización de energía de los ligandos 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81b, 90, 100, 120, 130, 140, 150 y 160b.

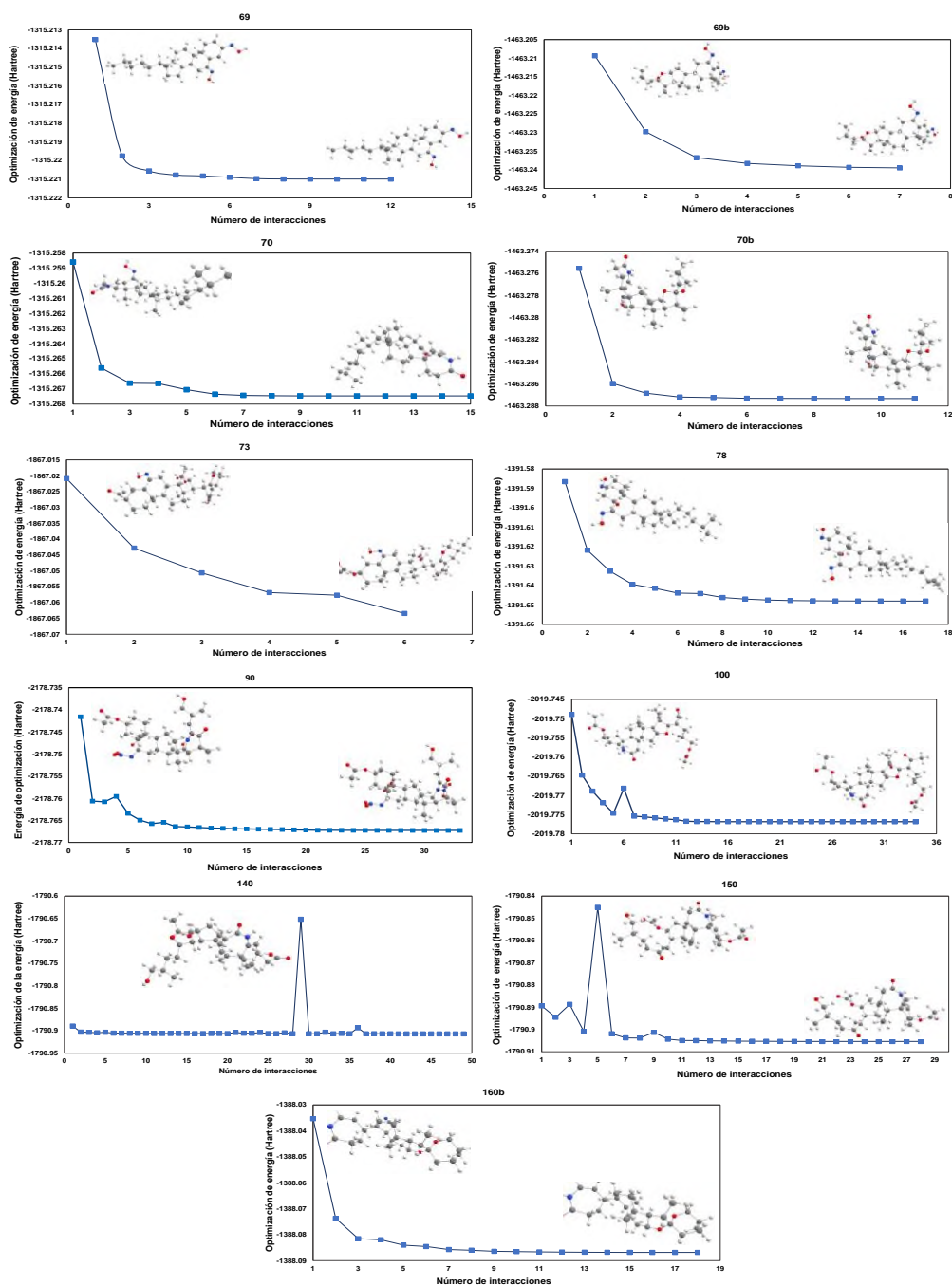


Figura 66. Optimización de energía de los ligandos 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81b, 90, 100, 120, 130, 140, 150 y 160b.

11.2.-Acoplamiento de los ligandos 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81b, 90, 100, 120, 130, 140, 150 y 160b con la enzima 5 β -reductasa

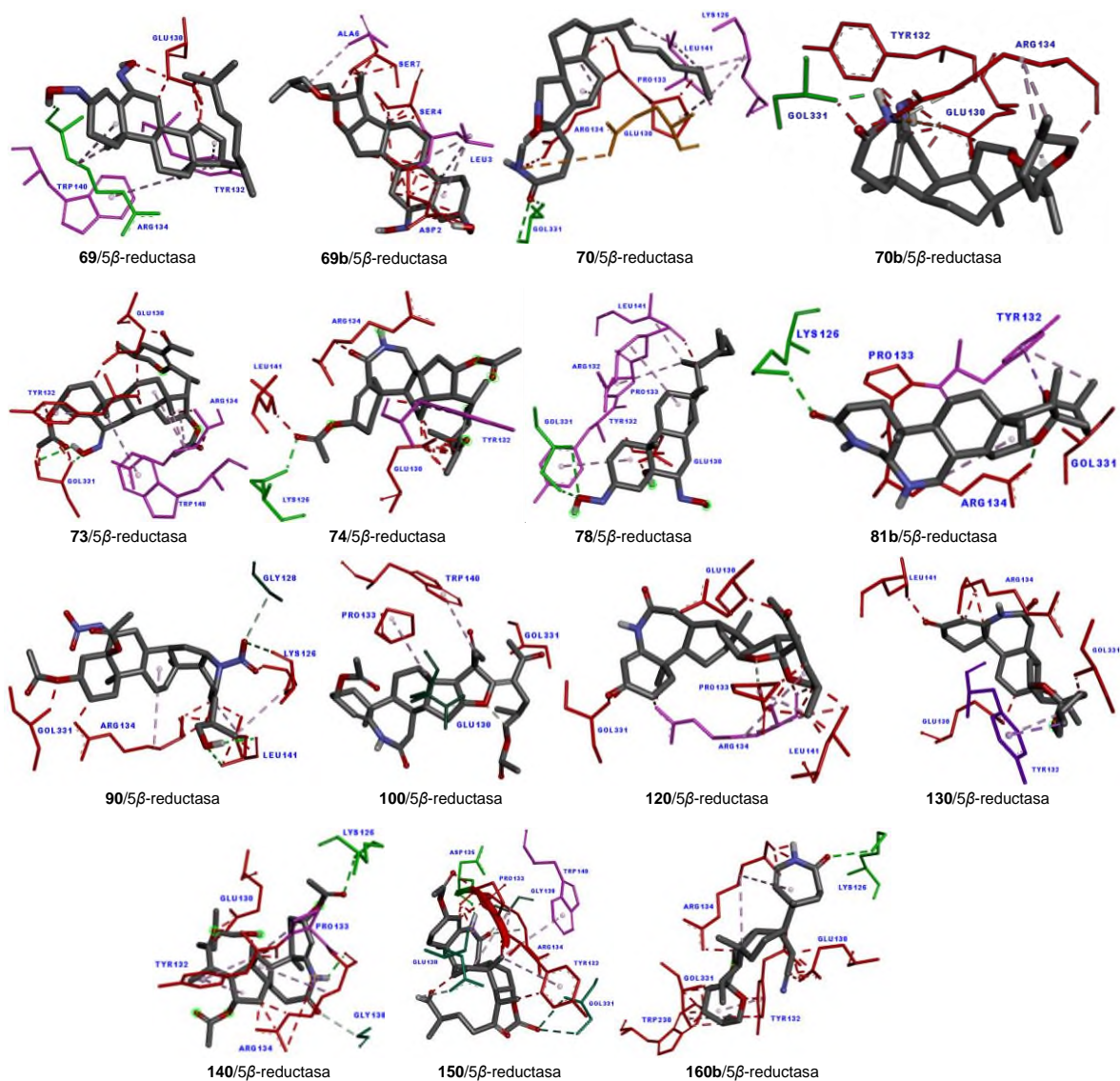


Figura 67. Acoplamiento del ligando 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81b, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 y 160b con el sitio activo de la enzima 5 β -reductasa visualizada en Discovery Studio (<https://www.3ds.com/>).

11.3.-Acoplamiento de los ligandos 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81b, 90, 100, 120, 130, 140, 150 y 160b con la enzima 17 β -HSD

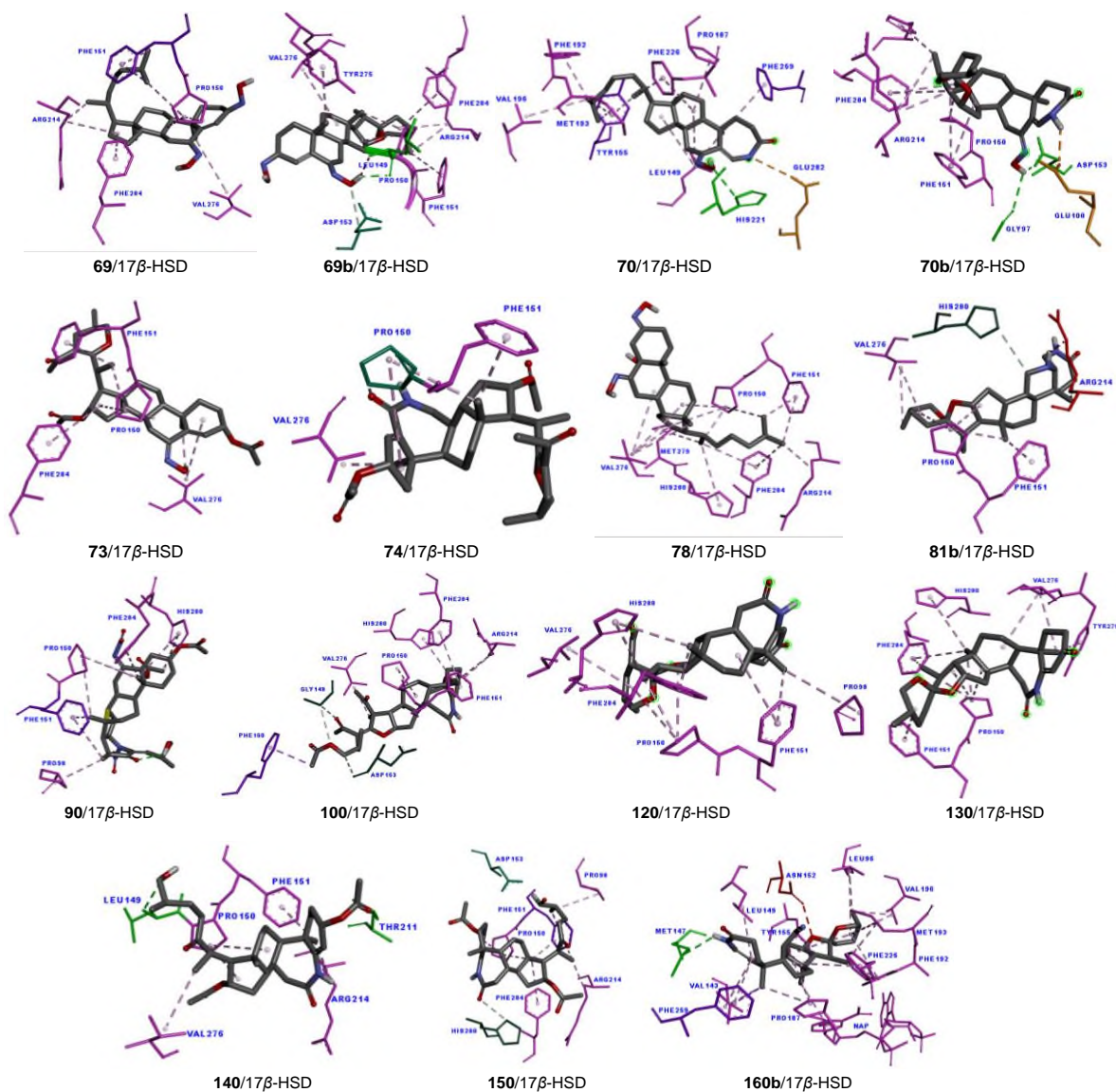


Figura 68. Acoplamiento del ligando **69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81b, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 y 160b** con el sitio activo de la enzima 17 β -HSD visualizada en Discovery Studio (<https://www.3ds.com/>).

11.4.-Acoplamiento de los ligandos 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81b, 90, 100, 120, 130, 140, 150 y 160b con la enzima CYP19A1

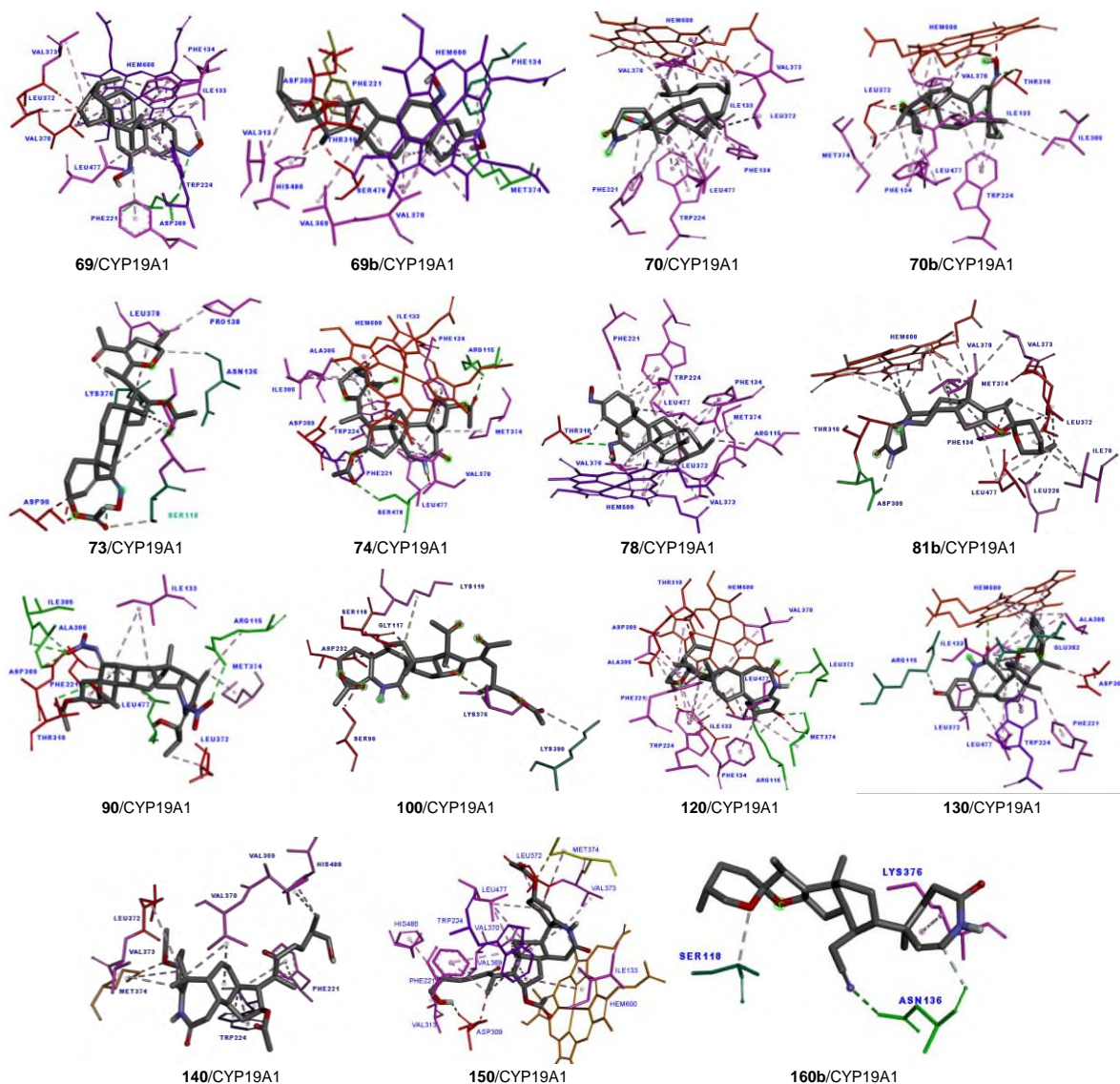


Figura 69. Acoplamiento del ligando **69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81, 81b, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150** y **160b** con el sitio activo de la enzima CYP19A1 visualizada en Discovery Studio (<https://www.3ds.com/>).

11.5.-Acoplamiento de los ligandos 69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 81b, 90, 100, 120, 130, 140, 150 y 160b con la enzima CYP17A1

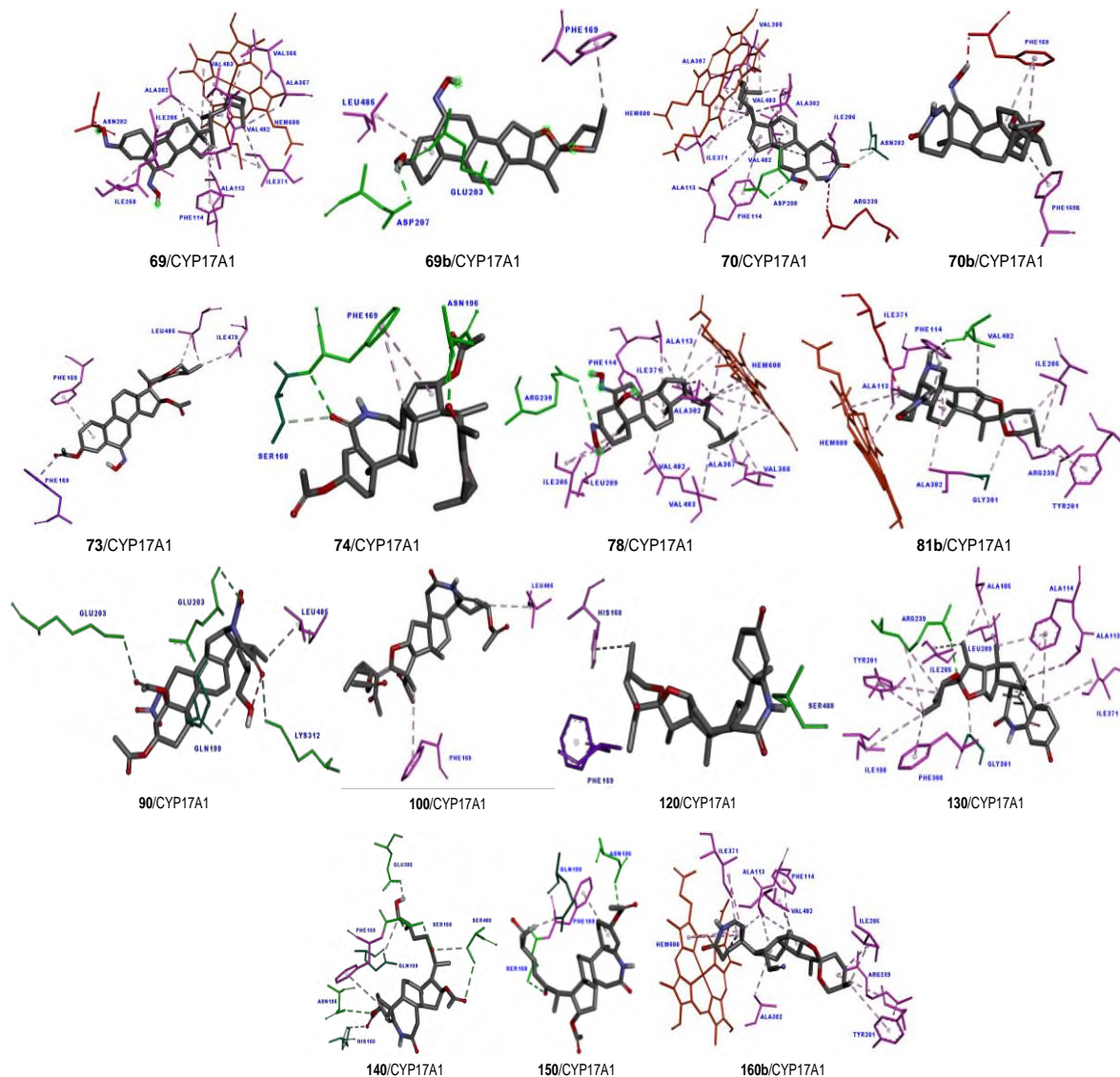


Figura 70. Acoplamiento del ligando **69, 69b, 70, 70b, 73, 74, 78, 80b, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160** y **160b** con el sitio activo de la enzima CYP17A1 visualizada en Discovery Studio (<https://www.3ds.com/>).