



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Área en Química Orgánica

Tesis de Maestría:

Diseño *in silico* y síntesis de compuestos reguladores de la
esteroidogénesis

Presenta:

LBT David Antonio Mora Martínez

Director de Tesis:

Dr. Jesús Sandoval Ramírez

Co-director de Tesis:

Dr. Alan Carrasco Carballo



Puebla, Pue. Junio 2023



El presente trabajo fue desarrollado bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez y el Dr. Alan Carrasco Carballo en el laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica. El trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con el número de beca 788789 periodo 2020-2022.



Congresos y artículos publicados.

Parte de este trabajo de tesis de investigación fue presentado en los siguientes congresos:

- ❖ **Ciclo de conferencias LESQO**, con la ponencia titulada: “*Validación de las líneas de la proteína CYP17A1 con código 6CHI-4NKV*”, 10 de agosto del 2020.
- ❖ **#LatinXChem Twitter Conference 2021**, con el poster titulado: “*Validación in silico de 2 líneas de cristales de la proteína CYP17A1 para su uso en docking molecular*”, 20 de septiembre del 2021.
- ❖ **Encuentro virtual de química inorgánica 2021**, con el póster titulado: “*Efecto de la carga del Fe del grupo Hemo en el diseño in silico de inhibidores de CYP17A1, CYP19A1 y CYP21A2*”, 4 de octubre del 2021.

Parte de este trabajo de investigación fue publicado en el siguiente artículo:

- ❖ **Mora-Martinez, D.**, Organista-Nava, J., Sandoval-Ramirez, J., Illades-Aguiar, B., & Carrasco-Carballo, A. *In Silico Approach: Effect of the Oxidation Iron State (Heme-Group) in Steroidogenesis Pathways. Journal of Molecular Docking 2022 2(1), 44.*



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. David Miguel Aparicio Solano, Dr. José Luis Vega Báez, Dra. Berenice Illades Aguilar y el Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **"Diseño in silico y síntesis de espirostanos reguladores de la esteroidogénesis"**, que presenta el alumno **David Antonio Mora Martínez** para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los nueve días del mes de mayo del año dos mil veintitrés.

ATENTAMENTE

Dr. David Miguel Aparicio Solano Altamirano

Dr. José Luis Vega Báez

Dra. Berenice Illades Aguilar

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

Índice

Índice de figuras	7
Índice de tablas	11
Abreviaturas.....	14
Resumen	15
1 Introducción.....	17
2 Antecedentes.....	21
2.1 Esteroidogénesis	21
2.1.1 CYP11A1	22
2.1.2 CYP17A1	23
2.1.3 17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD).....	28
2.1.4 5 α -reductasa	29
2.1.5 CYP21A2	30
2.1.6 11 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β -HSD).....	32
2.1.7 CYP19A1 (Aromatasa)	33
2.2 Estudios <i>in silico</i>	35
2.3 Esteroides como candidatos a fármacos	38
2.3.1 Esteroides espirostánicos.....	39
2.3.2 Derivados 22-oxocolestánicos.....	42
3 Hipótesis	43
4 Objetivos.....	43
5 Metodología.....	44
5.1 Preparación de proteínas y ligandos.	44
5.2 Estudios <i>in silico</i>	46

5.3	Análisis estadístico	47
5.4	Síntesis.....	48
5.4.1	Hidrólisis ácida de dioscina para la obtención de diosgenina.....	48
5.4.2	Derivatización de botogenina/hecogenina.....	49
5.4.3	Síntesis de la 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (52a) a partir de diosgenina (44a).	
	53	
6	Resultados y discusión	56
6.1	Validación de cristales utilizados	56
6.1.1	CYP11A1	58
6.1.2	CYP17A1	59
6.1.3	17 β -HSD.....	59
6.1.4	5 α -reductasa	60
6.1.5	CYP21A2	60
6.1.6	11 β -HSD.....	61
6.1.7	CYP19A1	62
6.1.8	Enzimas validadas <i>in silico</i>	62
6.2	Análisis estadístico de las moléculas diseñadas	64
6.2.1	CYP11A1	66
6.2.2	CYP17A1	67
6.2.3	17 β -HSD.....	68
6.2.4	5 α -reductasa	69
6.2.5	CYP21A2	71
6.2.6	11 β -HSD.....	72
6.2.7	CYP19A1	73
6.3	Resultados <i>in silico</i> de inhibidores esteroidales	75

6.3.1	Derivados de diosgenina.....	75
6.3.2	Derivados de laxogenina	79
6.3.3	Derivados de 3 β ,5 α -dihidroxiestrost-6-ona.....	86
6.3.4	Derivados del 3 β -hidroxiestrost-5-en-7-ona.....	92
6.3.5	Derivados de botogenina	97
6.3.6	Derivados de hecogenina.....	102
6.3.7	Inhibidores selectivos	106
6.3.8	Inhibidores no selectivos	109
6.4	Compuestos seleccionados para síntesis.....	112
6.5	Obtención y Caracterización.....	114
6.5.1	Diosgenina (44a).	114
6.5.2	Acetato de hecogenina (45d).	116
6.5.3	Botogenina (48a).	118
6.5.4	3 β -hidroxiestrost-5-en-7-ona (52a).	120
7	Conclusiones.....	126
8	Bibliografía.....	128

Índice de figuras

Figura 1. Screening de artículos publicados “ <i>steroidogenesis modulators</i> ” en la plataforma <i>PubMed</i>	19
Figura 2. Algunos compuestos con actividad inhibitoria hacia la CYP11A1: a) Ketoconazol (19); b) Aminoglutetimida (20); c) Mitotano (21).	23
Figura 3. Estructura del 3-oxopregn-4-en-21-al (22).	25
Figura 4. Fármacos desarrollados para el tratamiento del mPCRC. [73]	26
Figura 5. Estructura del inhibidor comercial abiraterona (24).	27
Figura 6. Inhibidor galeterona (27) de la CYP17A1 encontrado por análisis <i>in silico</i> e <i>in vitro</i>	27
Figura 7. Fármacos que inhiben la 17 β -HSD: a) Cumarina (28); b) Tamoxifeno (29); c) Clomifeno (30).	29
Figura 8. Androsterona (31)	29
Figura 9. a) Flutamida; b) Finasterida.	30
Figura 10. Flavonona (34).	33
Figura 11. a) Tamoxifeno (29); b) Anastrozol (35).	34
Figura 12. Screening “ <i>specific inhibition in silico</i> ” en la plataforma <i>PubMed</i>	35
Figura 13. Inhibidores de la CYP17A1: a) Dutasterida (36); b) Abiraterona (24).	36
Figura 14. Inhibidores de las CYP21A2, CYP19A2 y CYP17A1: a) Ketoconazol (19); b) Clotrimazol (37); c) Miconazol (38); d) Fluconazol (39).	37
Figura 15. Resultados experimentales vs resultados predichos; pIC (logaritmo de concentración inhibitoria); COMFA (Análisis de campo molecular comparativo). [99].	37
Figura 16. Bisfenol A (40).	38
Figura 17. a) Bavaquina (41); b) Neobavaisoflavona (42); c) Corilifolia A (43). [104].	38
Figura 18. Estructuras espiroestánicas. [106].	40
Figura 19. a) diosgenina (44); b) derivado (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 β ,16 β -diilo diacetato (49). [103].	42
Figura 20. Derivados hidroximínicos y cetónicos de diosgenina (44a) y laxogenina (47a).	45
Figura 21. Derivados hidroximínicos y cetónicos de 3 β ,5 α -dihidroxiestirost-6-ona (51a), 3 β -hidroxiestirost-5-en-7-ona (52a), botogenina (48a) y hecogenina (45a).	46

Figura 22. Diosgenina.	48
Figura 23. Hecogenina (45a).	49
Figura 24. Botogenina (48a).	50
Figura 25. Acetato de hecogenina (45d).	51
Figura 26. Acetato de (25 <i>R</i>)-5 β ,6 β -epoxi-5 β -espirostan-3 β -ilo.	52
Figura 27. Acetato de diosgenina (57).	53
Figura 28. Acetato de 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (58).	54
Figura 29. 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (52a).	55
Figura 30. Derivados; a) espirostánicos; b) 22-oxocolestánicos.	75
Figura 31. Interacciones mostradas (morado: alkyl/ π -alkyl) entre CYP11A1 con los compuestos; a) finasterida; b) colesterol; c) 44a ; mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	76
Figura 32. Diagrama 2D de interacciones entre la CYP11A1 y; a) 44c ; b) 44b ; obtenida mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	77
Figura 33. Diagrama 2D de interacciones entre la CYP11A1 y; a) 44d ; b) 44e ; obtenida mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	78
Figura 34. Derivados; a) espirostánicos; b) 22-oxocolestánicos.	79
Figura 35. Interacciones mostradas (verde: puentes de hidrógeno; morado: alkyl/ π -alkyl) entre 5 α -reductasa con los compuestos; a) finasterida; b) colesterol; c) 50a ; mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	79
Figura 36. Interacciones mostradas (verde: puentes de hidrógeno; morado: alkyl/ π -alkyl) entre 17 β -HSD con los compuestos; a) PBRM; b) Androstenediona; c) 47i ; mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	80
Figura 37. Diagrama 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) 50c ; b) 50d ; obtenida mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	82
Figura 38. Diagrama 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) 50e ; b) 50g ; obtenida mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	83
Figura 39. Diagrama 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) 47a ; b) 47e ; obtenida mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	84
Figura 40. Diagrama 2D de interacciones y; a) 47f ; b) 47i ; c) interacción 3D 47f -17 β -HSD obtenida mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	85
Figura 41. Derivados; a) espirostánicos; b) 22-oxocolestánicos.	86

Figura 42. Diagramas 2D de interacciones entre la CYP11A1 y; a) 51c ; b) 51i ; c) 51m ; d) 51n obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	88
Figura 43. Diagramas 2D de interacciones entre la CYP11A1 y; a) 51d ; b) 51j ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	89
Figura 44. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) 53c ; b) 53d ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	90
Figura 45. Diagramas 2D de interacciones 5 α -reductasa y; a) 53e ; b) 53f ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	90
Figura 46. Diagramas 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) 51c ; b) 51i ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	91
Figura 47. Diagramas 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) 51l ; b) 51e ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	92
Figura 48. Derivados; a) espiroestánicos; b) 22-oxocolestánicos.	92
Figura 49. Diagramas 2D de interacciones entre la CYP17A1 y; a) 52k ; b) 52a ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	94
Figura 50. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) 52k ; b) 52a ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	95
Figura 51. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) 54a ; b) 54b ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	96
Figura 52. Diagramas 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) 52c ; b) 52d ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	96
Figura 53. Diagramas 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) 52b ; b) 52h ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	97
Figura 54. Derivados; a) espiroestánicos; b) 22-oxocolestánicos.	97
Figura 55. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) 55a ; b) 55b ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	99
Figura 56. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) 55c ; b) 55d ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	100
Figura 57. Diagramas 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) 48c c; b) 48d ; c) 48e ; d) 48f obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	101
Figura 58. Derivados; a) espiroestánicos; b) 22-oxocolestánicos.	102

Figura 59. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) 56a c; b) 56d ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	103
Figura 60. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) 56b c; b) 56c ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	104
Figura 61. Diagramas 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) 45a c; b) 45b ; c) 45c ; d) 45d obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	105
Figura 62. Diagrama 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) 45f ; b) 45g ; c) 45e ; obtenidos mediante <i>DiscoveryStudio 2021</i>	106
Figura 63. Compuestos con posible actividad inhibitoria selectiva hacia la CYP11A1. ...	108
Figura 64. Compuestos con posible actividad inhibitoria selectiva hacia la 17 β -HSD.	108
Figura 65. Compuestos con posible actividad inhibitoria selectiva hacia la 5 α -reductasa.	109
Figura 66. Compuesto con posible actividad inhibitoria para las CYP11A1/CYP17A1. ..	110
Figura 67. Compuestos con posible actividad inhibitoria hacia las CYP11A1/17 β -HSD.	110
Figura 68. Compuestos con posible actividad inhibitoria hacia las CYP11A1/5 α -reductasa.	111
Figura 69. Compuestos con posible actividad inhibitoria hacia las CYP11A1/5 α -reductasa/17 β -HSD.	112
Figura 70. Derivados seleccionados para su síntesis.	114
Figura 71. Espectro de ^1H de diosgenina (44a) pura a 500 MHz.	115
Figura 72. Espectro de ^{13}C de diosgenina.	116
Figura 73. Espectro ^1H de acetato de hecogenina (45d).	117
Figura 74. Espectro de ^{13}C de acetato de hecogenina (45d).	118
Figura 75. Espectro ^1H de botogenina.	120
Figura 76. Espectro ^1H de acetato de diosgenina (57).	121
Figura 77. Espectro de ^{13}C de acetato de diosgenina (57)	122
Figura 79. Espectro de ^{13}C de acetato de diosgenina (57).	124
Figura 80. Espectro de ^1H del 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (52a)	124
Figura 81. Espectro de ^{13}C del derivado 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (52a).	125
Figura 82. Compuestos aislados, sintetizados y caracterizados.	127

Índice de tablas

Tabla 1. Cristales publicados en la base de datos <i>Protein Data Bank</i>	21
Tabla 2. Actividad biológica de algunos espirostanos	41
Tabla 3. Cristales seleccionados con sus respectivos PDB-IDs.....	47
Tabla 4. Cristales analizados para la validación.	56
Tabla 5. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus respectivas proteínas cristalizadas (color amarillo).	58
Tabla 6. Energías de acoplamiento (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus respectivas proteínas cristalizadas (color amarillo).	59
Tabla 7. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con las proteínas cristalizadas.	60
Tabla 8. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus respectivas proteínas cristalizadas.	60
Tabla 9. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus respectivas proteínas cristalizadas.	61
Tabla 10. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus respectivas proteínas cristalizadas.	61
Tabla 11. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus los diferentes cristales.....	62
Tabla 12. Cristales seleccionados para cada una de las enzimas analizadas con sus respectivas imágenes de interacción 3D con su sustrato e inhibidor utilizando <i>Discovery Studio 2021</i>	62
Tabla 13. Efecto de la molécula de origen y grupos funcionales en diferentes carbonos de la estructura espiroestánica, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.....	64
Tabla 14. Efecto de la molécula de origen y grupos funcionales en diferentes carbonos de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova post LSD-Fisher.....	65
Tabla 15. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.	66

Tabla 16. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.	67
Tabla 17. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura espirostánica, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher...	67
Tabla 18. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.	68
Tabla 19. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura espirostánica, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher...	69
Tabla 20. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.	69
Tabla 21. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura espirostánica, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher...	70
Tabla 22. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.	71
Tabla 23. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura espirostánica, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher...	72
Tabla 24. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.	72
Tabla 25. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.	73
Tabla 26. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura espirostánica, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher...	74
Tabla 27. Compuestos con inhibición verdadera (dentro del sitio activo, color rojo) o falsa (fuera del sitio activo, verde) con las enzimas analizadas.	76

Tabla 28. Compuestos con inhibición verdadera (dentro del sitio activo, color rojo) o falsa (fuera del sitio activo, verde) con las enzimas analizadas.	81
Tabla 29. Energías de acoplamiento de las moléculas (kcal/mol) con sus respectivos cristales.	86
Tabla 30. Energías de acoplamiento de las moléculas (kcal/mol) con sus respectivos cristales.	93
Tabla 31. Energías de acoplamiento de las moléculas (kcal/mol) con sus respectivos cristales.	98
Tabla 32. Energías de acoplamiento de las moléculas (kcal/mol) con sus respectivos cristales.	102
Tabla 33. Moléculas encontradas con un posible efecto inhibitorio con su correspondiente(s) enzima(s) inhibida(s).	107
Tabla 34. Moléculas encontradas con un posible efecto inhibitorio con su correspondiente(s) enzima(s) inhibida(s).	109
Tabla 35. Actividad inhibitoria por parte de los compuestos seleccionadas hacia las enzimas CYP11A1, 17 β -HSD y 5 α -reductasa, donde el color rojo indica inhibición y verde actividad no inhibitoria.	113
Tabla 36. Compuestos con posible actividad inhibitoria.	126

Abreviaturas

PI: Posible Inhibidor.

NI: No Inhibidor.

EA: Energía de Acoplamiento.

cRPC: Cáncer de Próstata Resistente a la Castración.

IC: Concentración inhibitoria.

pIC: logaritmo de IC.

COMFA: Comparative Molecular Field Analysis.

DHT: Dihidrotestosterona.

3 β -HSD: 3 β - Hidroxiesteroide deshidrogenasa

17 β -HSD: 17 β - Hidroxiesteroide deshidrogenasa

CYP11A1: Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol.

CYP17A1: 17 α -hidroxilasa/17, 20 liasa.

CYP19A1: Aromatasa.

CYP21A2: 21-hidroxilasa.

K_m : Constante de Michaelis

Resumen

La esteroidogénesis es una ruta biosintética ampliamente estudiada, debido a la relevancia farmacológica de las enzimas implicadas, las cuales se encuentran relacionadas con enfermedades como cáncer de próstata, cáncer de mama y enfermedades autoinmunes. Razón por la cual la búsqueda de moduladores de la esteroidogénesis ha ido en aumento. Partiendo de estructuras espiroestánicas y 22-oxocolestánicas con actividad biológica reportada (anticancerígena y antifúngica principalmente) en la bibliografía, se evaluó su posible actividad biológica mediante técnicas *in silico*, así como efectos secundarios por interacciones cruzadas. En una primera etapa, se reporta la validación del estudio *in silico* de las enzimas de la esteroidogénesis, para lo cual se realizó una investigación bibliográfica de los cristales reportados para cada una de las enzimas, y tomando en cuenta parámetros de descarte (resolución < 3.0 Å, mutaciones en el sitio activo), se realizó un análisis de interacción cruzada, tomando el co-cristal de cada una de las estructuras, comparando la energía de acoplamiento (EA) entre los inhibidores de referencia/sustratos con cada uno de los cristales de las enzimas. Para posteriores análisis se seleccionaron los cristales resultando CYP11A1 (3N9Z), CYP17A1 (6CHI), 17β-HSD (6CGC), 5α-reductasa (6CGC), CYP21A2 (4Y8W), 11β-HSD (5PGY), CYP19A1 (3EQM) cuyos resultados fueran congruentes con lo reportado en la bibliografía (EA ≥ al sustrato y/o inhibidor). Una segunda etapa comprendió la realización del estudio *in silico*, de los derivados a evaluar con cada una de las enzimas, así como el análisis estadístico de estos resultados y de interacción tridimensional de los compuestos con las enzimas, con el fin de identificar y explicar el efecto de las modificaciones puntuales realizadas, detectando aquellos grupos que tuvieron un efecto positivo, negativo o nulo sobre esta interacción. Con base en estos resultados, se seleccionaron 4 compuestos para su síntesis (figura A). **44a** (diosgenina), **45d** (acetato de hecogenina) y **48a** (botogenina) por su facilidad de obtención, así como su potencial capacidad de inhibición específica hacia la CYP11A1, mientras que **52a** (3β-hidroxiestero-5-en-7-ona) fue seleccionado por su actividad de inhibición dual hacia las CYP11A1 y 5α-reductasa.

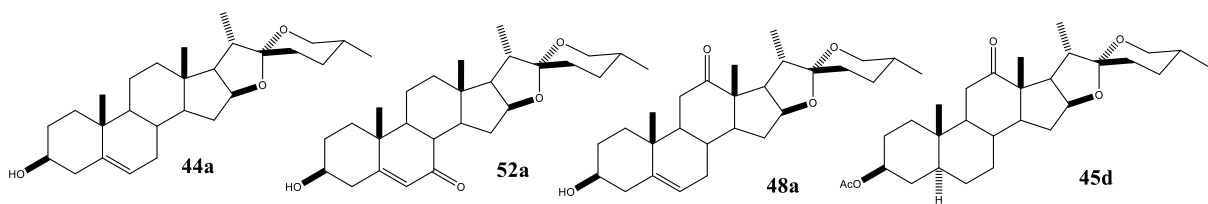


Figura A. Derivados seleccionados para su síntesis.

La tercera y última etapa fue la síntesis y obtención de derivados seleccionados, para la diosgenina (**44a**), esta se realizó mediante una hidrólisis ácida del extracto de *dioscorea composita*, mientras que la botogenina (**48a**) y acetato de hecogenina (**45d**) fueron obtenidas mediante el proceso de derivatización mostrado en la **figura B**.

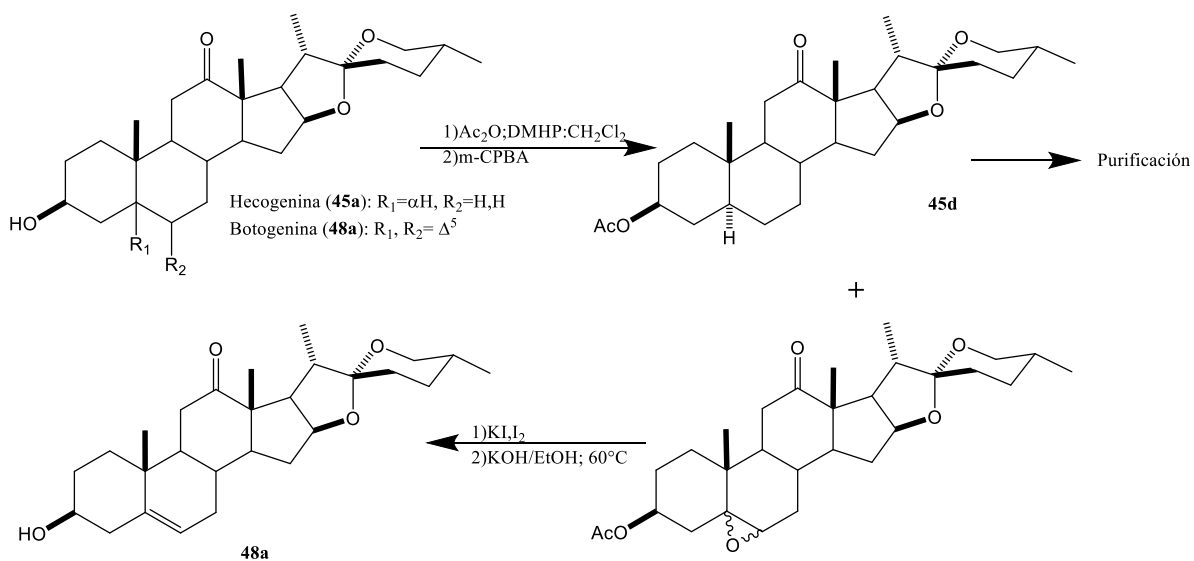


Figura B. Derivatización de botogenina (**48a**) a partir de una mezcla de hecogenina y botogenina.

Por último, el derivado 3β-hidroxiestirost-5-en-7-ona (**52a**) fue sintetizado realizando una acetilación en la posición 3, una oxidación en el carbono 7 y por último una hidrólisis básica (figura C).

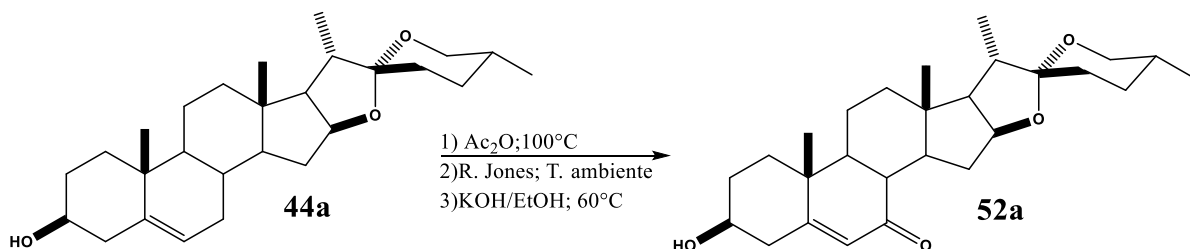
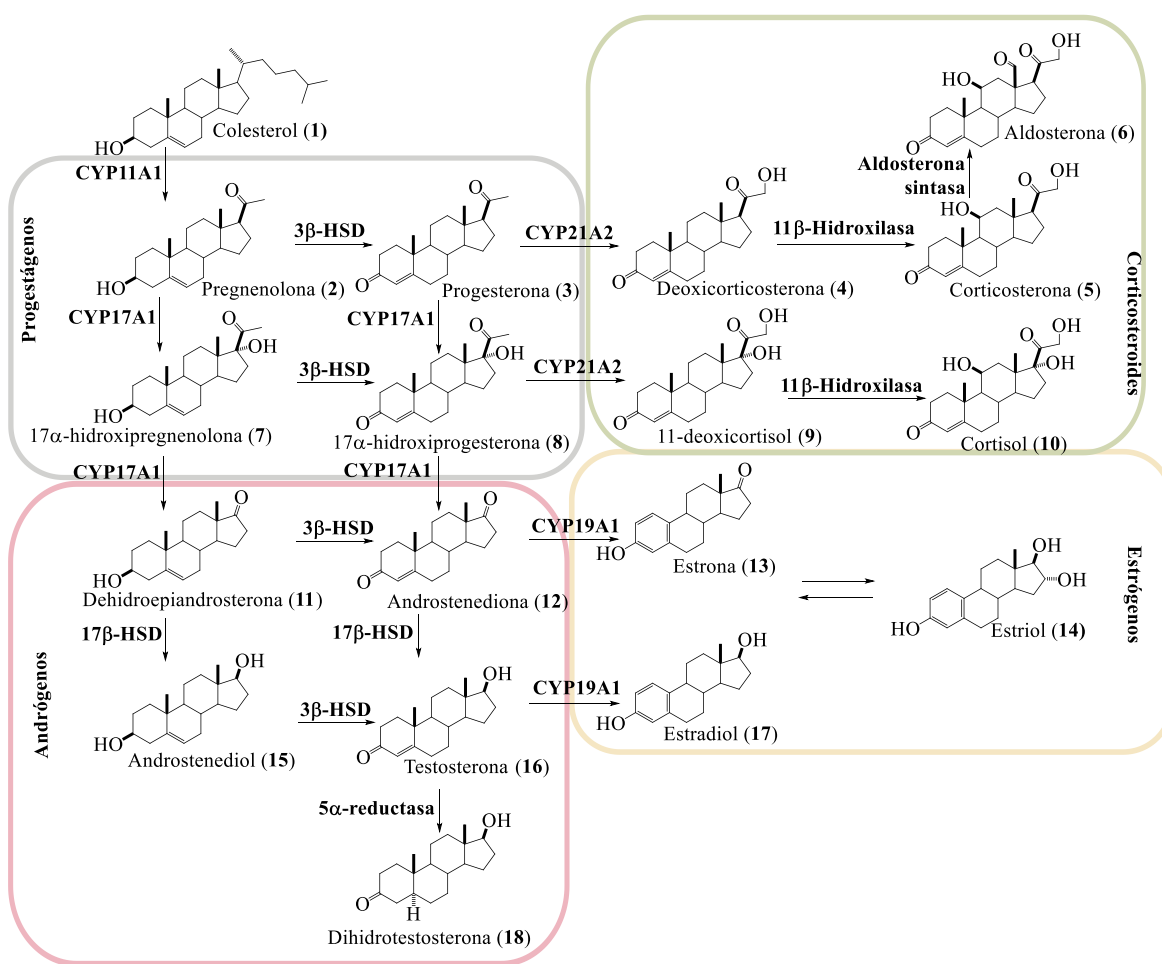


Figura C. Síntesis del derivado 3β-hidroxiestirost-5-en-7-ona (**52a**) a partir de diosgenina (**44a**).

1 Introducción

La esteroidogénesis (esquema 1) es la ruta biosintética a través de la cual se sintetizan las hormonas esteroideas, y es de suma importancia para el correcto funcionamiento del cuerpo humano, ya que este tipo de hormonas se encargan de coordinar diferentes procesos, como es la absorción de calcio por parte de la CYP19A1, coordinar respuestas inflamatorias y estrés a través de la producción de corticosteroides (CYP21A2), el desarrollo de órganos sexuales y características femeninas (CYP19A1 para la producción de estrógenos) y masculinas (CYP17A1 para la producción de andrógenos). [1–4]



Esquema 1. Ruta de biosíntesis de diferentes esteroides. [5]

La ruta de biosíntesis de esteroides ha sido ampliamente estudiada por la relevancia farmacéutica que tienen las enzimas que catalizan la formación de hormonas esteroideas, ya

que su deficiencia o sobreexpresión puede generar diferentes enfermedades como diversos tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes, malformaciones de órganos reproductores, enfermedades mentales, entre otras, para las cuales no hay tratamientos suficientemente efectivos, y los tratamientos existentes en el mercado generan en su mayoría efectos secundarios por una interacción indeseada entre fármacos y otras enzimas de esta misma ruta biosintética, razón por la cual actualmente, se ha intensificado la búsqueda de inhibidores selectivos para enzimas de esta ruta metabólica. [6,7]

Además de lo anterior, la relevancia de estas enzimas como dianas farmacológicas viene de su relación con diferentes enfermedades patológicas como el cáncer de próstata (CYP17A1), cáncer de mama (CYP19A1), esquizofrenia (CYP11A1), hiperandrogenismo (CYP21A2), próstata hipoplásica (5α -reductasa), resistencia a la insulina (11 β -HSD), pseudohermafroditismo (17 β -HSD), entre otras. [8–13] En el caso particular del cáncer hormona-dependiente, en sus primeras fases responden a terapia de privación hormonal de andrógenos para cáncer de próstata, y estrógenos para cáncer de mama), la cual puede realizarse a través de cirugía o medicamento; sin embargo, suele haber recaídas, y estudios posteriores apuntan a la presencia de hormonas intratumorales, regresando eventualmente a los mismos niveles hormonales antes del tratamiento. [1,13–18]

Este interés farmacéutico ha dirigido mayor parte de la investigación, lo cual puede observarse en el creciente interés por el diseño de moduladores de la esteroidogénesis (figura 1), siendo una de las principales limitantes en su diseño, la presencia de efectos secundarios por interacción cruzada no deseadas con otras enzimas. [19–21]

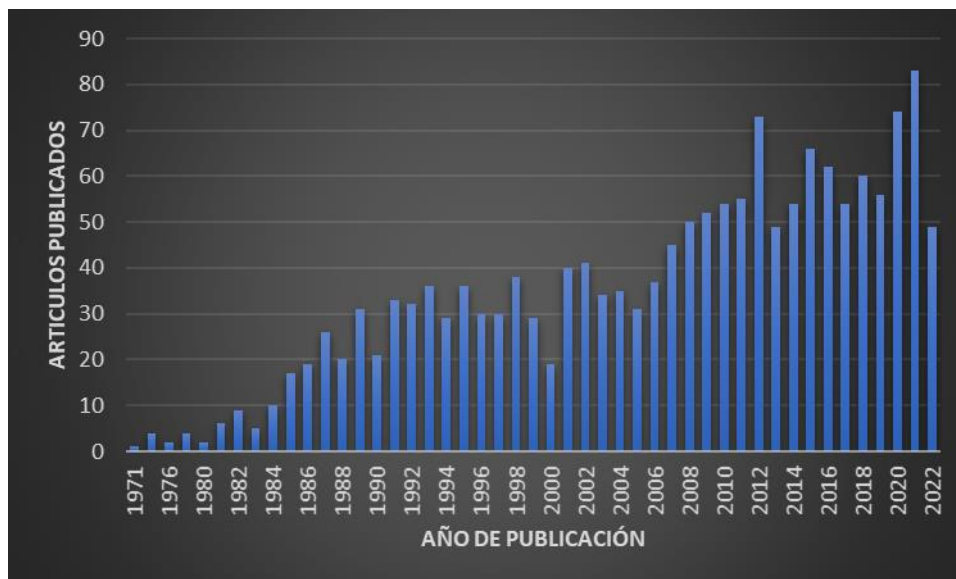


Figura 1. Screening de artículos publicados "steroidogenesis modulators" en la plataforma *PubMed*.

Una de las estrategias con un creciente uso para el diseño de inhibidores específicos es el diseño dirigido mediante estudios *in silico*, debido a su bajo costo, confiabilidad y repetibilidad, una de las herramientas más utilizadas es el *docking molecular*. [22,23] Esta técnica evalúa posibles interacciones utilizando estructuras cristalizadas de proteínas, y ha sido utilizada para dirigir el diseño de inhibidores de siguiente generación como análogos de abiraterona (análogo de la pregnenolona), buscando retener inhibición de CYP17A1 disminuyendo la interacción con la CYP21A2. Estos análogos han demostrado que modificaciones puntuales incrementan la selectividad hacia la CYP17A1 más de 80 veces permitiendo la biosíntesis natural de mineralocorticoides (comparando la k_m de los compuestos con las enzimas). [24,25]

La importancia de esta superfamilia de proteínas (CYPs) proviene no solo de la importancia de la esteroidogénesis, si no de su papel para el metabolismo de fármacos y su transformación a formas activas. Por otro lado, si estas enzimas son inhibidas, el metabolismo de fármacos es impedido, presentando una acumulación la cual puede llegar a niveles tóxicos. A su vez, si el metabolismo del fármaco es demasiado rápido, el fármaco no llega a concentraciones necesarias para presentar el efecto deseado. [6,7,19]

Por lo expuesto anteriormente, es de especial importancia la evaluación de posibles efectos secundarios, para el diseño dirigido de moduladores y/o inhibidores específicos de la esteroidogénesis, debido a la relevancia farmacológica que tienen las enzimas de esta ruta. Por lo cual en el presente trabajo se busca mediante estudios *in silico* el diseño dirigido de inhibidores específicos, así como la evaluación de interacciones cruzadas con las demás enzimas de esta ruta metabólica.

2 Antecedentes

2.1 ESTEROIDOGÉNESIS

La esteroidogénesis es la ruta biosintética a través de la cual se sintetizan las hormonas esteroideas; éstas a su vez se encargan de coordinar diferentes procesos fisiológicos, como la absorción de calcio por la CYP19A1, respuestas inflamatorias y de estrés a través de la producción de corticosteroides, desarrollo de órganos sexuales y características femeninas (estrógenos) y masculinas (andrógenos). [26–29] Esta ruta ha sido ampliamente estudiada debido a la relevancia farmacológica de cada una de las enzimas involucradas, tal es el caso de la enzima 17 α -hidrolasa/17,20 liasa (CYP17A1), fundamental para una maduración sexual saludable, catalizando el paso de progestágenos a andrógenos a través de una hidroxilación seguida de una liberación de un acetilo en C17 por acción de la enzima CYP19A1 transformándose a estrógenos, se expresa en testículos, ovarios, glándulas adrenales, y en algunos tipos de tumores, y se ha encontrado en algunos tipos de tejido de cáncer de mama. [4,9]

Debido a esta relevancia farmacológica, se han obtenido diferentes estructuras cristalizadas de estas enzimas para su uso en estudios *in silico* (tabla 1), las cuales pueden ser utilizadas para la búsqueda de inhibidores específicos, ya que una de las principales limitantes para su diseño es la presencia de efectos secundarios por interacción cruzada. [20,29]

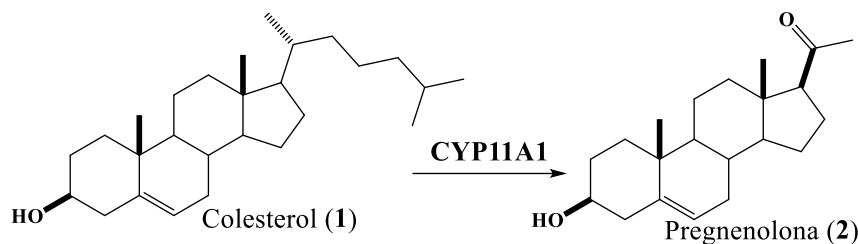
Tabla 1. Cristales publicados en la base de datos *Protein Data Bank*.

Enzima	Cantidad de cristales asociados publicados	Referencias de cristales
CYP11A1	4	[30,31]
CYP17A1	16	[24,29,32,33]
17 β -HSD	66	[34–41]
5 α -reductasa	2	[42,43]
3 β -HSD	0	-
CYP21A2	2	[28,44]
11 β -HSD	40	[45–50]
CYP19A1	11	[51–54]
Aldosterona sintasa	9	[55–60]

Cabe resaltar que no todas las proteínas tienen estructuras cristalizadas, tal es el caso de la 3β -HSD, o anteriormente la 5α -reductasa, ya que estas estructuras fueron recientemente en 2021, [42,43] esta ausencia de cristales publicados se debe ya sea a su poca relevancia como diana farmacológica o a la alta sensibilidad por parte de la proteína, por otro lado, no todos los cristales son viables para su uso en estudios *in silico* por lo que es necesario una previa validación y correlación entre los reportes bibliográficos, para cada uno de las proteínas para estudio. [61,62]

2.1.1 CYP11A1

La CYP11A1 también conocida como enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol, cataliza la síntesis de la pregnenolona a partir del colesterol, iniciando la esteroidogénesis (esquema 2). Cuando esta enzima funciona por debajo de niveles basales no hay generación de hormonas esteroideas. Al reducirse los niveles de andrógenos/estrógenos en sangre se puede generar hermafroditismo, osteoporosis y criptorquidismo y esterilidad en varones, así como esquizofrenia por bajos niveles de testosterona. [15]



Esquema 2. Acetilación y escisión de la cadena lateral en el carbono 19, catalizada por la CYP11A1. [5]

Cuando hay un incremento anormal de la actividad de esta enzima puede generar irregularidades en presión sanguínea por un exceso de cortisona, induciendo diabetes y acidosis, además, se ha encontrado que una sobreexpresión de CYP11A1 puede llevar a la reincidencia del cáncer de próstata resistente a la castración (cRPC.) [9,22] Dentro de los compuestos comerciales que tienen una acción inhibitoria contra esta enzima se encuentra el ketoconazol (19), la aminoglutetimida (20) y el mitotano (21) (figura 2). [63]

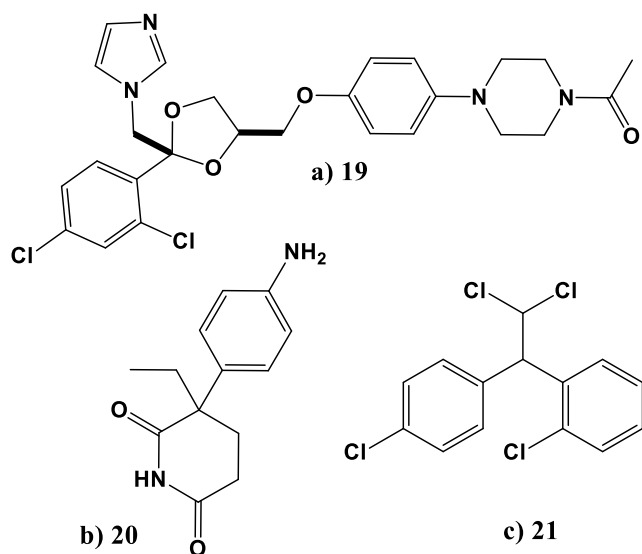
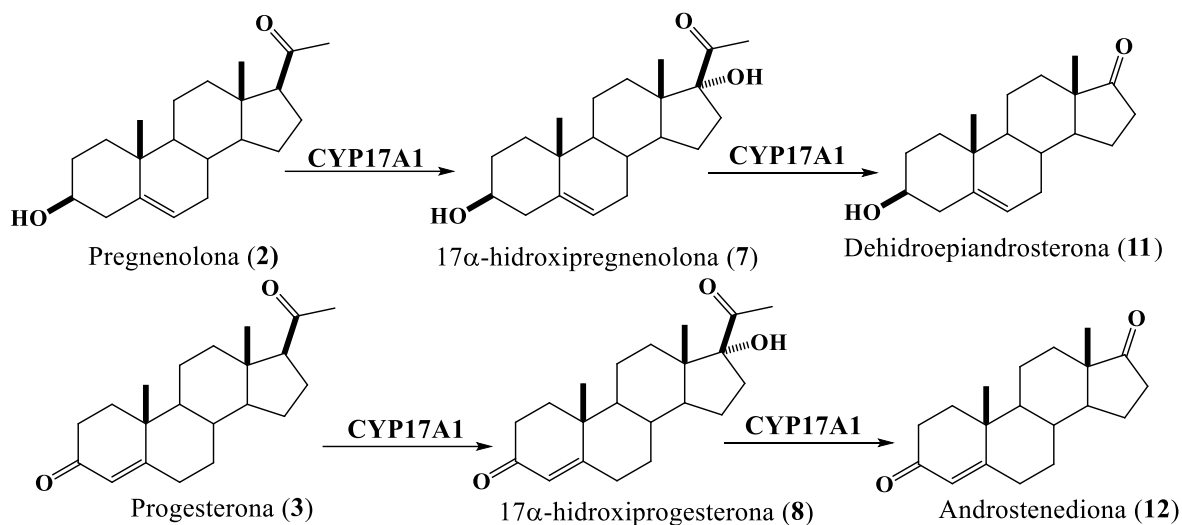


Figura 2. Algunos compuestos con actividad inhibitoria hacia la CYP11A1: a) Ketoconazol (**19**); b) Aminoglutetimida (**20**); c) Mitotano (**21**).

Actualmente se encuentran en desarrollo diferentes inhibidores protegidos por patente para el tratamiento de la reincidencia del CRPC, así como el posible reposicionamiento de fármacos para lograr inhibir esta enzima. [64,65]

2.1.2 CYP17A1

La CYP17A1 es una enzima que cataliza dos reacciones: primero añade un grupo hidroxila en C17, posteriormente cataliza la liberación de un grupo acetilo en C17 (esquema 3). Es de especial importancia en la adrenarquia (etapa de aumento de producción de hormonas sexuales) y puede dirigir hacia precursores de los glucocorticoides como el cortisol, que regula la respuesta inmune, o hacia andrógenos como la testosterona, dirigiendo el desarrollo y mantenimiento de características masculinas o estrógenos en mujeres [66,67].



Esquema 3. Reacciones catalizadas por la CYP17A1. [5]

Mutaciones de esta enzima puede causar hiperplasia adrenal congénita e infantilismo sexual, cáncer de mama, síndrome de ovario poliquístico (SOP), deficiencia de andrógenos, cáncer endometrial y cáncer de próstata [4-8]. Cuando hay una sobreexpresión de la CYP17A1, hay un aumento de cantidades de estrógenos promoviendo el desarrollo de cáncer de mama y una producción excesiva de andrógenos en hombres promueve el desarrollo de cáncer de próstata. [68,69] El cáncer de próstata es el cáncer más comúnmente diagnosticado en países occidentales, correspondiendo al 24% de todos los nuevos cánceres diagnosticados en 2018, es considerado la segunda y tercera principal causa de muerte relacionada al cáncer en hombres de América y Europa [70], además de su alta incidencia, la mayoría de casos son detectados en un estado avanzado, con una esperanza de vida de 5 años en USA en el 98% de los casos. [71,72] La tasa de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata metastásico es menor al 30%, [11,14] ya que el cáncer de próstata metastásico puede estar ya presente en una enfermedad diseminada al momento del diagnóstico, o como una enfermedad recurrente después de terapia. [73] La necesidad de inhibidores específicos para la CYP17A1 viene de la reincidencia que sufren la mayoría de los casos de cáncer de próstata, razón por la cual en los años 2008-2017 existió un declive significativo de muertes asociadas a diferentes tipos de cáncer excepto el de próstata. [74]

Otra opción de tratamiento para el cáncer de próstata es la privación de andrógenos, sin embargo, después de la respuesta inicial, casi todos los pacientes eventualmente progresan

después de 18-24 meses a un cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mPCRC, por sus siglas en inglés). La inhibición de la CYP17A1 tiene como efectos secundarios la disfunción hepática severa, diarrea, ginecomastia, dolor de pezones, espermatozoides anormales y sensibilidad aureolar, además de tener una efectividad baja (30%), por lo que los pacientes en su mayoría llegan a la metástasis del cáncer de próstata resistente a la castración mCRPC. [69,70,72,75] Sin embargo, de las diferentes alternativas, la que ha generado mejores resultados ha sido la búsqueda de inhibidores específicos. En 1987 se encontró que esta enzima era inhibida por varios imidazoles, los cuales son utilizados para el tratamiento de infecciones fúngicas, generando efectos secundarios. Para inducir una respuesta tumoral utilizando estos compuestos, es necesario administrar altas dosis, las cuales presentan alta toxicidad en el 30% de pacientes, así como una reincidencia pasado ciertos meses. [1,4,14,76,77]

Uno de los primeros inhibidores diseñados, fueron derivados carboxaldehídicos del pregnano (figura 3), estos inhiben la actividad de la enzima en microsomas testiculares de rata mediante inhibición competitiva. [78]

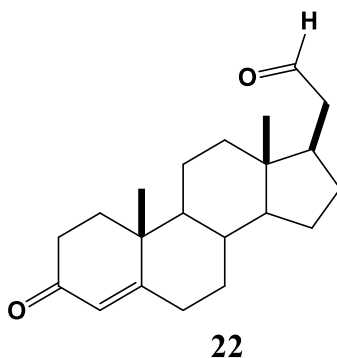


Figura 3. Estructura del 3-oxopregn-4-en-21-al (22).

En el 2010 el docetaxel se convirtió en el estándar para el tratamiento de mPCRC y fue el primer fármaco utilizado para prolongar la esperanza de vida; posteriormente se desarrollaron 4 nuevos fármacos: el cabazitaxel, abiraterona, enzalutamida y apalutamida (figura 4) [73]. Actualmente, la abiraterona es el fármaco más utilizado, este inhibe la CYP17A1, suprimiendo la síntesis de andrógenos en glándulas adrenales, testículos y tumores. [20,73,76,79]

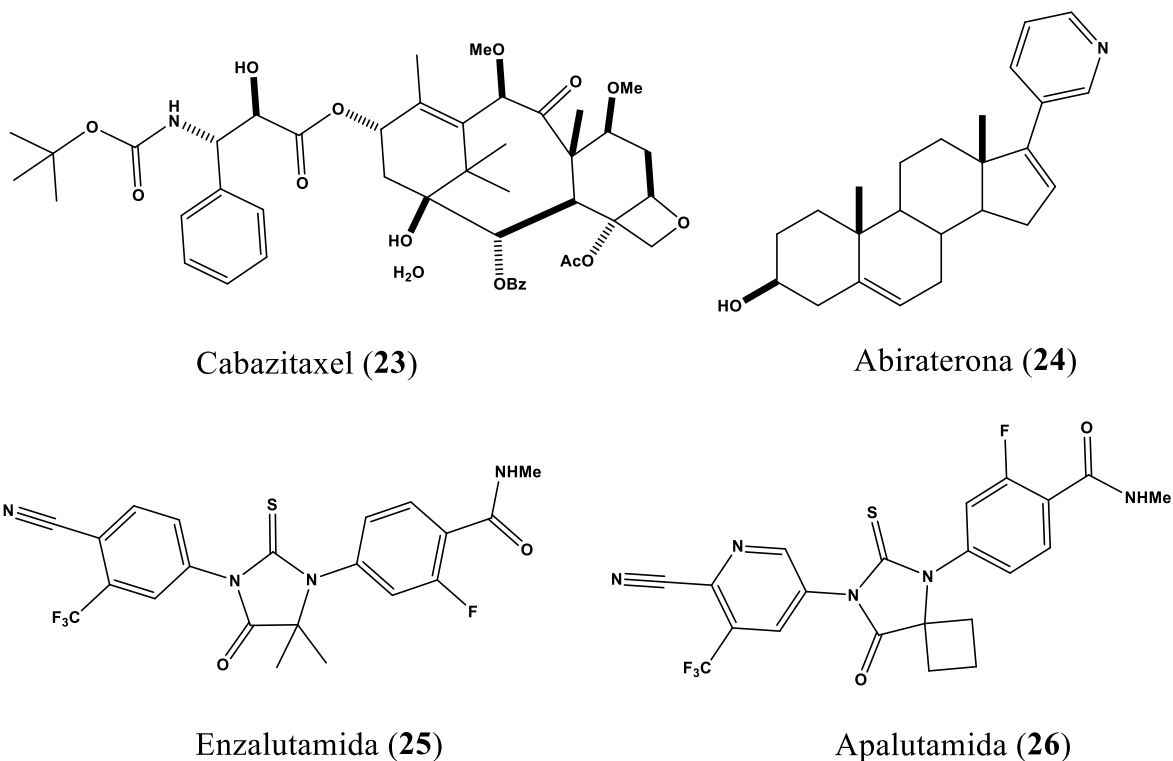


Figura 4. Fármacos desarrollados para el tratamiento del mPCRC. [73]

Diferentes estudios han reportado que derivados con un grupo piridil en compuestos androscánicos son potentes inhibidores de la biosíntesis de andrógenos *in vivo*, dentro de estos compuestos se encuentra la abiraterona (figura 5), aprobada en 2011 por la FDA para el tratamiento de cáncer de próstata avanzado. Esta es un derivado de pregnenolona, el anillo piridil junto con el doble enlace en 16 y 17 orienta este anillo hacia el hierro del grupo hemo, generando una inhibición irreversible. Efectos secundarios de la abiraterona por interacción con la CYP21A2, incluyen un incremento en la producción de mineralocorticoides, generando hipertensión, sobrecarga de fluidos, edemas e/o hipopotasemia por lo que pacientes con hipertensión como una condición preexistente pueden presentar complicaciones. [4,24,80]

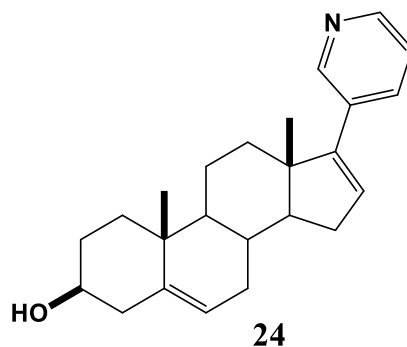


Figura 5. Estructura del inhibidor comercial abiraterona (24).

Otra desventaja de la abiraterona es la generación de resistencia, para la cual se desconocen los mecanismos, sin embargo, se sabe que la mayoría de los pacientes con cáncer que son tratados con abiraterona, tienen un incremento en antígeno prostático específico (PSA), lo que sugiere la reactivación de receptores de andrógenos (AR) u otra vía de señalización de esteroides que causa este aumento en la transcripción de PSA. Hasta el momento no se ha encontrado un mecanismo independiente de CYP17A1 para la biosíntesis de andrógenos, por lo que una de las alternativas es no inhibir la función de liasa en 17 y 20. [1]

Se ha encontrado que derivados de pregnenolona tienen actividad inhibitoria, siendo los compuestos hidroxilados y cetónicos los que tienen una mayor selectividad inhibitoria. A su vez, mediante análisis *in silico*, la presencia de insaturaciones en el anillo A y B, grupos voluminosos en el carbono 17, así como hidroxilos/cetonas en la posición 3 del esqueleto esteroideo (figura 6) tiene efecto positivo sobre la inhibición. [81,82]

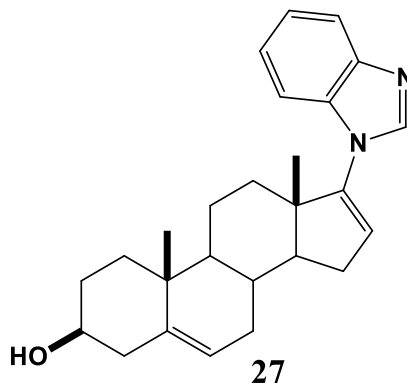


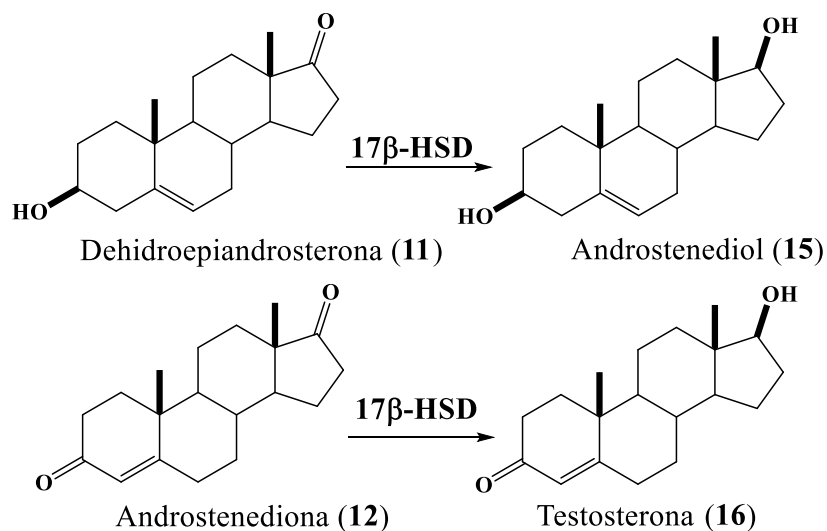
Figura 6. Inhibidor galeterona (27) de la CYP17A1 encontrado por análisis *in silico* e *in vitro*.

Tomando en cuenta la información anterior, se justifica la búsqueda de inhibidores de la CYP17A1 para el tratamiento de cáncer de próstata, analizando posibles interacciones con otras proteínas de la esteroidogénesis para evitar interacciones no deseadas, mediante el uso

de análisis *in silico* para seleccionar potenciales inhibidores selectivos y posteriores pruebas *in vitro*.

2.1.3 17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD)

La enzima 17 β -HSD cataliza la interconversión entre los 17 β -hidroxiesteroides activos a sus formas menos activas 17-cetoesteroides (esquema 4), por lo que el papel principal de esta enzima es la regulación androgénica en la próstata. La actividad de la 17 β -HSD regula el efecto de la progesterona en tejido endometrial, se han encontrado altos niveles de expresión de la 17 β -HSD en células epiteliales de tejido endometrial luego de haber sido expuesta a progesterona *in vivo* e *in vitro*. [83,84]



Esquema 4. Reacción catalizada por la 17 β -HSD. [9,28]

Deficiencia de esta enzima lleva a una elevado androstenediona y baja testosterona en suero, esta deficiencia genera una feminización de niño, en algunos casos esto se corrige en la pubertad llegando hasta un fenotipo de hombre normal, existen pocos casos reportados de pseudohermafroditismo, deficiencia de esta enzima puede generar alopecia, ictiosis y pseudohermafroditismo. [13] El interés farmacéutico de inhibidores de esta enzima proviene de su sobreexpresión en casos de cáncer de próstata. Se ha encontrado que derivados de la cumarina, así como el tamoxifeno y clomifeno (figura 7), tienen una actividad inhibitoria para la 17 β -HSD, siendo una de las desventajas la actividad inhibitoria irreversible por parte del tamoxifeno. [86]

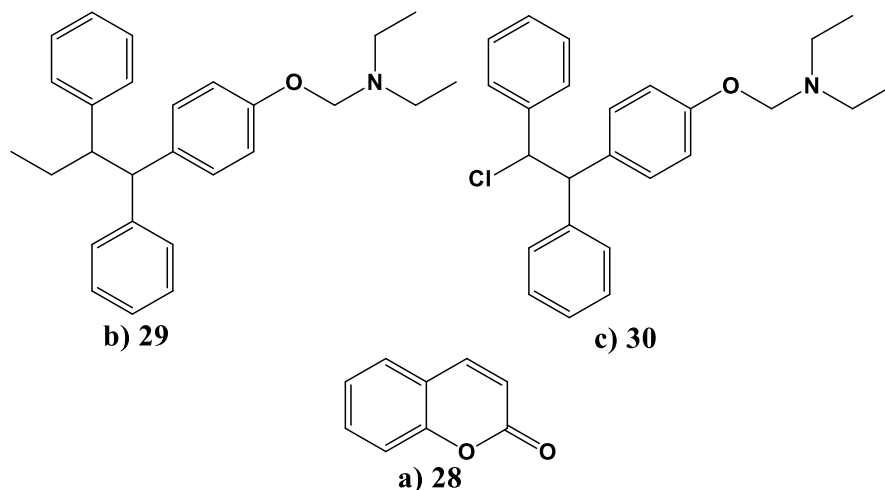


Figura 7. Fármacos que inhiben la 17 β -HSD: a) Cumarina (**28**); b) Tamoxifeno (**29**); c) Clomifeno (**30**).

Por otro lado, se ha encontrado que derivados de androsterona (figura 8) con modificaciones puntuales en el carbono 3 y el carbono 17, al añadir grupos polares en estos carbonos presentaba un efecto inhibitorio para la 17 β -HSD. [87]

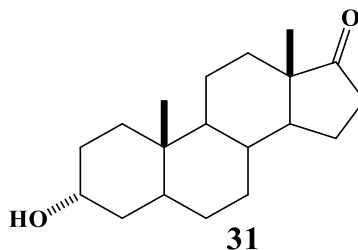
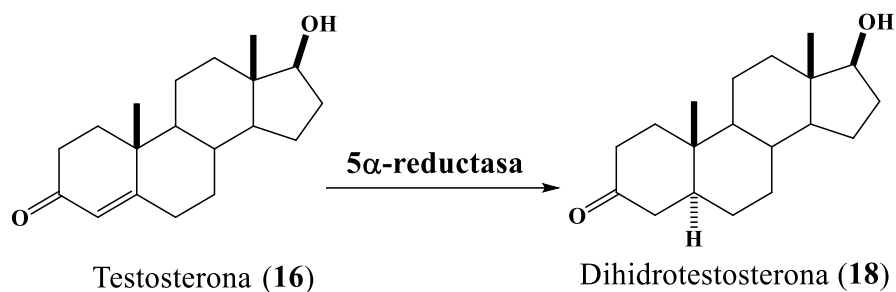


Figura 8. Androsterona (**31**)

2.1.4 5 α -reductasa

La enzima 5 α -reductasa cataliza la síntesis de dihidrotestosterona (DHT) a partir de testosterona (esquema 5), es de suma importancia en el desarrollo de genitales externos en edades tempranas, así como un balance hormonal, ya que la DHT tiene una afinidad por receptores de andrógenos (AR) hasta 5 veces más fuerte que la testosterona. [85]



Esquema 5. Reducción del doble enlace en los carbonos 4 y 5, catalizada por la 5 α -reductasa. [9,28]

La deficiencia de la 5 α -reductasa genera genitales externos ambiguos, próstata hipoplásica no palpable al realizar una examinación rectar y de una décima parte del tamaño normal, en la pubertad, genitales externos se viralizan parcialmente, escasos cabellos sexuales secundarios, así como calvicie en hombres y acné. [17] Los compuestos ya comerciales que se ha encontrado tienen un efecto inhibitorio para esta enzima se encuentra la flutamida (figura 9), siendo la principal limitante los efectos secundarios. Otra alternativa es el uso de derivados esteroideos como la finasterida ya que estos tienen un menor grado de toxicidad que contrapartes no esteroideas. [88,89]

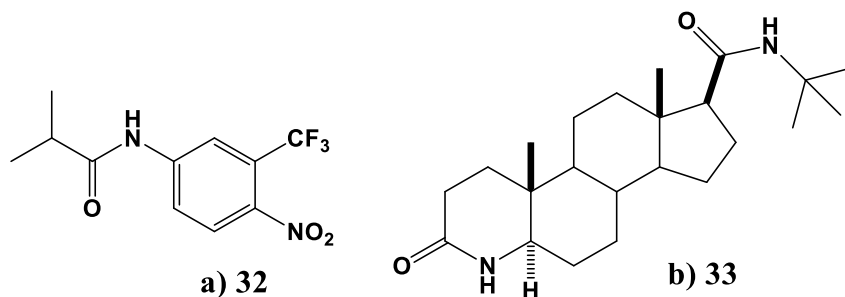
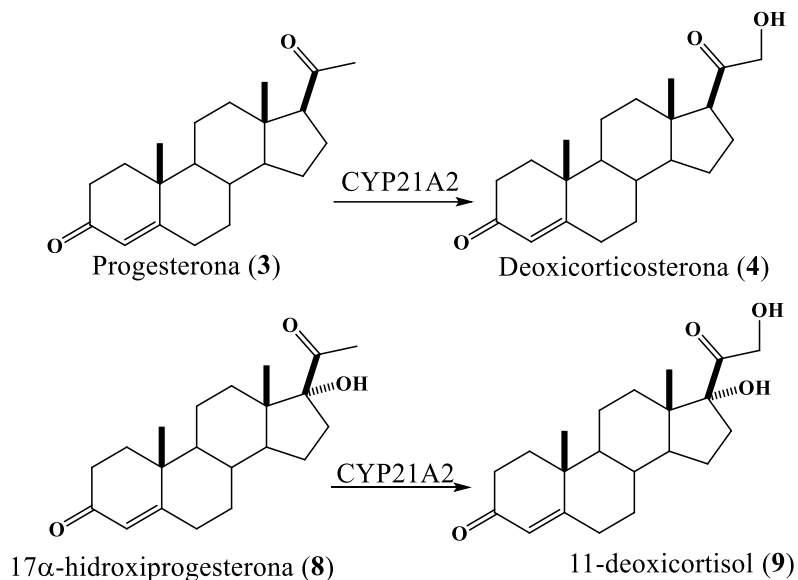


Figura 9. a) Flutamida; b) Finasterida.

2.1.5 CYP21A2

La enzima CYP21A2 se encarga de la síntesis de corticoides (esquema 6) a partir de andrógenos como lo son la progesterona y la 17 α -hidroxiprogesterona. [85]



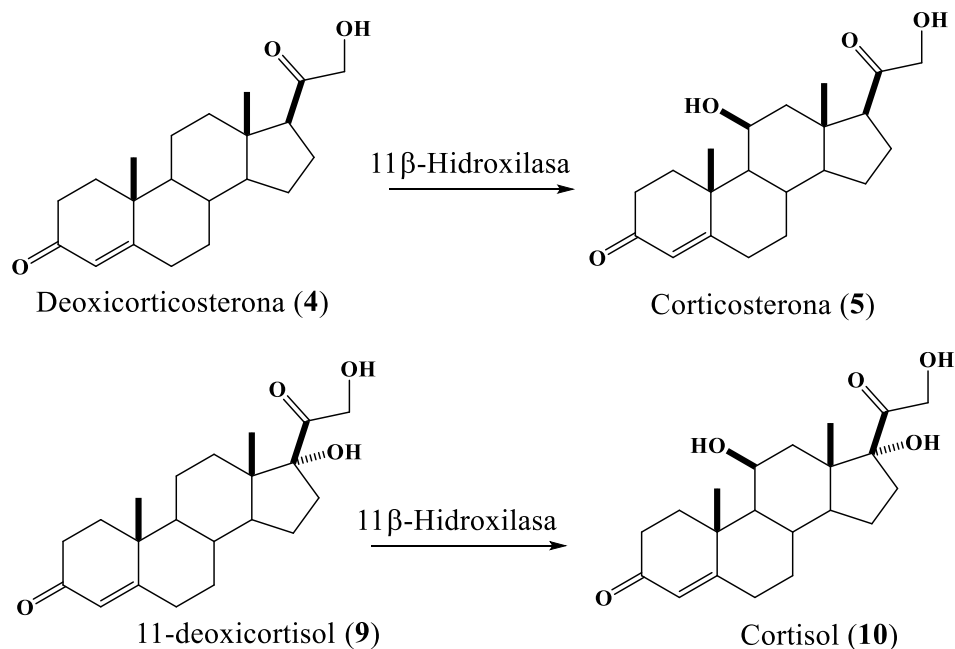
Esquema 6. Reacción catalizada por la CYP21A2. [5,85]

La deficiencia de la CYP21A2 genera hiperandrogenismo y si no se trata a tiempo puede llevar al vomito, letargo y dificultad para ganar peso, en el caso de recién nacidos afectados presentan hiponatremia, hipercalcemia y shock hipovolémico, en un estado más avanzado de desarrollo puede generar una hiperplasia congénita adrenal (CAH), déficit de cortisol y aldosterona, así como niveles elevados de andrógenos. Un funcionamiento incorrecto en un estado de desarrollo embrionario lleva a diferentes grados de virilización de genitales externos en mujeres. Estas son tratadas por correcciones con cirugía durante el primer año de vida, y tratamientos farmacológicos consisten de administración de glucocorticoides y en algunos casos sustitución de mineralocorticoides [16,90] La inhibición de esta enzima por interacción cruzada causada por la abiraterona en el tratamiento del cáncer de próstata genera efectos secundarios, razón por la cual se busca el diseño de fármacos con una mayor selectividad para la CYP17A1 y con menor interacción con la CYP21A2. [24] Se ha encontrado a su vez que el antiviral efavirenz y ciertos flavonoides extraídos de la planta rooibos (*Aspalathus linearis*) tienen un efecto inhibitorio. Lo cual puede llegar a generar anomalías en la producción de corticosteroides, y por lo tanto, efectos secundarios.[91,92]

Para esta enzima, los inhibidores derivados de esteroides provienen de un previo diseño dirigido para la inhibición de la CYP17A1, donde la actividad contra la CYP21A2 se considera un efecto secundario y no como una actividad terapéutica. [24]

2.1.6 11 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β -HSD)

La 11 β -HSD se encarga de hidroxilar la posición 11 de deoxicorticosterona y 11-deoxicortisol (esquema 7) catalizando la conversión de glucocorticoides activos a sus productos inactivos (corticosterona y cortisol), se encuentra principalmente en hígado, colon, glándulas salivales y la placenta. [18,85]



Esquema 7. Hidroxilación catalizada por la 11 β -HSD. [9,28]

Inhibidores de la 11 β -HSD se han estudiado para ser utilizados como terapia renal inmunosupresora, ya que una reducción excesiva de cortisona a cortisol en el hígado puede llevar a resistencia de insulina en diabetes tipo 2, y la inhibición de esta enzima puede llevar a una disminución de la gluconeogénesis [18]

Recientes estudios encontraron que la flavonona (figura 10), así como diferentes tiazolidinedionas, adamantitriazoles, arilsulfonamidotiazoles, entre otros compuestos, inhiben de forma selectiva la CYP21A2 al tener una alta afinidad por esta enzima, esta actividad es utilizada para la reducción de peso, tratar la resistencia a la insulina, diabetes y disminución de corticosteroides en sangre. [12,93]

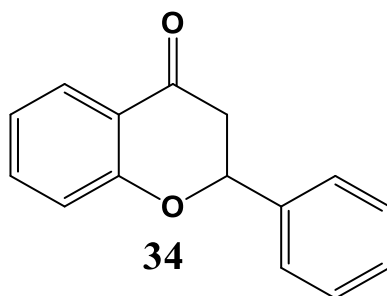
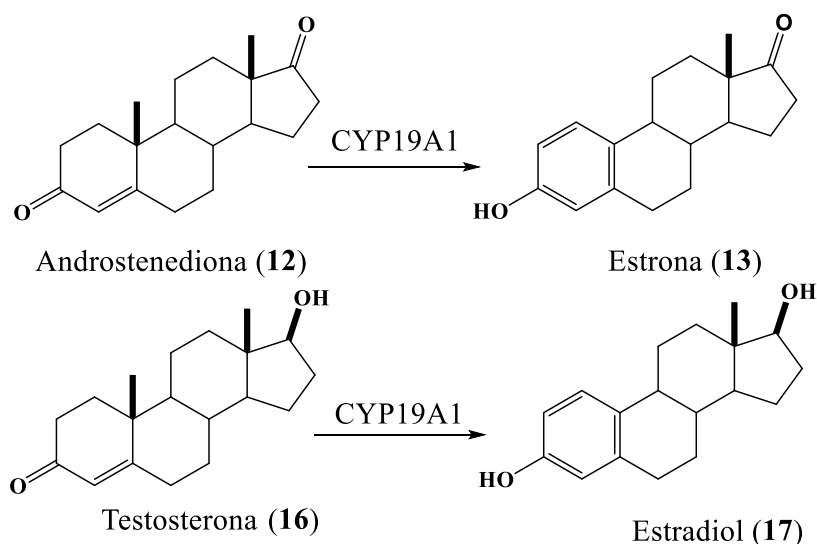


Figura 10. Flavonona (34).

Para esta enzima las únicas investigaciones que se han realizado de inhibidores de naturaleza esteroidea es utilizar inhibidores endógenos como el estradiol, o derivados de la corticosterona para disminuir la actividad de esta enzima. [94,95]

2.1.7 CYP19A1 (Aromatasa)

La aromatasa o CYP19A1, se encarga de la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos (esquema 8) a partir de una eliminación y reducción de la cetona en el anillo A, se expresa principalmente en tejido adiposo, tejido óseo, en la placenta en humanos y en hígado fetal. En huesos se encarga de mantener niveles de mielinización, por lo que un funcionamiento anormal puede causar retraso en envejecimiento óseo, osteopenia y osteoporosis. A su vez se expresa en diferentes sitios del cerebro. [5,14]



Esquema 8. Reacción catalizada por la CYP19A1. [5]

Su relevancia farmacológica tiene origen en el descubrimiento de la secreción de estrógenos de diferentes tumores dentro de los cuales se encuentran carcinoma hepatocelular, endometrial, celulares tumorales de Sertoli obtenido de pacientes con síndrome de Peutz-

Jegher, tumores adrenocorticoideos, esto causa feminización en pacientes masculinos. En el cáncer de mama la actividad de la aromatasa dentro del tumor y alrededor del tejido adiposo es mayor a la del plasma de mujeres postmenopáusicas. [14]

A su vez, la obesidad se encuentra asociada con una sobreexpresión de la aromatasa en senos, lo cual incrementa producción local de estrógenos, y por tanto una predisposición para hiperplasia y cáncer. Aproximadamente 2 terceras partes de las mujeres adultas tienen obesidad, lo cual aumenta hasta 3 veces el riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación a mujeres postmenopáusicas con pesos normales. Mas de 60 mil nuevos casos anuales de cáncer de mama se encuentran ligados a obesidad y un incremento de adiposidad en USA. Por lo que se han desarrollado diferentes tratamientos como es el tratamiento hormonal para el cáncer de mama postmenopáusica pre/post quirúrgico, mediante el uso de inhibidores de aromatasa que bloquean la actividad de la aromatasa en el seno y la periferia, reduciendo la producción local de estrógenos lo cual suprime la recurrencia del tumor de mama. [96]

Uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento del cáncer de mama es el tamoxifeno junto con el anastrozol (figura 11), estos inhiben a la aromatasa/CYP19A1, disminuyendo la cantidad de estrógenos en sangre, sin embargo, por esta misma disminución drástica pueden llegar a generar desmineralización en huesos, así como un desbalance hormonal. [97,98]

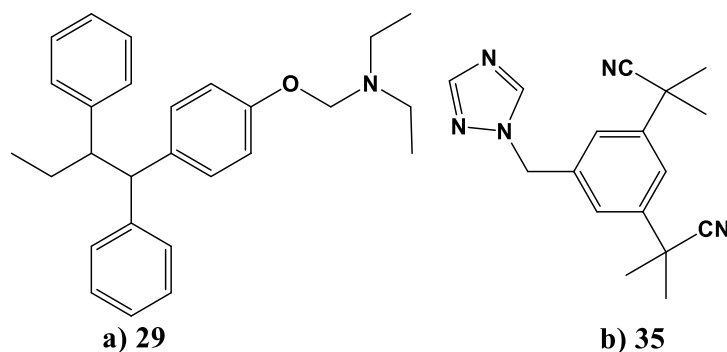


Figura 11. a) Tamoxifeno (29); b) Anastrozol (35).

A su vez se ha explorado la viabilidad de derivados esteroideos como inhibidores para esta enzima, encontrando que derivados sulfatados de esteroides tienen potencial como posibles inhibidores y tratamiento para el cáncer de mama. [98]

2.2 ESTUDIOS *IN SILICO*

En los años recientes una de las estrategias con un creciente uso (figura 12) para la búsqueda de inhibidores específicos, o compuestos *moduladores de la esteroidogénesis* es el uso de herramientas *in silico*, debido a su bajo costo y posibilidad de hacer análisis global de propiedades farmacocinéticas y análisis interaccional con proteínas con posterior corroboración *in vitro*.

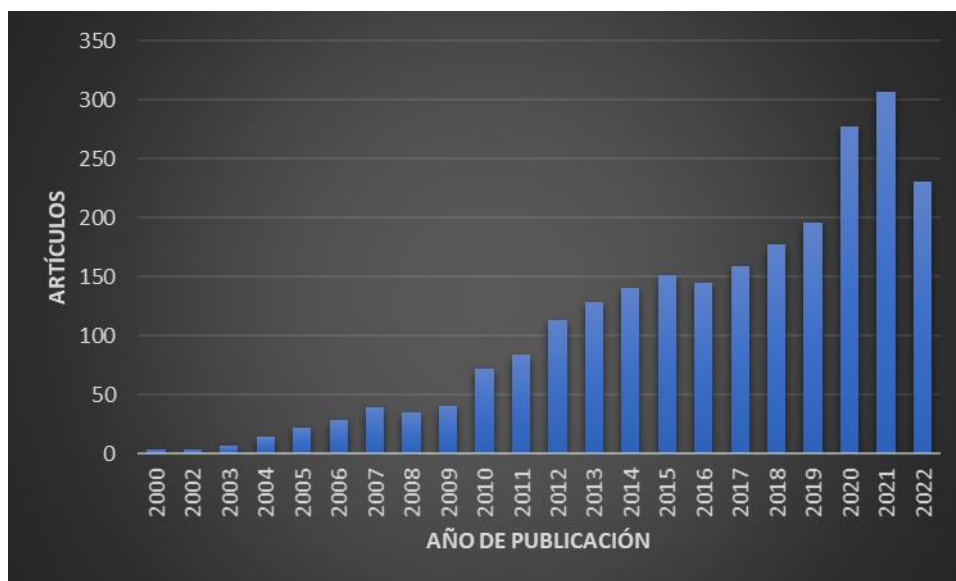


Figura 12. Screening “*specific inhibition in silico*” en la plataforma *PubMed*.

Diferentes análisis validan el uso de herramientas *in silico* para la búsqueda de posibles inhibidores o efectos secundarios. Uno de estos fue un análisis de relación estructura actividad (3D-QSAR) y análisis de acoplamiento molecular, donde se encontró que la distancia entre C17 y C16 del sustrato con el centro oxidativo de CYP17A1 y su habilidad para llenar el sitio activo tiene un efecto directo sobre la afinidad por dicha enzima, a su vez los puentes de hidrógeno entre 17 α -OH y el oxígeno próximo, así como la longitud del enlace C20-oxígeno terminal puede explicar la selección del sustrato que sufre rompimiento en C17-C20, razón por la cual compuestos como la dutasterida y abiraterona (figura 13) presentan actividad inhibitoria hacia esta enzima. [99]

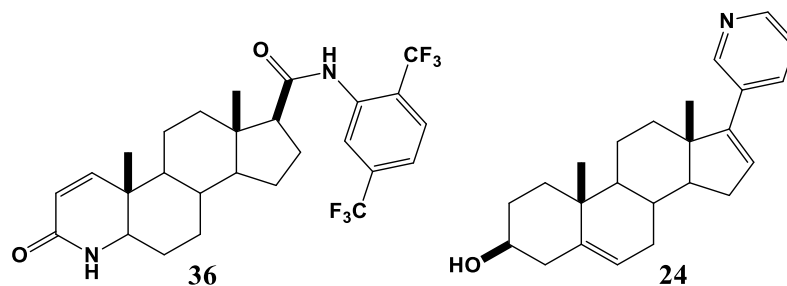


Figura 13. Inhibidores de la CYP17A1: a) Dutasterida (36); b) Abiraterona (24).

Actualmente se han buscado inhibidores selectivos para tratar el cáncer de próstata, una técnica ha sido el uso de análisis estructurales para cimentar la búsqueda de inhibidores selectivos, gracias a los cuales, se encontró que grupos funcionales con una alta electronegatividad en carbonos 17 o 20 tenían un mayor impacto sobre la afinidad con la CYP17A1. [99]

En 2019 gracias a análisis *in silico* se encontró que la fuente del efecto en la esteroidogénesis de los azoles (compuestos utilizados para el tratamiento de infecciones fúngicas) provenía de una inhibición de la CYP17A1 y CYP19A1 por parte del clotrimazol, CYP17A1 en el caso del miconazol y ketoconazol (figura 14), de toda la esteroidogénesis por parte del ketoconazol y CYP17A1/CYP21A2 por parte del fluconazol, estos resultados son de especial importancia ya que estos compuestos se usan principalmente para el tratamiento en mujeres embarazadas, dada la importancia de la producción de hormonas en el embarazo esta información es de alta relevancia farmacológica. Dichos resultados fueron comprobados por lo reportado en la literatura y a través de análisis *in vitro*, reafirmando la confiabilidad del uso de herramientas *in silico* para la busca de moduladores de la esteroidogénesis. [100]

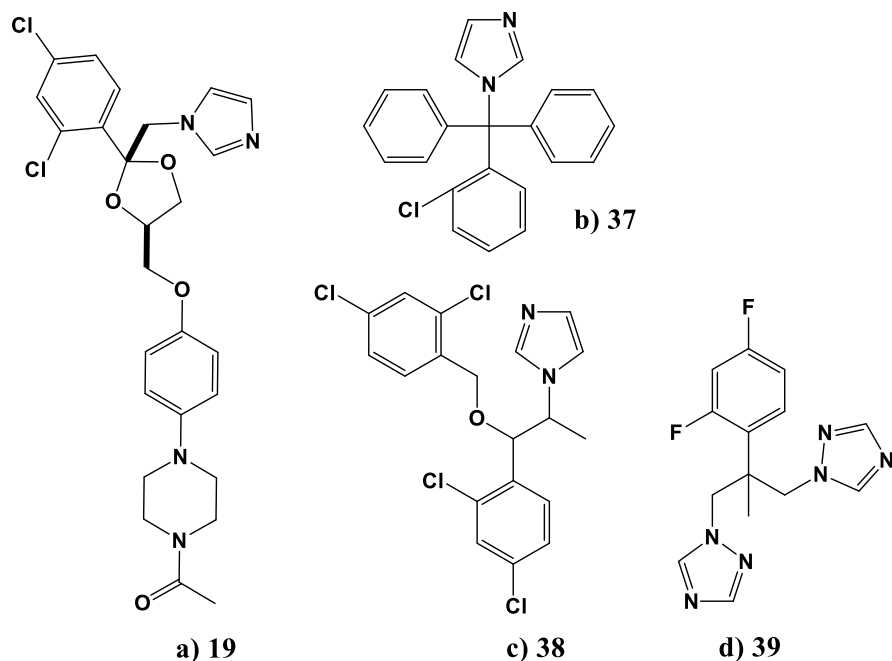


Figura 14. Inhibidores de las CYP21A2, CYP19A2 y CYP17A1: a) Ketoconazol (19); b) Clotrimazol (37); c) Miconazol (38); d) Fluconazol (39).

La viabilidad del uso de técnicas computacionales para la búsqueda de posibles efectos secundarios ha sido validada a través de pruebas *in vitro* e *in vivo* corroborando los resultados obtenidos mediante técnicas *in silico* (figura 15). [99,101,102]

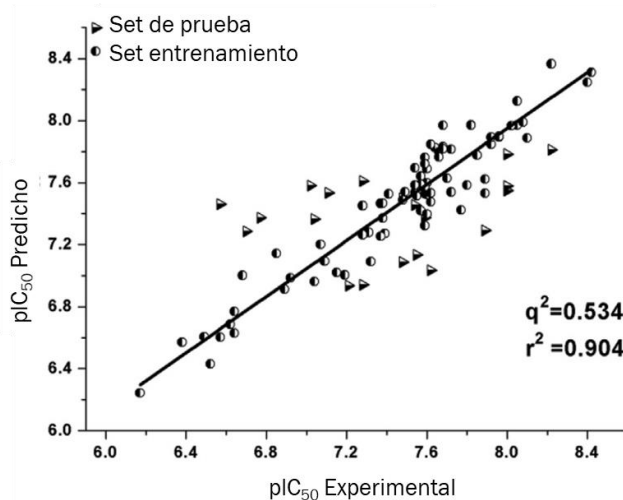


Figura 15. Resultados experimentales vs resultados predichos; pIC (logaritmo de concentración inhibitoria); COMFA (Análisis de campo molecular comparativo). [99]

Otro estudio que reafirma la confiabilidad de estos métodos fue realizado con bisfenoles como el bisfenol A (figura 16), contaminantes utilizados en la industria del plástico que se ha encontrado tiene un efecto inhibitorio para la síntesis de glucocorticoides, y a través de

estudios *in silico* se encontró una actividad inhibitoria con la CYP11A1, CYP19A1, CYP17A1, 17 β -HSD y CYP21A2, lo que indica que los bisfenoles inhiben la formación de progestágenos (por inhibición de la CYP17A1 y CYP11A1), también inhiben la formación de estrógenos al inhibir la CYP19A1, estos resultados respaldan el uso de este tipo de estudios para buscar posibles efectos secundarios. De igual forma se ha encontrado que el utilizar diferentes sustituyentes tiene un efecto directo en la actividad biológica. [21,103]

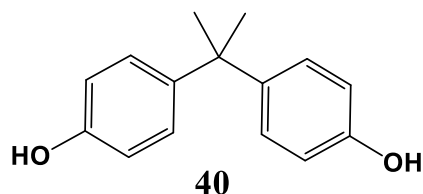


Figura 16. Bisfenol A (40).

A su vez se ha encontrado que ciertos flavonoides (figura 17) mediante el uso de técnicas *in silico*, con comprobación *in vitro* tienen efecto directo sobre la esteroidogénesis. [104]

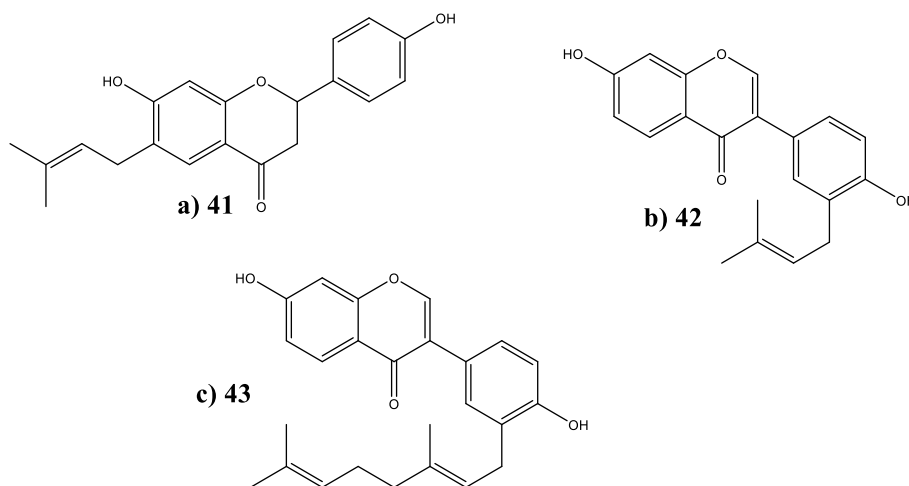


Figura 17. a) Bavaquina (41); b) Neobavaisoflavona (42); c) Corilifolia A (43). [104]

2.3 ESTEROIDES COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS

El uso de derivados esteroideos como fármacos es una alternativa que se busca por la facilidad de metabolización por parte del cuerpo humano, así como la menor cantidad de efectos secundarios, a contrapartes completamente sintéticas, y la facilidad actual del uso de técnicas *in silico*, para la realización de modificaciones puntuales en la estructura esteroidea.

Por ejemplo, los derivados de pregnenolona tienen actividad inhibitoria para la CYP17A1 donde los compuestos hidroxilados y cetónicos tienen mayor selectividad y, por ende, una menor cantidad de posibles efectos secundarios. [81,82]

Los derivados de androsterona con modificaciones puntuales en C-3 y C-17, tuvieron un efecto inhibitorio específico para la 17β -HSD. [87] Para la 5α -reductasa, la principal limitante para el uso de fármacos sintéticos son los efectos secundarios. Donde los derivados esteroideos como la finasterida tienen un menor grado de toxicidad que contrapartes no esteroideas. [88,89] En el caso del cáncer de próstata los inhibidores derivados de esteroides provienen de un previo diseño dirigido para la inhibición de la CYP17A1, previniendo la formación de andrógenos, donde la actividad contra la CYP21A2 se considera un efecto secundario y no como una actividad terapéutica. [24] Para esta, las únicas investigaciones que se han realizado de inhibidores de naturaleza esteroidea es utilizar inhibidores endógenos como el estradiol, o derivados de la corticosterona para disminuir la actividad de esta enzima. [94,95]

Por último, se ha explorado su viabilidad como inhibidores para la aromatasas/CYP19A1, encontrando que derivados sulfatados de esteroides tienen potencial como posibles inhibidores y tratamiento para el cáncer de mama.[98]

2.3.1 Esteroides espiroestánicos

Los espirostanos (figura 18) son una clasificación de compuestos provenientes de plantas, obtenidos a través de una hidrólisis ácida de sapogeninas esteroideas, y se ha encontrado que tienen una importante relevancia médica debido a sus propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias, entre otras. [105]

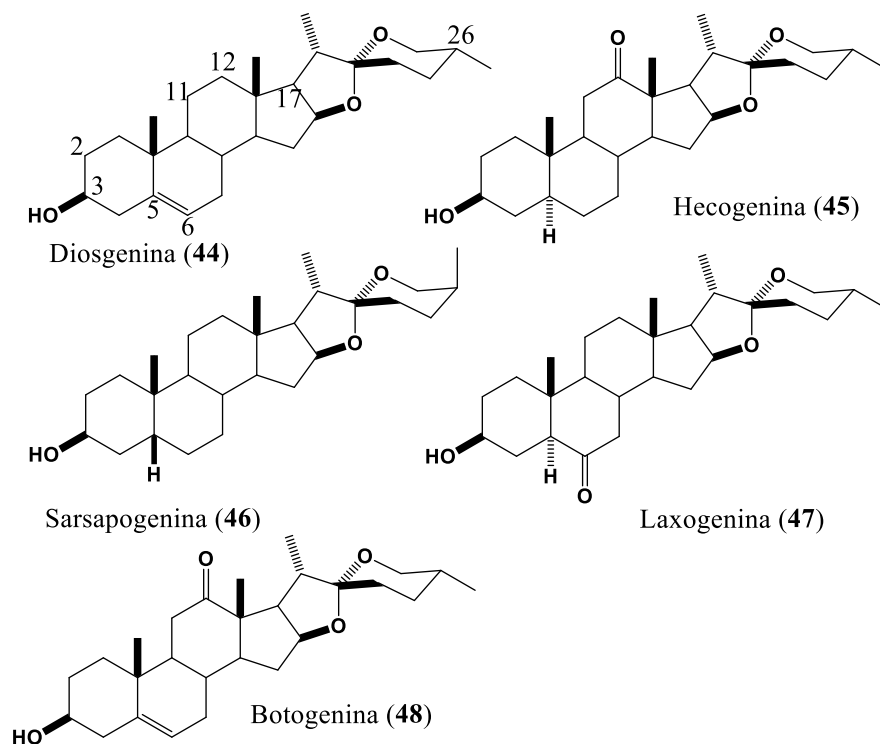


Figura 18. Estructuras espirostánicas. [106]

La actividad biológica de los espirostanos es muy variada, dentro de su actividad se ha encontrado que tienen; acción hemolítica, tóxico para animales de sangre fría, causan hipoglicemia, reduce niveles de colesterol, función abortiva, antizigóticos y anti-implantación, son estimulantes fuertes de hormona luteinizante, suprime la proliferación de células moduladas por la hormona fólculo-estimulante que coordina el crecimiento de ovarios y testículos, puede funcionar como viricida, antiinflamatorio, reducen la digestibilidad de la proteína, actividad antifúngica, antimicrobiana, disminuyen el riesgo de cáncer, antioxidante, inmunomodulador, antimalárica, analgésico, hepato-protector, etc. [105]

En 2021 un estudio reveló que de 123 derivados espirostánicos estudiados 115 tuvieron una mejor EA que el fármaco de referencia (minociclina), encontrando que el tener átomos de H en carbonos 2, 11, 17 aumentaba la afinidad por la proteína MAPK14 (proteína relacionada con el desarrollo del cáncer), así como αOH en C-5 y C-6 incrementaba la afinidad por la enzima. Esto resalta la importancia de modificaciones estructurales puntuales para el diseño dirigido de inhibidores selectivos. [106]

Como se observa en la tabla 2, la actividad biológica de diferentes espirostanos ha sido estudiada, encontrando un amplio espectro, variando desde actividad antioxidante, hasta un

efecto anticancerígeno, así como derivados obtenidos a partir de estos, aunque en el caso de la botogenina, no se encontró bibliografía de su actividad biológica.

Tabla 2. Actividad biológica de algunos espirostános

Espirostános	Actividad biológica
Diosgenina	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Induce cambios en liberación de estrógenos en ovarios. [44] ➤ Utilizado para tratar la hiperglucemia. [46,109] ➤ Efecto antioxidante. [47] ➤ Efecto antiinflamatorio. [48] ➤ Efecto anticancerígeno en diferentes líneas de cáncer (mama, hepatocarcinoma, próstata, osteosarcoma, leucemia). [107,108,110,111]
Laxogenina	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Efecto antitumoral en cáncer de pulmón en estado 2. [50] ➤ Reduce la formación de cáncer de piel. [19,112,113] ➤ Efecto antioxidante. [19,112,113] ➤ Glucoderivados tienen un efecto anticancerígeno en diferentes líneas celulares (HeLa, CaSki, ViBo). [113] ➤ Derivados hidroxiiimínicos tienen efectos anticancerígenos en líneas de cáncer de mama. [114]
Hecogenina	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Efecto anticancerígeno al interactuar con receptores de factores de crecimientos (GFRs). [115] ➤ Acetato de hecogenina tiene efecto anticancerígeno induciendo arresto del ciclo celular y senescencia. [111,116] ➤ Esteres de alquilo de hecogenina tienen efecto anticancerígeno. [117]

Por último, se ha observado que la presencia de un grupo oxima e insaturaciones en los anillos A o B aumenta la selectividad 84 veces para los análogos de abiraterona, esto para la selectividad de interacción para la CYP17A1 y la CYP21A2. [24]

2.3.2 Derivados 22-oxocolestánicos

Se ha encontrado que derivados 22-oxocolestánicos (figura 19) de algunos espirostanos tiene efecto antifúngico hacia fitopatógenos, y un efecto nulo o despreciable hacia hongos que son benéficos para el crecimiento de las plantas, además de una alta actividad como promotor de crecimiento vegetal. Estos resultados junto con su alto porcentaje de obtención de algunos de estos (72-74%) los hacen viables para su uso como PCV. [103,118]

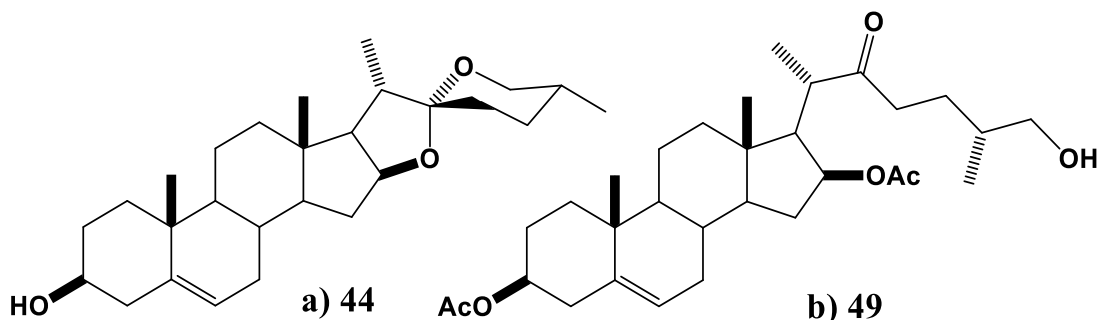


Figura 19. a) diosgenina (44); b) derivado (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3β,16β-dioldiacetato (49). [103]

El interés por estos compuestos no viene solamente de su uso para el desarrollo agrario, ya que se ha encontrado que ciertos derivados 22-oxocolestánicos de diosgenina y hecogenina presentan un fuerte efecto antiinflamatorio *in vivo*, así como efecto antiproliferativo en diferentes líneas celulares de cáncer de cérvix. A su vez, como se presentó anteriormente, se ha observado que modificaciones puntuales pueden potenciar la actividad biológica, o generar efectos secundarios por interacciones no deseadas, específicamente con las CYPs, por lo que en el presente trabajo se busca evaluar mediante técnicas *in silico*, la posible interacción entre estos PCVs y enzimas de la esteroidogénesis. [119,120]

3 Hipótesis

Los compuestos espirostánicos tienen un efecto inhibitorio sobre las enzimas de la esteroidogénesis, los derivados 22-oxocolestánicos no tienen efecto sobre esta ruta metabólica.

4 Objetivos

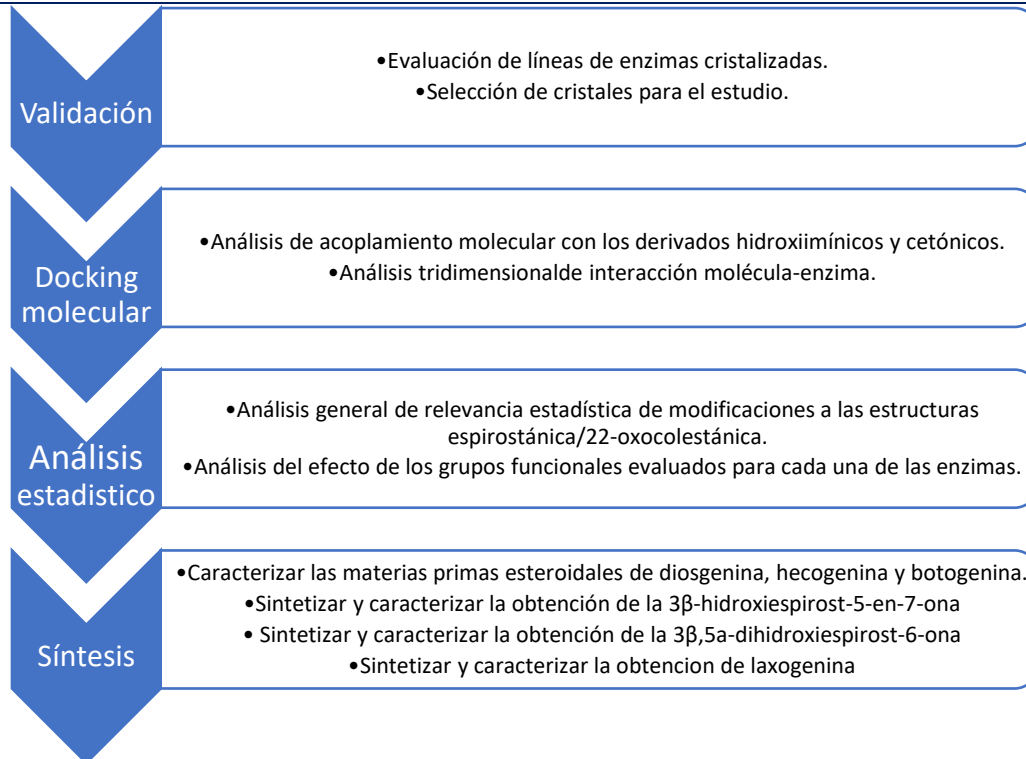
Objetivo general:

- Diseñar *in silico* y sintetizar derivados cetónicos e hidroximínicos a partir de espirostanos y 22-oxocolestanos como posibles agentes reguladores de la esteroidogénesis.

Objetivos particulares:

- Evaluar mediante docking molecular la energía de acoplamiento de los derivados espirostánicos/22-oxocolestánicos con las enzimas asociadas a la esteroidogénesis.
- Evaluar posibles efectos secundarios de los compuestos, mediante análisis interaccional.
- Seleccionar los derivados con mejor resultado para llevar a cabo su síntesis.
- Sintetizar y caracterizar los compuestos seleccionados *in silico*.

5 Metodología



Esquema 9. Etapas del estudio.

5.1 PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS Y LIGANDOS.

Las proteínas fueron elegidas y descargadas de la base de datos PDB-BANK, tomando en cuenta como parámetro de descarte el rango de resolución de los cristales (2-3 Å), a su vez cada cadena fue seleccionada de acuerdo con la calidad señalada en el reporte completo del cristal de la proteína. Se realizó minimización de energías, y cargas y ángulos de los aminoácidos de la proteína fueron añadidas mediante el software *chimera 1.15rc*. La preparación para el análisis de acoplamiento molecular se realizó mediante *Autodock tools 1.5.6*. Este mismo proceso se repitió para cada co-cristal.

Cada ligando fue dibujado *de novo*, se le realizó minimización de energía mediante los paquetes computacionales MM2 [121] y PM7 de MOPAC [122] y preparado para el *docking molecular* mediante *Autodock tools 1.5.6*. El *docking molecular* fue realizado mediante el software *Autodock vina*. [123]

Los derivados hidroximinicos y cetónicos propuestos (figura 20 y 21) para su posterior análisis, son los siguientes:

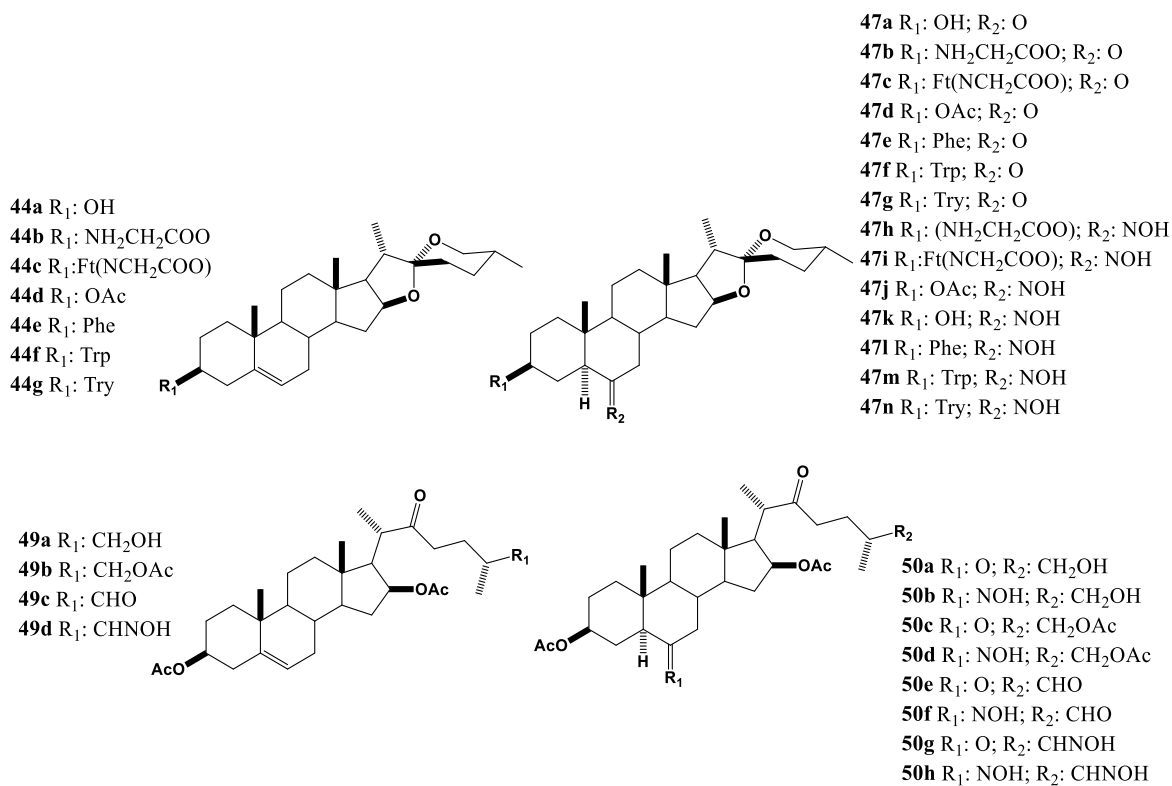


Figura 20. Derivados hidroximinicos y cetonicos de diosgenina (**44a**) y laxogenina (**47a**).

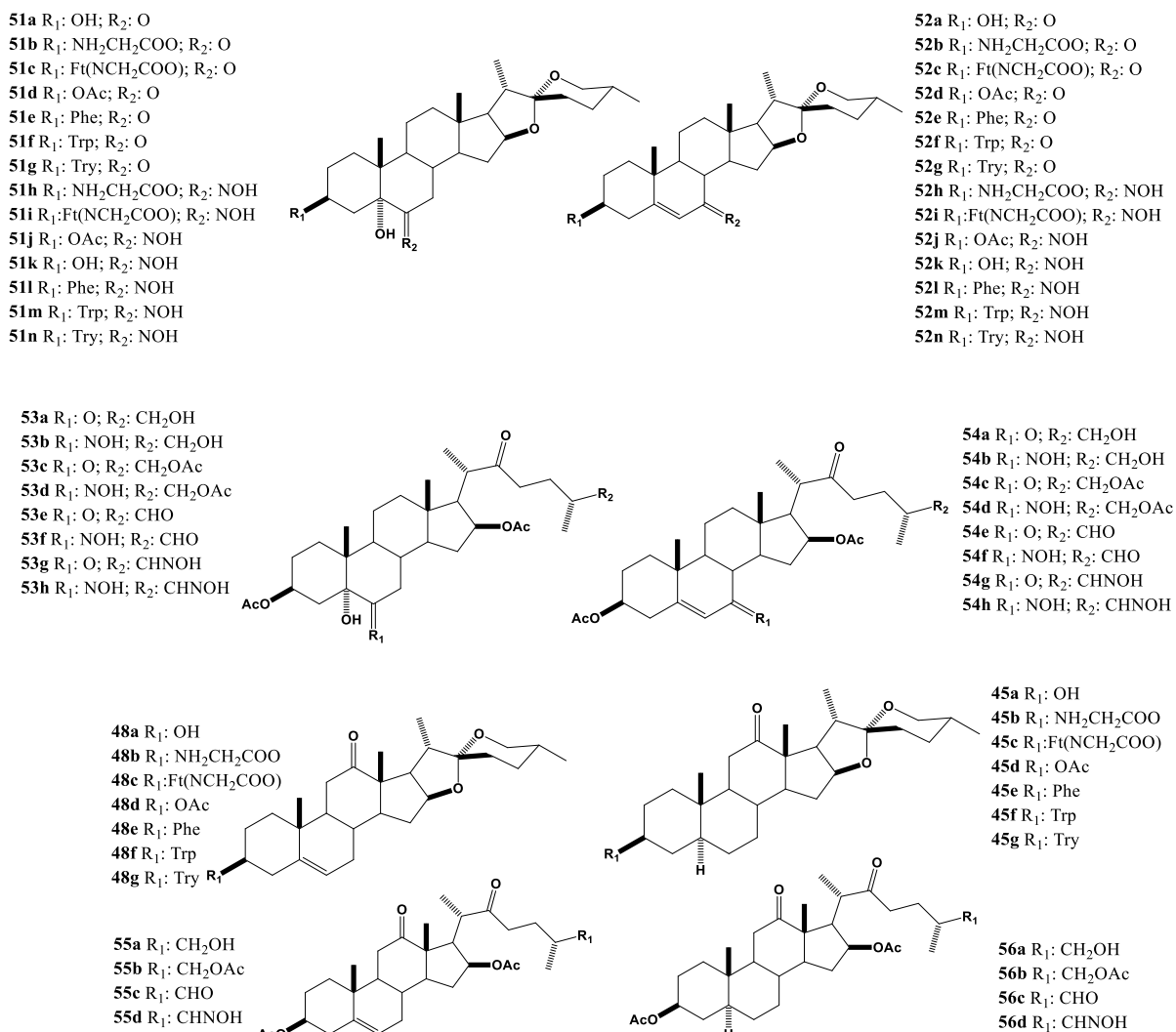


Figura 21. Derivados hidroximínicos y cetónicos de 3 β ,5 α -dihidroxiestirost-6-ona (**51a**), 3 β -hidroxiestirost-5-en-7-ona (**52a**), botogenina (**48a**) y hecogenina (**45a**).

5.2 ESTUDIOS *IN SILICO*

Para llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular *in silico*, se propone la evaluación de 25 derivados de diosgenina y lathosterol con distintos aminoácidos (figura 21), con el fin de analizar los efectos en sus propiedades farmacocinéticas y de afinidad con la CYP17A1. Y a su vez, al ser aminoácidos necesarios para el metabolismo, su posible degradación liberaría al medio el aminoácido, lo que no generaría posibles efectos secundarios ya que estos son inocuos al organismo.

Para cada una de las enzimas, se seleccionaron diferentes cristales (tabla 3) para realizar la validación de los resultados y el análisis de interacción cruzado.

Tabla 3. Cristales seleccionados con sus respectivos PDB-IDs.

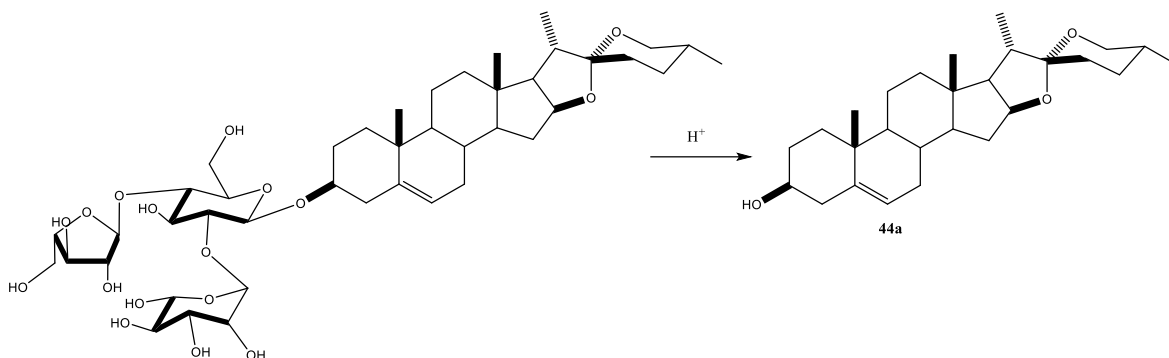
Proteína	Abreviatura	PDB-ID	Referencia
Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol	CYP11A1	3N9Y	[30]
		3N9Z	
		3NA0	
		3NA1	
17 α -hidroxilasa/17, 20-liasa	CYP17A1	6CHI	[24]
		6CIR	
		6CIZ	
		4NKV	[29]
		4NKW	
		4NKX	
		4NKY	
		4NKZ	
Aromatasa	CYP19A1	3EQM	[52]
		5JKV	[54]
21-hidroxilasa	CYP21A2	4Y8W	[44]
		5VBU	[28]
5 α -reductasa	5 α -R	7C83	[124]

5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó una prueba de normalidad, posteriormente un análisis ANOVA con un nivel de significancia $p < 0.05$ con el método de Tukey, mediante el uso del programa *Minitab 18* se realizó un análisis *Anova* para encontrar el efecto y relevancia estadística de diferentes descriptores sobre la EA con cada una de las enzimas analizadas. Una vez realizado este análisis se procedió a realizar una comparación de las EA obtenidas con el ligando natural e inhibidor de referencia para cada una de las enzimas, obteniendo de manera preliminar aquellas moléculas que tuvieran un posible efecto inhibidor. Posteriormente se procedió a un análisis tridimensional para determinar si la molécula analizada se encontraba en el sitio activo, esto al comparar aminoácidos reportados que se encuentran en el sitio activo, así como proximidad con los cofactores.

5.4 SÍNTESIS.

5.4.1 Hidrólisis ácida de dioscina para la obtención de diosgenina.



Esquema 10. Hidrólisis ácida de la dioscina para obtención de la diosgenina (44a).

Utilizando una solución de HCl 2N, durante 2 horas a reflujo y agitación constante, se hidroliza la dioscina (esquema 9) del extracto de *dioscorea composita* para la obtención de la diosgenina (44a).

❖ Diosgenina

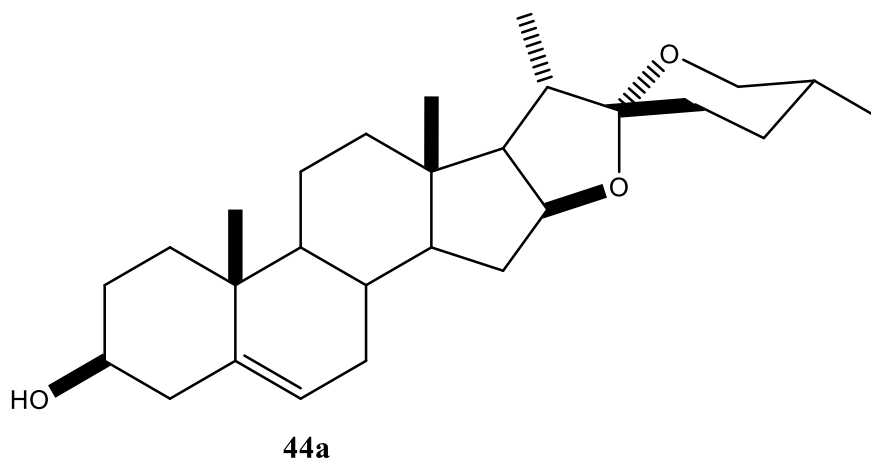


Figura 22. Diosgenina.

Caracterización.

Fórmula molecular: $C_{27}H_{42}O_3$, P.M.: 414.62, Polvo amorfo, p.f. 199-200 °C, $[\alpha]_D = -129^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 1.0$), IR: 3650 cm^{-1} O-H, 2869 cm^{-1} CH₃, 1374 cm^{-1} C-O, $[M+H]^+ = 415.6258$, calc: 414.6206.

RMN ¹H.

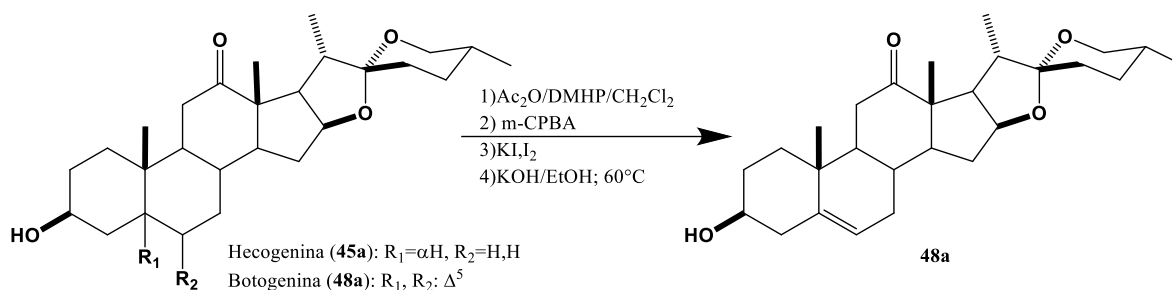
δ : 5.35 (1H, dt, $J_{6-7} = 5.4$, $J_{6-4} = J_{6-8} = 2.0$ Hz, H-6), 4.41 (1H, ddd, $J_{16-15a} = 7.6$ Hz, $J_{16-15e} = 6.4$ Hz, $J_{16-17} = 8.7$, H-16), 3.52 (1H, ma, H-3), 3.48 (1H, m, H-26e), 3.37 (1H, dd, $J_{gem} = J_{26a-}$

$_{25a}=10.8\text{Hz}$, H-26a), 1.02 (3H, s, CH₃-19), 0.97 (3H, d, $J_{21-20}=7.2\text{ Hz}$, CH₃-21), 0.79 (3H, d, $J_{27-25}=6.4\text{ Hz}$, CH₃-27), 0.79 (3H, s, CH₃-18).

RMN ¹³C.

δ : 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 80.8 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27)

5.4.2 Derivatización de botogenina/hecogenina.



Esquema 11. Derivatización de botogenina (48a) a partir de una mezcla de hecogenina (45a) y botogenina (48a).

Partiendo de una mezcla de botogenina y hecogenina, se realizó una derivatización (esquema 10) generando un epóxido a partir del doble enlace de la botogenina entre los carbonos 5 y 6 permitiendo su separación por columna cromatografía por diferencia de polaridad, posteriormente se recupera este doble enlace mediante una hidrólisis básica, obteniendo el acetato de hecogenina (45d), así como la botogenina (48a).

Hecogenina (45a)

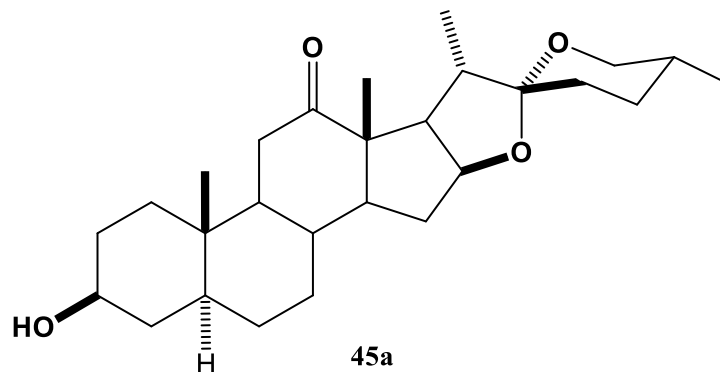


Figura 23. Hecogenina (45a).

Caracterización.

Formula molecular: $C_{27}H_{42}O_4$, P.M.: 430.3083, Polvo blanco, p.f. 266-267°C $[\alpha]_D = +15^\circ$
IR: 3521 (OH), 1701 (CO), $[M+H^+] = 431.3149$

RMN 1H

RMN 1H (500 MHz). δ : 4.36 (ddd, $J = 8.8, 7.5, 6.0$ Hz, 1H, H-16), 3.61 (tt, $J = 11.1, 4.8$ Hz, 1H, H-3), 3.50 (ddd, $J = 10.9, 4.3, 2.2$ Hz, 1H, H-26e), 3.36 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-26a), 2.53 (dd, $J = 8.8, 6.8$ Hz, 1H, H-17), 2.42 (dd, $J = 14.3, 13.2$ Hz, 1H, H-11''), 2.24 (dd, $J = 14.3, 5.0$ Hz, 1H, H-11'), 2.17 – 2.09 (m, 1H, H-23e), 1.92 (qd, $J = 10.9, 3.9$ Hz, 1H, H-20), 1.77 – 1.71 (m, 1H, H-24e), 1.64 (ddt, $J = 9.6, 5.2, 2.1$ Hz, 1H, H-25), 1.62 – 1.54 (m, 2H, CH₂-25), 1.46 – 1.44 (m, 1H, H-23a), 1.38 – 1.36 (m, 1H, H-23a), 1.15 – 1.11 (m, 1H, H-5a), 1.08 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃-21), 1.06 (s, 3H, CH₃-18), 0.92 (s, 3H, CH₃-19), 0.80 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH₃-27).

RMN 13C

RMN ^{13}C (125 MHz). δ : 70.92 (C-3), 55.51 (C-5), 44.63 (C-9), 36.10 (C-10), 37.86 (C-11), 213.67 (C-12), 55.12 (C-13), 79.20 (C-16), 53.49 (C-17), 16.04 (C-18), 11.98 (C-19), 34.35 (C-20), 13.29 (C-21), 109.28 (C-22), 31.14 (C-23), 31.41 (C-24), 30.19 (C-25), 66.89 (C-26), 17.15 (C-27).

Botogenina (48a)

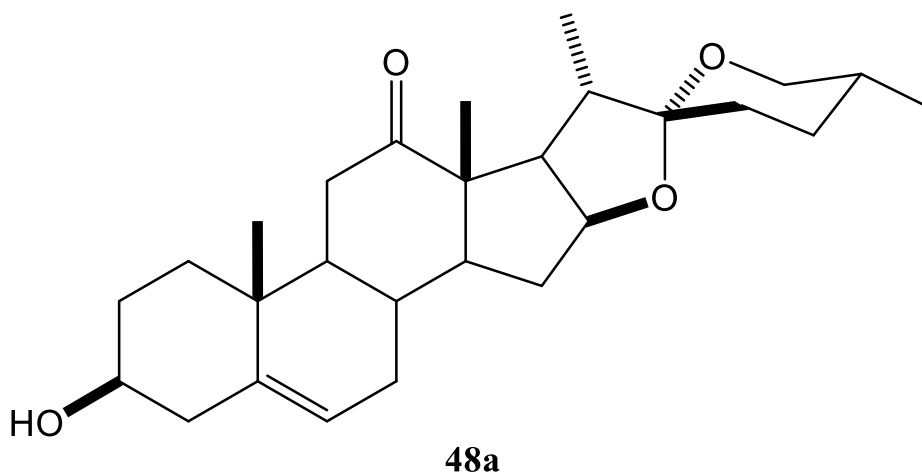


Figura 24. Botogenina (48a).

Caracterización.

Formula molecular: C₂₇H₄₀O₄, P.M.: 429.6, Polvo blanco, p.f. 208-210°C R_f = 0.17 (7:3 Hexano/AcOEt).

RMN ¹H

δ: 5.39 (1H, m, H-6), 4.54 (1H, m, H-3), 4.36 (1H, m, H-16), 3.49 (1H, m, H-26ax), 3.35 (1H, t, J = 10.9 Hz, H-26eq), 2.58 (1H, m, H-20), 2.53 (2H, m, H-17, H-11ax), 1.11 (3H, s, CH₃-19), 1.08 (3H, d, J = 4.7 Hz, CH₃-21), 1.06 (3H, s, CH₃-18), 0.79 (3H, d, J = 6.4 Hz, CH₃-27).

RMN ¹³C

δ: 213.5 35 (C-12), 140.5 (C-5), 121.1 (C-6), 109.2 (C-22), 79.8 (C-16), 71.3 (C-3), 66.8 (C-26), 55.9 (C-14), 54.7 (C-13), 53.2 (C-17), 52.0 (C-9), 42.1 (C-4), 41.9 (C-20), 37.3 (C-11), 37.2 (C10), 36.6 (C-1), 31.5 (C-2), 31.3 (C-15), 31.2 (C-7), 31.2 (C-23), 30.7 (C-8), 30.1 (C-25), 28.7 (C-24), 18.9 (C-19), 17.1 (C-27), 15.8 (C-18), 13.2 (C-21)

Acetato de Hecogenina (45d)

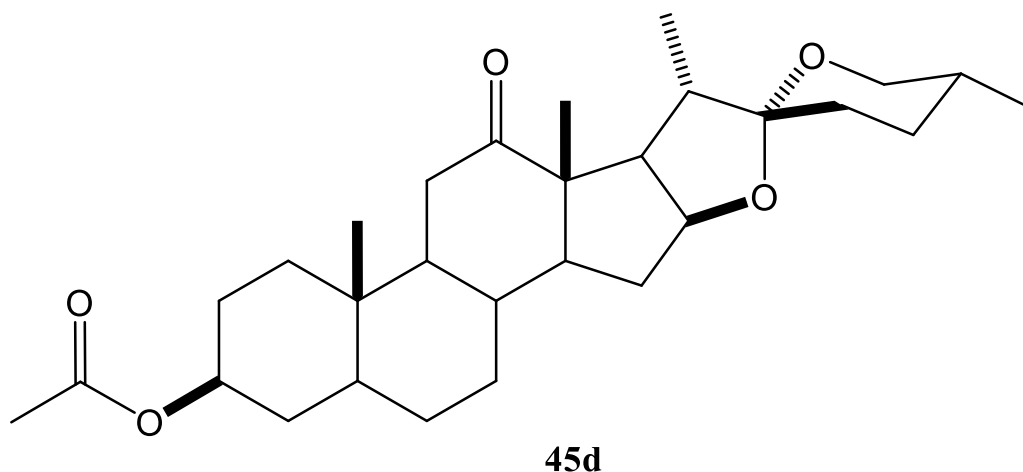


Figura 25. Acetato de hecogenina (45d).

Caracterización.

Fórmula molecular: C₂₉H₄₄O₅, P.M.: 472.66, Polvo amorfo, p.f. 205-207°C, [α]_D = -13.4 ° (CHCl₃, c = 1.0), IR: 2957 (CH), 1727 (AcO), 1223 (C-O), [M+H]=473.3167, calc: 472.3189.

RMN ¹H.

δ: 4.67 (1H, m, H-3), 4.35 (1H, m, H-16), 3.46 (1H, ddd, J_{gem}=10.8, J_{26e-25a}= 4.4 J_{26e-24e}= 2.4 Hz, H-26e), 3.35 (1H, dd, J_{gem}= J_{26a-25a}=10.8Hz, H-26a), 2.51 (1H, m, H-11), 2.01 (3H, s,

CH₃COO₃), 1.02 (3H, s, CH₃-19), 0.97 (3H, d, $J_{21-20} = 7.2$ Hz, CH₃-21), 0.79 (3H, d, $J_{27-25} = 6.4$ Hz, CH₃-27), 0.79 (3H, s, CH₃-18).

RMN ¹³C.

δ: 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 210.9 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 80.8 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27), 170.9 (CH₃COO-3).

Acetato de (25*R*)-5β,6β-epoxi-5β-espirostan-3β-ilo.

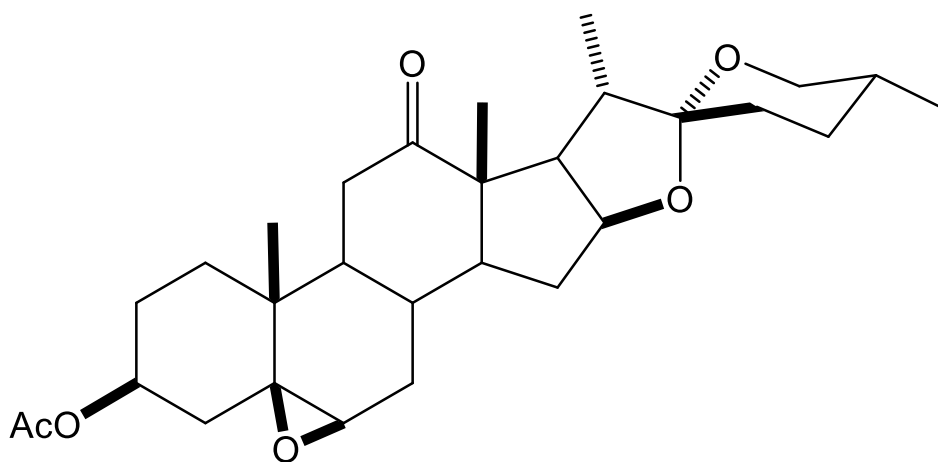


Figura 26. Acetato de (25*R*)-5β,6β-epoxi-5β-espirostan-3β-ilo.

Caracterización.

Fórmula condensada: C₂₉H₄₄O₅, P.M= 472.66, p.f. 194-196°C, rendimiento 85%. $[\alpha]_D = -111.3^\circ$ (CHCl₃, $c = 1.0$) IR: 2947 (CH), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm⁻¹. $[M+H]^+$: 473.3178 calc: 472.3189.

RMN ¹H.

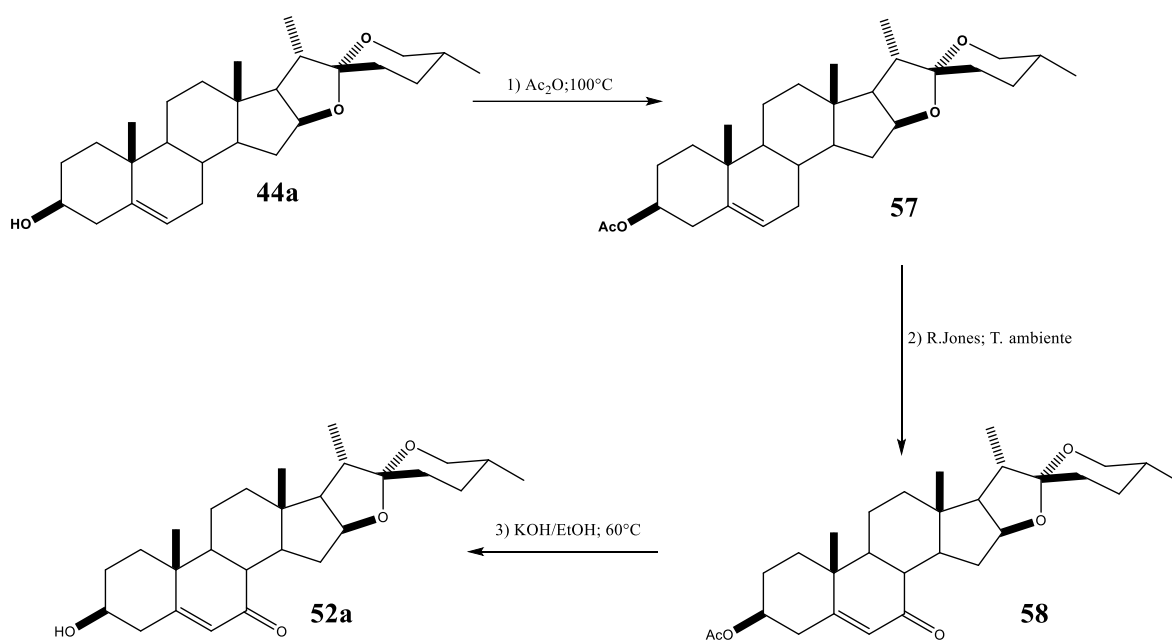
δ (500 MHz): 4.76 (1H, m, H-3), 4.32 (1H, m, H-16), 3.49 (1H, dd, $J_{26e-26a} = 10.9$ Hz, $J_{26e-25} = 5.6$ Hz, H-26e), 3.35 (1H, dd, $J_{26a-26e} = 10.9$ Hz, $J_{26a-25} = 6.5$ Hz, H-26a), 3.09 (1H, m, H-6), 2.04 (3H, s, CH₃CO₂-3), 1.08 (3H, d, $J_{21-20} = 7.1$ Hz, CH₃-21), 0.97 (3H, d, $J_{27-25} = 6.8$ Hz, CH₃-27), 0.88 (3H, s, CH₃-18), 0.82 (3H, s, CH₃-19).

RMN ¹³C.

δ (125 MHz): 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 73.8 (C-3), 42.2 (C-4), 61.5 (C-5), 60.0 (C-6), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14),

31.8 (C15), 80.8 (C-16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27), 170.4 (CH₃COO-3), 21.4 (CH₃COO-3).

5.4.3 Síntesis de la 3β-hidroxiespirost-5-en-7-ona (52a) a partir de diosgenina (44a).



Esquema 12. Síntesis del derivado 3β-hidroxiespirost-5-en-7-ona (52a) a partir de diosgenina (44a) Acetato de diosgenina (57).

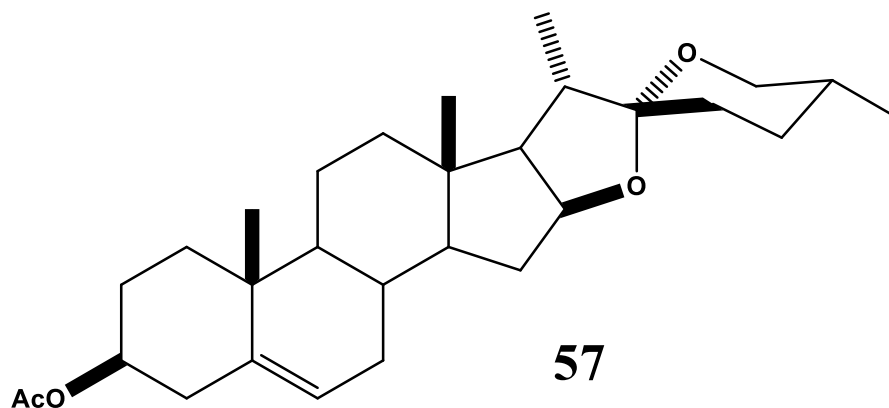


Figura 27. Acetato de diosgenina (57).

Caracterización

Fórmula condensada: $C_{29}H_{44}O_4$, P.M= 456.66, punto de fusión: 194-196 °C, rendimiento 85%. $[\alpha]_D = -122^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 1.0$) IR: 2947 (CH), 1737 (AcO), 1243 (C-O) cm^{-1} , $[M+H] = 457.3238$, calc: 456.3240

RMN 1H

δ (500Hz): 5.37 (1H, d, $J_{6-7} = 5.2$ Hz, H-6), 4.60 (1H, m, H-3), 4.41 (1H, m, H-16), 3.47 (1H, ddd, $J_{gem} = 10.95$ Hz, $J_{26e-25a} = 4.48$ Hz $J_{26e-24e} = 2.06$ Hz, H-26e), 3.37 (1H, dd, $J_{gem} = J_{26a-25a} = 10.8$ Hz, H26a), 2.03 (3H, s, CH_3COO-3), 1.02 (3H, s, CH_3-19), 0.97 (3H, d, $J_{21-20} = 7.2$ Hz, CH_3-21), 0.79 (3H, d, $J_{27-25} = 6.4$ Hz, CH_3-27), 0.79 (3H, s, CH_3-18).

RMN ^{13}C

δ : 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 73.8 (C-3), 42.2 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.7 (C-12), 40.2 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 80.8 (C16), 62.0 (C-17), 16.3 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.7 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27), 170.4 (CH_3COO-3), 21.4 (CH_3COO-3).

Acetato de 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (58).

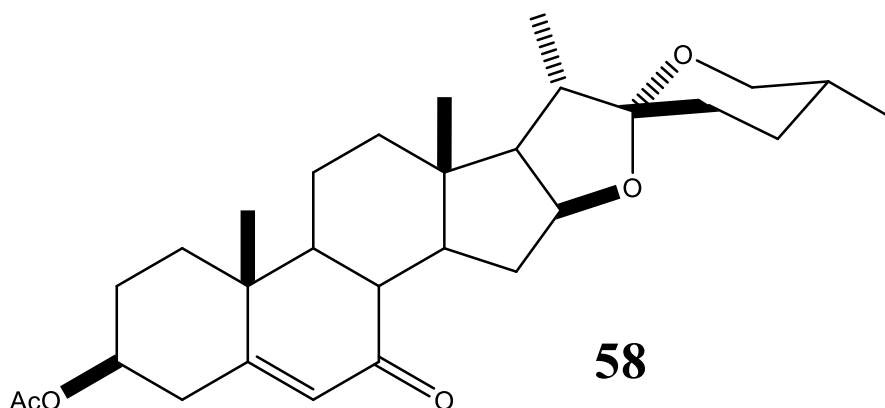


Figura 28. Acetato de 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (58).

Caracterización

Fórmula condensada: $C_{29}H_{42}O_5$, P.M= 470.641, punto de fusión: 278-296 °C.

RMN 1H

δ (500Hz): 5.7 (1H, s, H-6), 4.71 (1H, tt, $J_{gem} = 11.48$ Hz, $J_{3-2} = 4.68$, H-3), 4.48 (1H, m, H-16), 3.47 (1H, dd, $J_{gem} = J_{26a-25a} = 10.9$ Hz, H26e), 3.40 (1H, dd, $J_{gem} = J_{26a-25a} = 10.8$ Hz, H26a), 2.06

(3H, s, CH₃COO-3), 1.2 (3H, s, CH₃-19), 0.98 (3H, d, J_{21-20} = 7.09 Hz, CH₃-21), 0.79 (3H, m, CH₃-27).

RMN ¹³C

δ : 72.1 (C-3), 37.7 (C-4), 164.1 (C-5), 125.8 (C-6), 201.4 (C-7), 49.7 (C-9), 49.4 (C-14), 33.7 (C-15), 80.9 (C-16), 61.0 (C-17), 16.4 (C-18), 17.2 (C-19), 41.5 (C-20), 14.6 (C-21), 109.2 (C-22), 66.7 (C-26), 17.1 (C-27), 170.3 (CH₃C=O-3), 21.3 (CH₃COO-3).

3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (52a)

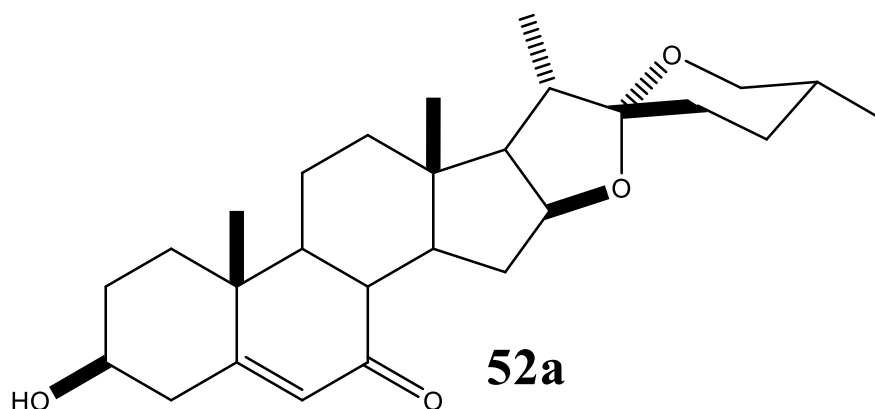


Figura 29. 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (52a).

Caracterización

Fórmula condensada: C₂₇H₄₀O₄, P.M= 428.604, punto de fusión: 185.9 -208 °C.

RMN ¹H

δ (500Hz): 5.62 (1H, s, H-6), 4.40 (1H, m, H-16), 3.60 (1H, tt, J_{gem} =11.27 Hz, J_{3-2} =4.36, H-3), 3.40 (1H, dd, $J_{gem} = J_{26a-25a}$ =10.8Hz, H26e), 3.32 (1H, dd, $J_{gem} = J_{26a-25a}$ =10.8Hz, H26a), 1.1 (3H, s, CH₃-19), 0.91 (3H, d, J_{21-20} = 6.9 Hz, CH₃-21), 0.72 (3H, d, J_{27-25} =3.20 Hz, CH₃-27), 0.72 (3H, s, CH₃-18).

RMN ¹³C

δ : 70.4 (C-3), 165.4 (C-5), 125.8 (C-6), 201.7 (C-7), 49.7 (C-9), 49.4 (C-14), 80.9 (C-16), 61.0 (C-17), 16.4 (C-18), 17.3 (C-19), 14.6 (C-21), 109.2 (C-22), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27).

6 Resultados y discusión

El diseño de nuevos inhibidores y moduladores hormonales es un proceso complejo, para el uso de herramientas bioinformáticas se requieren un proceso actualizable como se observa en el siguiente diagrama, primero se obtuvieron resultados de la validación de los cristales para su posterior uso. Con las estructuras diseñadas y mediante acoplamiento molecular proceder al análisis estadístico de los valores de Energía de acoplamiento, mismo que se realizó en tres etapas. Primero, de manera general se obtuvo la relevancia estadística de modificaciones puntuales en la estructura espiroestánica y 22-oxocolestánica. Posteriormente, se procedió a obtener las modificaciones/origen que aumentaban o disminuían la EA para cada una de las enzimas. Una vez obtenidos estos resultados, se procedió a determinar los compuestos con potencial actividad inhibitoria de acuerdo con su EA en comparación a inhibidores de referencia y los sustratos naturales, de cada potencial actividad inhibitoria mediante un análisis tridimensional se determinó aquellos compuestos con una *verdadera* o *falsa* inhibición si se encontraba dentro o fuera del sitio activo.

6.1 VALIDACIÓN DE CRISTALES UTILIZADOS

Para la selección de cristales se realizó una revisión bibliográfica de las estructuras cristalizadas publicadas en la base de datos *PDB-BANK*, donde se encontraron estructuras con diferentes co-cristales (tabla 4). Como primer criterio de selección se tomó en cuenta el intervalo de resolución de 2-3 Å, excepto en la CYP21A2 donde solo se encontraron 2 cristales, en este caso a pesar de no cumplir con este rango se tomó en cuenta este cristal para su análisis, en cristales que contaran con mutaciones se determinó que estas no se encuentran dentro del sitio activo.

Tabla 4. Cristales analizados para la validación.

Enzima	PDB-ID	Mutaciones	Resolución (Å)	Co-cristal
CYP11A1	3N9Y	No	2.10	Colesterol
	3N9Z	No	2.17	22R-Hidroxicolesterol
	3NA0	No	2.5	(20R,22R)-20,22-dihidroxicolesterol

	3NA1	No	2.25	20S-hidroxicolesterol
CYP17A1	6CHI	No	2.70	Amida-abiraterona
	6CIR	No	2.65	Oxima-abiraterona
	6CIZ	No	2.60	Nitrilo-abiraterona
	4NKY	Si	2.55	17 α -hidroxiprogesterona
	4NKV	Si	2.65	Abiraterona
	4NKZ	Si	3.00	17 α -hidroxiprogesterona
	4NKW	Si	2.50	Pregnenolona
	4NKX	Si	2.79	Progesterona
17 β -HSD	1XF0	No	2.00	4-androstene-3,17-diona
	6CGC	No	2.10	2-metoxi-16 β -(m-carbamoilbenzil)-E2
	6CGE	No	2.20	PBRM
5 α -reductasa	7C83	No	2.00	NADPH
CYP21A2	4Y8W	No	2.64	Progesterona
	5VBU	No	3.31	(9 β)-17-hidroxipregn-4-en-3,20-diona
11 β -HSD	5PGU	Si	2.35	2-[2-(4-fluorofenil)-2-adamantil]-1-(3-metoxiazetidin-1-il)etanona
	5PGV	Si	2.35	1-(3-Hidroxiacetidin-1-il)-2-[(2S,5R)-2-(4-fluorofenil)-5-metoxiadamantan-2-il]etan-1-ona
	5PGW	Si	2.37	2-[(1R,3S,5R,7S)-2-[4-(4-fluorofenil) fenil]-6-hidroxiadamantan-2-il]-1-(3-hidroxiacetidin-1-il) etan-1-ona
	5PGX	Si	2.50	2-(2-benzil-6-hidroxiadamantan-2-il) -1-(3-hidroxiacetidin-1-il)etan-1-ona
	5PGY	Si	2.07	2-[(5R,7S) -6-hidroxi-2-feniladamantan-2-il]-1-(3-hidroxiacetidin-1-il)etan-1-ona
CYP19A1	3EQM	No	2.90	4-androsten-3,17-diona
	5JKV	No	2.75	

Posteriormente se procedió a realizar un estudio de acoplamiento cruzado (excepto para la 5 α -reductasa por contar con 1 cristal), con el fin de estudiar la repetibilidad del acoplamiento, seleccionando aquellos cristales que tuvieran una mayor congruencia de actividad biológica al comparar estos resultados con lo reportado en la bibliografía (EA de inhibidores competitivos \geq sustratos de la enzima), así como aquellos cristales que no presentaran una mayor afinidad por su co-cristal, ya que esto indica una poca libertad de movimiento en el sitio activo de la enzima, lo cual puede llegar a afectar los resultados obtenidos.

Una vez seleccionados los cristales, se procedió a realizar los análisis de acoplamiento molecular de cada una de las enzimas con los derivados cetónicos e hidroximínicos y comparando su EA obtenida con inhibidores de referencia, así como los sustratos para cada una de ellas (construidos *de novo*), determinando como compuestos con posible actividad inhibitoria aquellos que tuvieran una mayor o igual EA que los sustratos, así como los inhibidores de referencia.

6.1.1 CYP11A1

Una vez realizado un análisis cruzado de interacción (tabla 5) se compararon las EA de los co-cristales con los diferentes cristales de la CYP11A1. Para esta enzima, debido a la pequeña variación entre los resultados del docking molecular para cada uno de los cristales, cualquiera de los 4 puede ser utilizado para los estudios *in silico*, seleccionando 3N9Z para posteriores análisis de acoplamiento molecular, se tomó como referencia la aminoglutetimida como inhibidor de este enzima. [125]

Tabla 5. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus respectivas proteínas cristalizadas (color amarillo).

Co-cristal/PDB-ID	3N9Y	3N9Z	3NA0	3NA1
Colesterol	-11.5	-11.2	-11.7	-11.5
22R-hidroxicolesterol	-11.2	-11.4	-11.5	-11.8
Dihidroxicolesterol	-11.7	-11.5	-11.9	-11.6
20S-hidroxicolesterol	-11.6	-11.4	-12.0	-11.7
Aminoglutetimida	-8.7	-8.6	-8.3	-8.1

6.1.2 CYP17A1

Se analizaron 8 cristales de 2 diferentes líneas con sus respectivos co-cristales, como criterio de descarte se tomó en cuenta lo reportado en la bibliografía, aquellos cristales donde la abiraterona y sus derivados tuvieran una mayor EA que los sustratos naturales de la enzima, así como los productos al presentar una inhibición competitiva hacia esta enzima. [24] Como se observa en la tabla 6, bajo este criterio los cristales que pueden ser tomados para posteriores análisis *in silico* son aquellos con PDB-ID: 4NKV, 6CHI, 6CIR, y 6CIZ. De estos 4 cristales, 6CIR y 6CIZ fueron descartadas ya que presentaron las mejores EAs con sus respectivos co-cristales, lo cual podría indicar una falta de flexibilidad por parte del sitio activo, por lo que los cristales 4NKV y 6CHI fueron seleccionados.

Tabla 6. Energías de acoplamiento (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus respectivas proteínas cristalizadas (color amarillo).

Co-cristal/PDB-ID	4NKV	4NKX	4NKY	4NKZ	6CHI	6CIR	6CIZ	4NKW
Abiraterona	-13.3	-10.2	-12.1	-11.1	-12.2	-12.5	-12.4	-11.5
Progesterona	-11.7	-12.2	-12.5	-11.4	-11.2	-11.1	-11.2	-11.9
17 α -hidroxiprogesterona	-12.0	-12.1	-12.8	-11.5	-11.4	-11.4	-11.5	-12.5
17 α -hidroxipregnenolona	-11.4	-11.8	-12.4	-11.3	-11.1	-11.1	-11.0	-11.5
Amida-abiraterona	-13.4	-9.7	-10.5	-9.8	-12.8	-12.5	-13.1	-10.7
Oxima-abiraterona	-12.3	-11.3	-13.1	-11.5	-13.3	-13.1	-13.4	-11.6
Nitrilo-abiraterona	-13.3	-10.4	-10.8	-9.5	-12.7	-12.2	-13.7	-11.0
Pregnenolona	-11.5	-11.9	-12.5	-11.6	-11.0	-11.0	-11.2	-12.3

6.1.3 17 β -HSD

De los 3 cristales (tabla 7), 6CGE fue descartado por presentar un mayor acoplamiento por el androstenediol y testosterona (productos) que por la androstenediona (sustratos). 1XF0 y 6CGC pueden ser utilizados ya que presentan el comportamiento del inhibidor competitivo PBRM reportado en la literatura, al presentar una EA mayor al sustrato (androstenediona) y a los productos (androstenediol y testosterona), de estos 2 cristales se seleccionó 6CGC para posteriores análisis. [126]

Tabla 7. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con las proteínas cristalizadas.

Co-cristal/PDB-ID	1XF0	6CGC	6CGE
Androstenediol	-10.9	8.8	9.8
Androstenediona	-11.5	-9.3	-8.8
PBRM	-14.2	-10.7	-11.5
Testosterona	-11.0	-9.0	-9.2

6.1.4 5 α -reductasa

Para el caso de esta enzima se encontraron 2 cristales (PDB-ID: 7C83 y 7BW1), para la validación solo se tomó en cuenta 7C83 ya que es el único que se encuentra cristalizado con el cofactor de esta enzima NADP. Para la validación de dicho cristal se comparó la EA de su sustrato (testosterona) y un inhibidor de referencia competitivo (finasterida). El realizar el análisis de acoplamiento sin el cofactor incrementa la EA al presentar un mayor espacio donde puede haber una interacción molécula/enzima, por otro lado, al contar con la presencia de este cofactor la EA de la testosterona y finasterida fue la misma, lo cual es congruente con lo reportado en la bibliografía al ser la finasterida un inhibidor competitivo. [127]

Tabla 8. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus respectivas proteínas cristalizadas.

Co-cristal	C/NADPH	S/NADPH
Finasterida	-7.3	-7.5
Testosterona	-7.3	-7.9

6.1.5 CYP21A2

Al realizar la investigación bibliográfica solo se encontraron 2 cristales (PDB-ID: 4Y8W y 5VBU). Se comparó la EA de la abiraterona/oxima de abiraterona los cuales aumentan la producción de corticosteroides al interaccionar con esta enzima, ambos cristales presentaron el mismo patrón de afinidad con pequeñas variaciones en las EA, donde la abiraterona y oxima-abiraterona tuvieron una menor EA que los sustratos de estas enzimas (tabla 9), lo cual corresponde a lo reportado en la bibliografía, por lo que ambos pueden ser utilizados para posteriores análisis *in silico*, seleccionando 4Y8W. [24]

Tabla 9. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus respectivas proteínas cristalizadas.

Co-cristal	PDB-ID	Afinidad
Abiraterona	4Y8W	-10.4
	5VBU	-10.5
Oxima-abiraterona	4Y8W	-10.4
	5VBU	-10.0
Progesterona	4Y8W	-12.4
	5VBU	-12.3
17 α -hidroxiprogesterona	4Y8W	-12.7
	5VBU	-12.8

6.1.6 11 β -HSD

De 5 cristales analizados, 5PGU fue descartado por tener una mayor afinidad por uno de los productos de esta enzima (corticosterona) por sobre el sustrato (deoxicorticosterona) y el inhibidor competitivo de referencia, 5PGX y 5PGW fueron descartados por tener mayor afinidad por el producto que por el sustrato. Por lo que 5PGV, 5PGX y 5PGY son viables para posteriores análisis, seleccionando 5PGY. [128]

Tabla 10. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus respectivas proteínas cristalizadas.

Co-cristal/PDB-ID	5PGU	5PGV	5PGW	5PGX	5PGY
Corticosterona	-10.4	-9.3	-9.1	-10.0	-10.2
Cortisol	-9.6	-9.6	-10.3	-9.9	-10.0
Deoxicorticosterona	-10.2	-9.7	-10.2	-10.2	-10.4
1-(3-Hidroxiazetidín-1-il)-2-[(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-(4-fluorofenil)-5-metoxiadamantan-2-il]etan-1-ona	-10.3	-11.1	-11.0	-10.7	-11.1

6.1.7 CYP19A1

Como se observa en la tabla 11, los 2 cristales analizados presentaron los mismos resultados entre sí para los 2 sustratos (testosterona y androstenediona) y para el inhibidor competitivo de referencia (exemestano), por lo que ambos cristales pueden ser utilizados para posteriores análisis *in silico*, seleccionando 3EQM. [129]

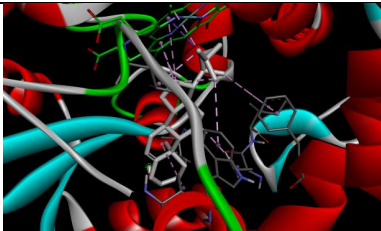
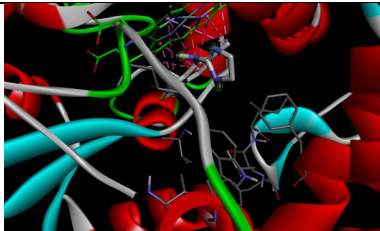
Tabla 11. Energías de afinidad (kcal/mol) tabuladas de los co-cristales con sus los diferentes cristales.

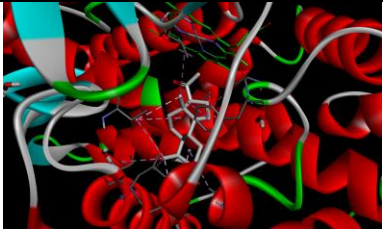
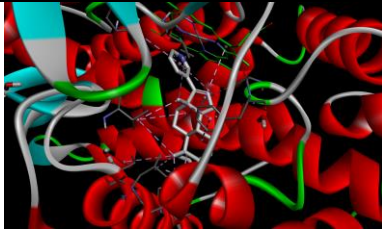
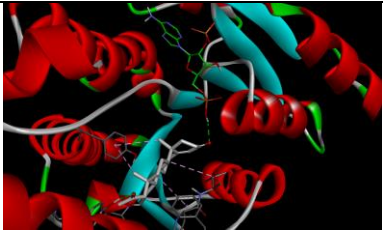
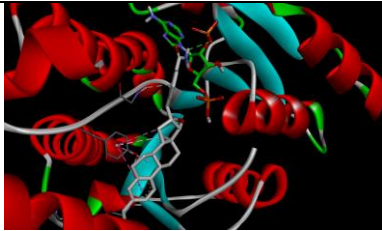
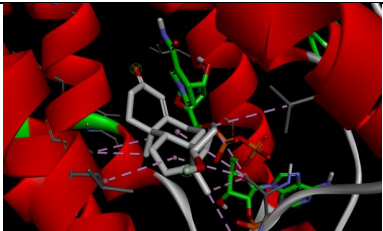
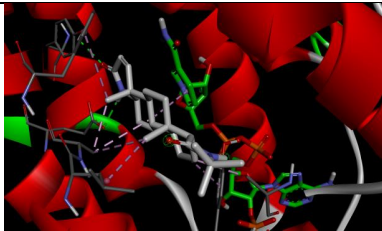
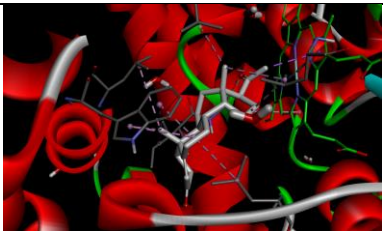
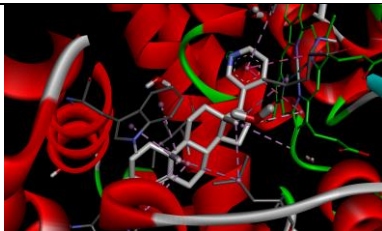
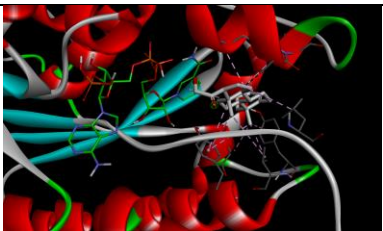
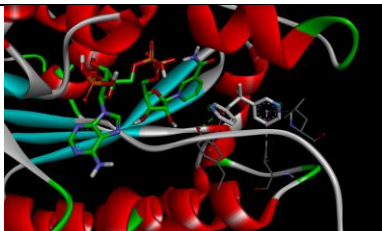
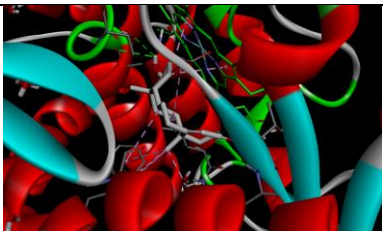
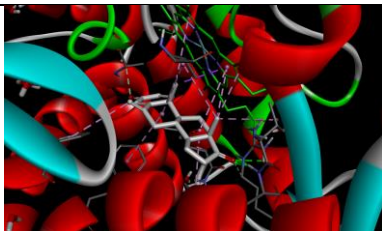
Co-cristales	PDB-ID	Afinidad
Androstenediona	3EQM	-14.0
	5JKV	-14.0
Exemestano	3EQM	-14.2
	5JKV	-14.2
Testosterona	3EQM	-13.0
	5JKV	-13.0

6.1.8 Enzimas validadas *in silico*

Una vez seleccionado cada uno de los cristales, se procedió a realizar *docking molecular* de estas enzimas con su sustrato e inhibidores de referencia contruidos *de novo*, una vez obtenidos se comprobó mediante análisis de interacción 3D que ambos se encontrarán en el sitio activo como se observa en la tabla 12, tomando como referencia los cofactores de cada una de las enzimas, un grupo hemo para las CYPs y NADPH para las demás, validando los posteriores análisis *in silico* utilizando estos cristales.

Tabla 12. Cristales seleccionados para cada una de las enzimas analizadas con sus respectivas imágenes de interacción 3D con su sustrato e inhibidor utilizando *Discovery Studio 2021*.

Enzima	PDB-ID	Sustrato	Inhibidor
CYP11A1	3N9Z		

CYP17A1	6CHI		
17 β -HSD	6CGC		
5 α -reductasa	7C83		
CYP21A2	4Y8W		
11 β -HSD	5PGY		
CYP19A1	3EQM		

6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS MOLÉCULAS DISEÑADAS

Cómo primera aproximación se realizó una prueba para conocer si los datos presentaban una distribución normalidad, una vez confirmada esta distribución, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor ($p < 0.05$), así como la prueba de diferencia menos significativa de Fisher (LSD-Fisher). Para los derivados esteroídicos (tabla 13) se observó que en 2 casos solamente 1 descriptor resultó relevante para la EA de dicha proteína (C6 para CYP11A1 y C12 para CYP19A1). Para 17 β -HSD el origen y C5 tuvo un efecto directo sobre esta. Esto indica que modificaciones puntuales en estos carbonos de la estructura esteroídica podría ser utilizadas para generar una interacción específica, lo cual resulta especialmente útil en la búsqueda de inhibidores. La molécula de origen (diosgenina, botogenina, hecogenina, etc) no tuvo un efecto para las enzimas CYP11A1 y 11 β -HSD. Mientras que modificaciones en el carbono 5 solo tuvieron efecto para la CYP17A1, 17 β -HSD y 5 α -reductasa. Por otro lado, los grupos funcionales del carbono 7 no presentaron efecto sobre ninguna de las enzimas analizadas, lo que denota que modificaciones sobre este carbono no tienen efecto sobre la EA con las enzimas analizadas.

Tabla 13. Efecto de la molécula de origen y grupos funcionales en diferentes carbonos de la estructura esteroídica, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Efecto/proteína	CYP11A1	CYP17A1	17 β -HSD	5 α -reductasa	CYP21A2	11 β -HSD	CYP19A1
Origen	No	Si	Si	Si	Si	No	Si
C5	No	Si	Si	Si	No	No	No
C6	Si	No	No	No	No	No	No
C7	No	No	No	No	No	No	No
C12	No	No	No	No	No	No	Si

Para el caso de los derivados 22-oxoesteroídicos (tabla 14) se encontró que la molécula de origen tuvo efecto sobre todas las enzimas, modificaciones en C6 presentaron efecto sobre todas las enzimas excepto sobre 17 β -HSD y CYP11A1; en C7 no tuvieron un efecto

significativo para CYP11A1, 5 α -reductasa y CYP19A1; en C5 tuvo un efecto sobre la 17 β -HSD, 5 α -reductasa y CYP19A1, por último, C12 tuvo efecto solamente en CYP11A1 y C22 con 11 β -HSD. Estos resultados pueden ser utilizados para el diseño dirigido de moduladores de la esteroidogénesis, descartando aquellas modificaciones puntuales en carbonos donde no se presente un efecto para la enzima que se desea inhibir.

Tabla 14. Efecto de la molécula de origen y grupos funcionales en diferentes carbonos de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova post LSD-Fisher.

Efecto/proteína	CYP11A1	CYP17A1	17 β -HSD	5 α -reductasa	CYP21A2	11 β -HSD	CYP19A1
Origen	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
C5	No	No	Si	Si	No	No	Si
C6	No	Si	No	Si	Si	Si	Si
C7	No	Si	Si	No	Si	Si	No
C12	Si	No	No	No	No	No	No
C22	No	No	No	No	No	Si	No
C26	No	No	Si	Si	No	No	No

Posteriormente se analizó el efecto que tiene la presencia o ausencia de la oxima sobre la EA de las diferentes enzimas, encontrando que en estructuras espiroestánicas la presencia o ausencia de un grupo hidroximínico no tienen efecto alguno. En estructuras 22-oxocolestánicas la presencia de un grupo hidroximínico solo tuvo efecto con la enzima CYP19A1, estos resultados se encuentran analizados a mayor profundidad en las siguientes secciones, al observar el efecto directo de interacción compuesto-enzima, mediante diagramas de interacción 2D y 3D. Con base en los resultados anteriores se descartaron los derivados hidroximínicos al no tener un efecto significativo sobre la EA para las enzimas analizadas.

Una vez obtenido estos resultados globales, se procedió a realizar un análisis estadístico del efecto que tienen los grupos funcionales tabulados en las diferentes posiciones para cada una

de las enzimas, esto nos va a permitir determinar qué grupo funcional favorece la interacción con las diferentes enzimas aumentando la EA o por el contrario disminuyéndola, esto puede resultar especialmente útil para el diseño de moduladores de la esteroidogénesis.

6.2.1 CYP11A1

Para los derivados 22-oxocolestánicos (tabla 15), partiendo como molécula de origen de la laxogenina presento una mayor EA, así como αOH o αH en C5, cetona en C6 e hidroximínicos o H en C7, modificaciones en C12 y C22 no tuvieron efecto mientras que para C26 el presentar una oxima tuvo una mayor EA, mientras que la cetona presento un menor valor.

Tabla 15. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor	Diferencia estadística	Mayor EA		Menor EA
		Laxogenina, 3 β ,5 α -dihidroxiestirost-6-ona	3 β ,5 α -dihidroxiestirost-6-ona, hecogenina, 3 β -hidroxiestirost-5-en-7-ona	
Origen	Si	Laxogenina, 3 β ,5 α -dihidroxiestirost-6-ona	3 β ,5 α -dihidroxiestirost-6-ona, hecogenina, 3 β -hidroxiestirost-5-en-7-ona	Hecogenina, 3 β -hidroxiestirost-5-en-7-ona, botogenina y diosgenina
C5	Si	$\alpha\text{OH}, \alpha\text{H}$		Δ^5
C6	Si	O		Δ^5, H
C7	Si	NOH, H		O
C12	No	-		
C22	No	-		
C26	Si	NOH, OAc, O	OAc, O, CHO	O, OH, CHO

Para los derivados estirostánicos solo modificaciones en C7 presentaron un efecto sobre la EA, donde la cetona aumento su valor y la oxima presentó el menor valor.

6.2.2 CYP17A1

Para los derivados 22-oxocolestánicos (tabla 16), solo modificaciones en C6 tuvieron un efecto directo sobre la EA, aumentando al presentar un hidrógeno y disminuyendo al presentar un doble enlace o hidroximínio.

Tabla 16. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor	Diferencia estadística	Mayor EA	Menor EA
Origen	No	-	
C5	No	-	
C6	Si	H, Δ^5 , O	Δ^5 , O, NOH
C7	No	-	
C12	No	-	

Para los derivados espirostánicos como se observa en la tabla 17, los descriptores (grupos funcionales) que presentaron un efecto sobre la EA fueron el origen y modificaciones en C12, donde el partir de la hecogenina y botogenina presentó una mayor afinidad, cabe resaltar que ambas presentan una cetona en C12, lo cual es congruente con el grupo funcional que presentó una mayor EA y por lo tanto una mayor afinidad para esta enzima.

Tabla 17. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura espirostánica, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor	Diferencia estadística	Mayor EA	Menor EA
Origen	Si	Hecogenina, botogenina, 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona, laxogenina	3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona, laxogenina, 3 β ,5 α -dihidroxiespirost-6-ona. Diosgenina
C5	No	-	

C6	No	-	
C7	No	-	
C12	Si	O	H
C22	No	-	
C26	No	-	

6.2.3 17 β -HSD

Para derivados 22-oxocolestáneos (tabla 18) el partir como molécula de origen, la laxogenina, así como presentar en C5 en posición α un hidrógeno o hidroxilo, así como una cetona o doble enlace en C6 aumento la EA. Modificaciones en las posiciones 7, 12, 22 y 26 no tuvieron un efecto sobre la EA.

Tabla 18. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor	Diferencia estadística	Mayor EA	Menor EA
Origen	Si	Laxogenina	Botogenina, 3 β ,5 α -dihidroxiestirost-6-ona, hecogenina, 3 β -hidroxiespirot-5-en-7-ona Diosgenina
C5	Si	α H, α OH	α OH, Δ^5
C6	Si	O, Δ^5	H
C7	No	-	
C12	No	-	
C22	No	-	
C26	No	-	

Para espirostanos el partir de botogenina, así como tener una cetona en la posición 12 aumento la EA para esta enzima (tabla 19), por otro lado, el partir de la diosgenina y tener hidrógenos en la posición 12 disminuyó su afinidad por la enzima.

Tabla 19. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura espirostanica, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor		Diferencia estadística		Mayor EA	Menor EA
Origen	Si	Botogenina, hecogenina, laxogenina, 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona, 3 β ,5 α -dihidroxiespirost-6-ona.		Diosgenina, hecogenina, laxogenina, 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona, 3 β ,5 α -dihidroxiespirost-6-ona.	
C5	No	-			
C6	No	-			
C7	No	-			
C12	Si	O		H	

6.2.4 5 α -reductasa

En el caso de los 22-oxocolestános el partir de la laxogenina, así como un hidrógeno en posición α en 5, una cetona en 6 y 27 presento una mayor EA, y un menor valor cuando se parte de la diosgenina, con un doble enlace en 5 y un hidrógeno en 6, así como una acetilación en 26 (tabla 20).

Tabla 20. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor		Diferencia estadística		Mayor EA	Menor EA
Origen	Si	Laxogenina	Hecogenina, 3 β ,5 α -dihidroxiespiro	Botogenina	Diosgenina

			st-6-ona, 3 β - hidroxiespirost -5-en-7-ona		
C5	Si	αH		α OH	Δ
C6	Si	O		Δ	H
C7	No	-			
C12	No	-			
C22	No	-			
C26	Si	CHO	O	OH, NOH	OAc

Para los esteroideos (tabla 21) el partir de la diosgenina, así como un hidroxilo en C5 presentó una mayor EA mientras que un hidrógeno en posición α y partir de la laxogenina disminuyó este valor. Modificaciones en las posiciones 6, 7 y 12 no tuvieron un efecto significativo.

Tabla 21. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura esteroidea, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor	Diferencia estadística	Mayor EA	Menor EA
Origen	Si	Diosgenina, 3β,5α- dihidroxiespirost-6- ona.	Laxogenina
C5	Si	αOH,	Δ
C6	No	-	
C7	No	-	
C12	No	-	

6.2.5 CYP21A2

Para 22-oxocolestános (tabla 22) el partir del derivado 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona, así como tener una cetona o doble enlace en las posiciones 6 y una cetona en 7 aumento la EA con esta enzima. Mientras que el partir de hecogenina, así como un doble enlace en el carbono 5 e hidrógenos en 6 y 7 disminuyo la EA. Modificaciones en los carbonos 12, 22 y 26 no tuvieron un efecto significativo sobre la afinidad con la CYP21A2..

Tabla 22. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor	Diferencia estadística	Mayor EA	Menor EA
Origen	Si	3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona, laxogenina, hecogenina	Hecogenina, 3 β ,5 α -dihidroxiespirost-6-ona.
C5	No	α OH, α H	Δ^5
C6	Si	O, Δ^{5-6}	H
C7	Si	O, NOH	H , NOH
C12	No	-	-
C22	No	-	-
C26	No	-	-

Para espirostános como se observa en la tabla 23 el partir de hecogenina, así como tener un hidrógeno en posición α 5 presento una mayor EA. Modificaciones en los carbonos 6, 7 y 12 no tuvo un efecto significativo.

Tabla 23. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura esteroide, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor	Diferencia estadística	Mayor EA	Menor EA
Origen	Si	Hecogenina, 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona, laxogenina, botogenina, diosgenina	3 β ,5 α -dihidroxiespirost-6-ona, 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona, laxogenina, Botogenina, Diosgenina
C5	Si	α H, Δ^5	Δ^5 , α OH
C6	No	-	-
C7	No	-	-
C12	No	-	-

6.2.6 11 β -HSD

Para 22-oxocolestános (tabla 24) el partir del derivado 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona, así como presentar una cetona o doble enlace en la posición 6, así como NOH en 7 o NOH en 22 tuvo una mayor EA. Modificaciones en los carbonos 5, 12 y 26 no tuvieron efecto significativo.

Tabla 24. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor	Diferencia estadística	Mayor EA	Menor EA
Origen	3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona, 3 β ,5 α -dihidroxiespirost-6-ona, laxogenina	3 β ,5 α -dihidroxiespirost-6-ona, laxogenina, hecogenina	Laxogenina, hecogenina, botogenina Diosgenina

C5	-	
C6	O, Δ^5	H
C7	NOH	O, H
C12	-	
C22	NOH, OAc	O, OAc
C26	-	

De las modificaciones tabuladas para derivados espirostánicos ningún descriptor tuvo un efecto significativo sobre la EA.

6.2.7 CYP19A1

Para derivados 22-oxocolestánicos el partir como molécula base de la laxogenina presento una mayor EA, y un menor valor para la $3\beta,5\alpha$ -dihidroxiestero-6-ona, sin embargo, solo modificaciones en el carbono 5 tuvieron un efecto significativo, donde el tener un hidrógeno en posición α presentó la mayor afinidad (tabla 25). Modificaciones en las posiciones 6, 7 y 12 no tuvieron un efecto significativo.

Tabla 25. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura 22-oxocolestánico, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor	Diferencia estadística	Mayor EA	Menor EA
Origen	Si	Laxogenina , botogenina, hecogenina, 3β -hidroxiestero-5-en-7-ona, diosgenina	$3\beta,5\alpha$-dihidroxiestero-6-ona , botogenina, hecogenina, 3β -hidroxiestero-5-en-7-ona, diosgenina
C5	Si	$\alpha\text{H}, \Delta^5$	$\alpha\text{OH}, \Delta^5$
C6	No	-	
C7	No	-	
C12	No	-	

Para derivados espirostánicos (tabla 26) partir de hecogenina, 3 β ,5 α -dihidroxiestero-6-ona o laxogenina, así como tener un hidrógeno en posición α en el carbono 5, hidroximínimo en 7 y 26 tuvo una mayor EA. Mientras que el partir de la botogenina como molécula de origen, así como tener un doble enlace en el carbono 5, hidroxilo, hidrógeno o cetona en 7 y cetona/hidroxilo en 27 disminuyen la EA con esta enzima. Modificaciones en las posiciones 6, 12 y 22 no tuvieron efecto directo sobre la EA.

Tabla 26. Efecto de la molécula de origen y adición de grupos funcionales en diferentes posiciones de la estructura espirostánica, $p < 0.05$ Anova LSD-Fisher.

Descriptor	Diferencia estadística	Mayor EA		Menor EA
Origen	Si	Hecogenina, 3β,5α-dihidroxiestero-6-ona, laxogenina, 3β-hidroxiestero-5-en-7-ona, diosgenina		Botogenina, diosgenina, 3β-hidroxiestero-5-en-7-ona
C5	Si	αH, aOH		αOH, Δ^5
C6	No	-		
C7	Si	NOH, H		O, H
C12	No	-		
C22	No	-		
C26	Si	NOH, O, OAc	OAc, OH	CHO, OH

6.3 RESULTADOS *IN SILICO* DE INHIBIDORES ESTEROIDALES

El análisis estadístico nos permitió subdividir el total de moléculas en grupos de importancia para el estudio, y diseño selectivo, el primero es el esteroide materia prima para el subgrupo y si es 22-oxocolestano o espirostános, así como determinar si existen falsos positivos dado que una buena energía de acoplamiento no es completamente discriminante, dado que puede estar acoplado en un sitio secundario.

6.3.1 Derivados de diosgenina

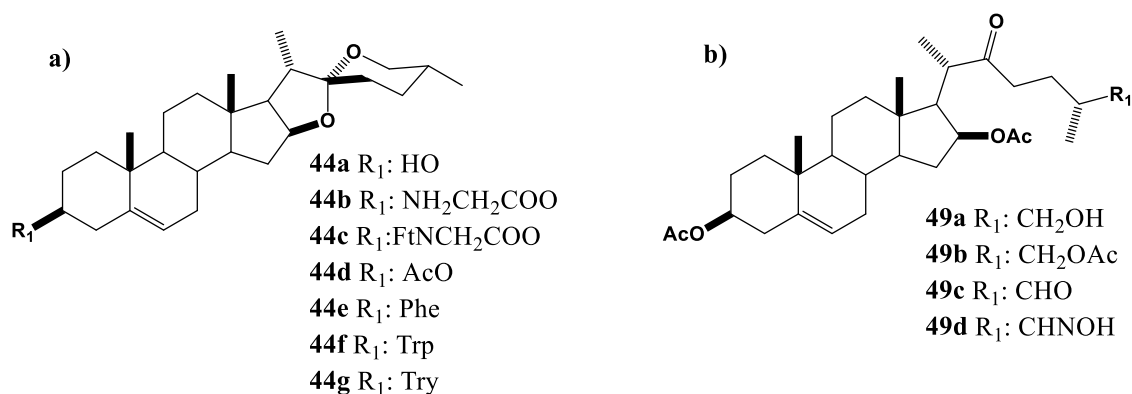


Figura 30. Derivados; a) espirostánicos; b) 22-oxocolestánicos.

Para la selección de compuestos como posibles inhibidores se tomaron como referencia inhibidores y ligandos naturales, donde aquellos compuestos que presentaron una menor EA que los ligandos naturales fueron considerados como compuestos candidatos a inhibidores. Posteriormente, se determinó si dicha inhibición era verdadera o falsa (dentro o fuera del sitio activo), para esto se realizó un análisis tridimensional mediante el software *DiscoveryStudio 2021* determinando la posición e interacción del compuesto con la enzima. Como se observa en la figura 31, en el caso de la CYP11A1 se observa que el inhibidor de referencia (finasterida) así como el sustrato (colesterol) y una de las moléculas con posible actividad inhibitoria (**44a**), se encuentran en el sitio activo y tienen interacción con el grupo hemo de esta enzima, cabe resaltar que los inhibidores fueron elegidos al ser inhibidores competitivos y mediante una investigación bibliográfica para cada una de las enzimas.

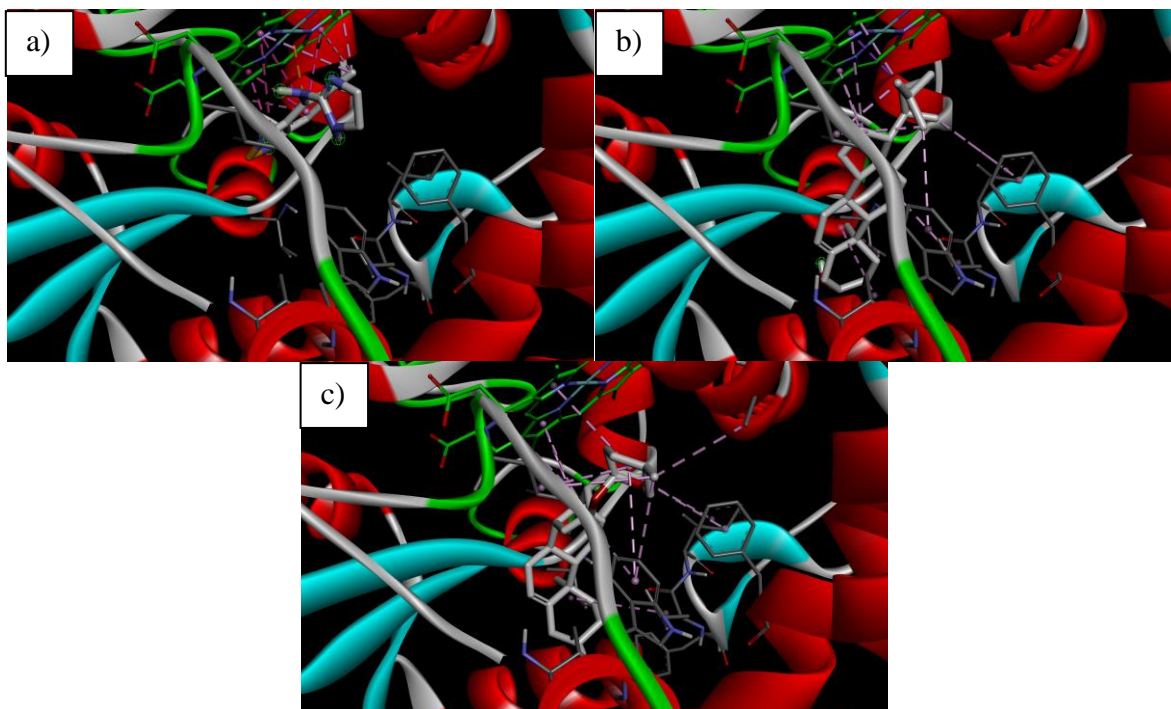


Figura 31. Interacciones mostradas (morado: alkyl/ π -alkyl) entre CYP11A1 con los compuestos; a) finasterida; b) colesterol; c) **44a**; mediante *DiscoveryStudio 2021*.

De los derivados de diosgenina (tabla 27) se encontraron que todos los derivados esteroideales analizados presentaron una inhibición específica hacia la CYP11A1, mientras que los derivados 22-oxocolestánicos no presentaron inhibición con ninguna de las enzimas analizadas.

Tabla 27. Compuestos con inhibición verdadera (dentro del sitio activo, color rojo) o falsa (fuera del sitio activo, verde) con las enzimas analizadas.

Moléculas	CYP17A1	CYP21A2	CYP19A1	CYP11A1	5 α -reductasa	11 β -HSD	17 β -HSD
44a	V	F	F	V	F	F	F
44b	F	F	F	V	F	F	F
44c	F	F	F	V	F	F	F
44d	F	F	F	V	F	F	F
44e	F	F	F	V	F	F	F
44f	F	F	F	V	F	F	F
44g	F	F	F	V	F	F	F
49a	F	F	F	V	F	F	F
49b	F	F	F	V	F	F	F
49c	F	F	F	V	F	F	F
49d	F	F	F	V	F	F	F

Al analizar las interacciones (figura 32) se observa que el añadir en el carbono 3 una glicina (**44b**) así como un ftalamidato de glicina (**44c**) genera un cambio en la posición de la molécula en el sitio catalítico, de forma que al presentar una glicina (**44b**) el grupo hemo tiene interacciones de alquilo con los anillos B, C, D, mientras que en el ftalamidato de glicina (**44c**) tiene interacción con los anillos D y F. A su vez pueden observarse interacciones de diferentes tipos, como lo son de van der Waals, puentes de hidrógeno, alkyl y pi-alkyl, así como pi-sigma, donde la intensidad del color refleja el orden de interacciones de mayor o menor fuerza, por ejemplo los puentes de hidrógeno convencionales tienen mayor fuerza que las de van der Waals, por lo que van a tener una mayor contribución a la interacción molécula-enzima.

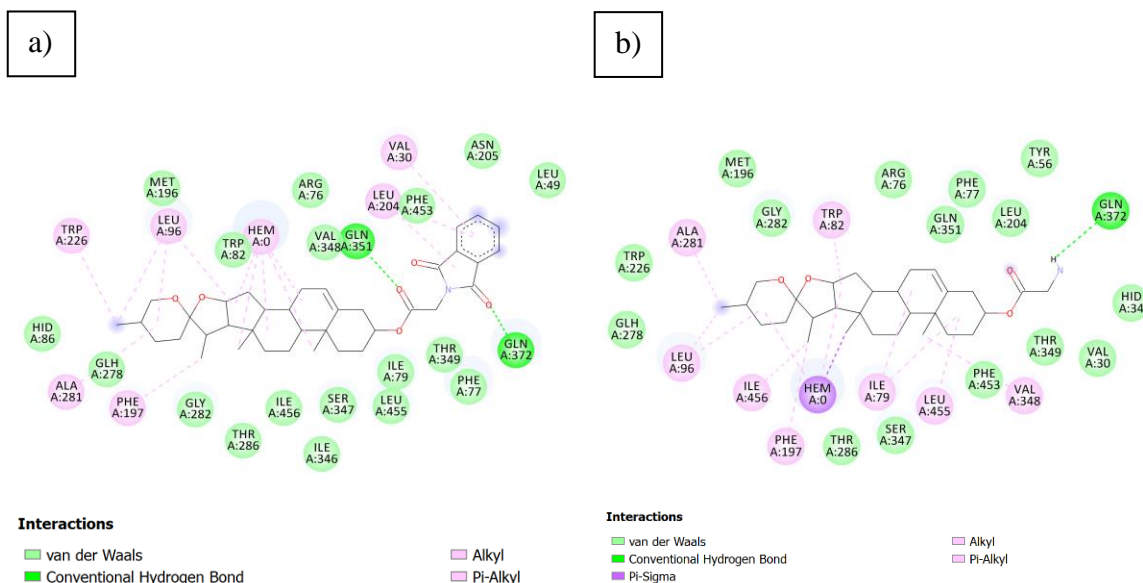


Figura 32. Diagrama 2D de interacciones entre la CYP11A1 y; a) **44c**; b) **44b**; obtenida mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Como se observa en la figura 33, al tener en el carbono 3 un acetato (**44d**) o fenilalanina (**44e**), ambos tienen una orientación espacial similar, lo cual se observa en la interacción con el grupo hemo en los anillos C, D y F, así como con la fenilalanina-77 y valina-52 por parte de grupos funcionales en el carbono 3 de ambas moléculas, sin embargo, existen diferencias de interacción en posiciones donde no se realizaron modificaciones como es el caso de interacciones entre el carbono 27 con la leucina-96 y triptófano-82 en **44d** y alanina-281, triptófano-226 además de leucina-96 en **44c**, esto se debe a que modificaciones en carbonos alejados puede generar cambios de posición que pueden afectar este tipo de interacciones, a

pesar de que ambas moléculas se encuentran en el mismo sitio activo. Por parte de los grupos en el carbono 3, el anillo aromático de la fenilalanina (**44e**) presenta interacciones de alquilo o π -alquilo con la valina-52 y fenilalanina-77 de la enzima, mientras que el grupo acetato (**44c**) solo presenta interacciones de van der Waals con estos mismos aminoácidos, este tipo de interacciones van a aumentar la afinidad del compuesto con la enzima, donde si se busca una posible actividad inhibitoria, se busca incrementar las interacciones que aumenten la afinidad como son las interacciones de van der Waals, de puentes de hidrógeno, pi-sigma y pi-pi en forma T que se presenta para el **44e**, donde estas últimas 2, son las de mayor fuerza, lo cual se refleja por la intensidad de su color en el diagrama 2D.

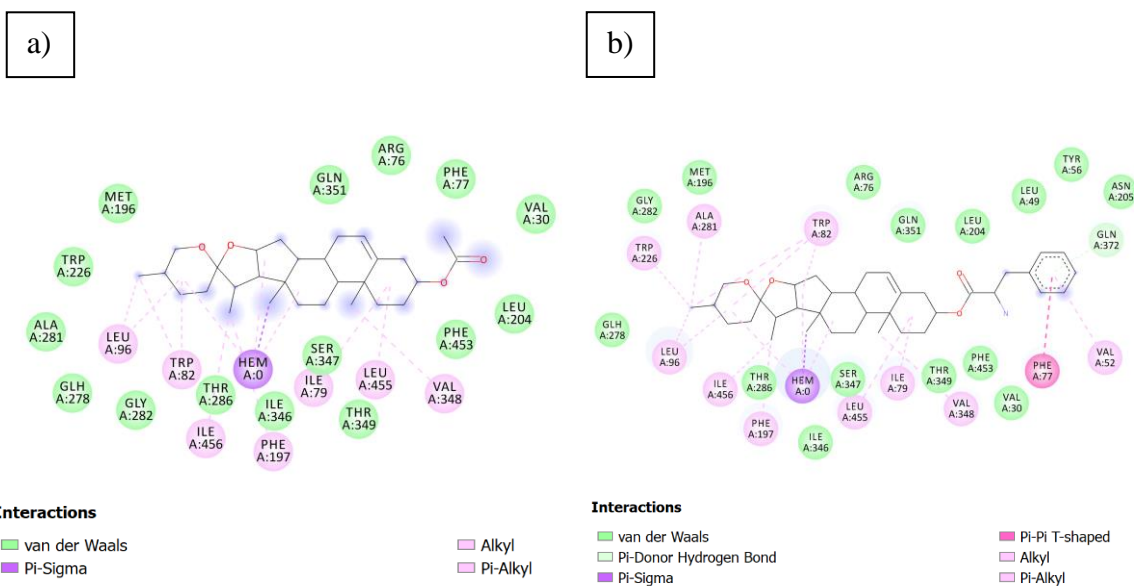


Figura 33. Diagrama 2D de interacciones entre la CYP11A1 y; a) **44d**; b) **44e**; obtenida mediante *DiscoveryStudio 2021*.

6.3.2 Derivados de laxogenina

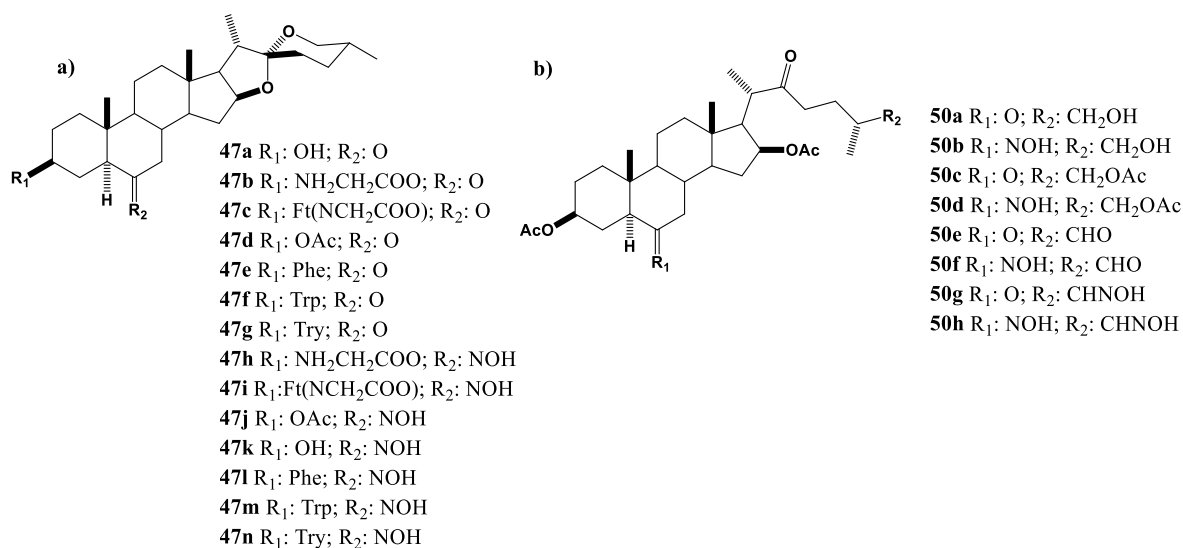


Figura 34. Derivados; a) espirostánicos; b) 22-oxocolestánicos.

En el caso de la 5 α -reductasa (figura 35) se observa que el inhibidor de referencia (finasterida) así como el sustrato (colesterol) y una de las moléculas con posible actividad inhibitoria (**50a**), se encuentran en el sitio activo y tienen interacción con el cofactor NADP.

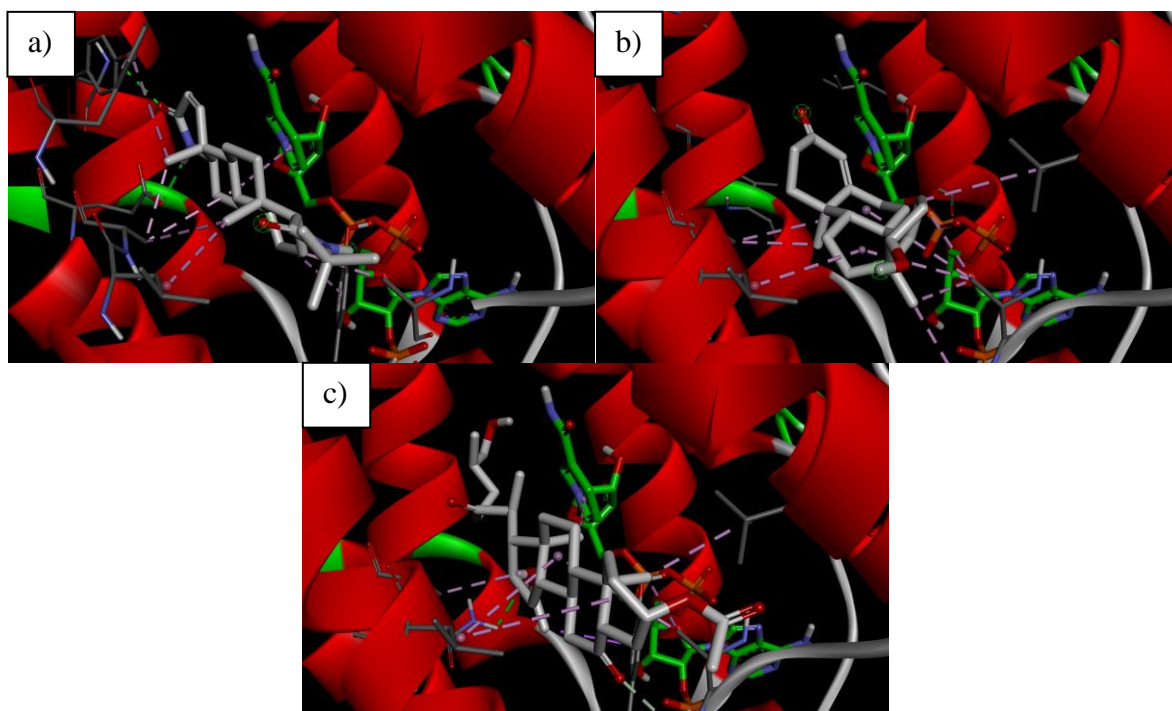


Figura 35. Interacciones mostradas (verde: puentes de hidrógeno; morado: alkyl/ π -alkyl) entre 5 α -reductasa con los compuestos; a) finasterida; b) colesterol; c) **50a**; mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Para la 17 β -HSD (figura 36) el inhibidor de referencia (PBRM) así como el sustrato (Androstenediona) y una de las moléculas con posible actividad inhibitoria (**47i**), se encuentran en el sitio activo, además de tener interacción con el cofactor NADP.

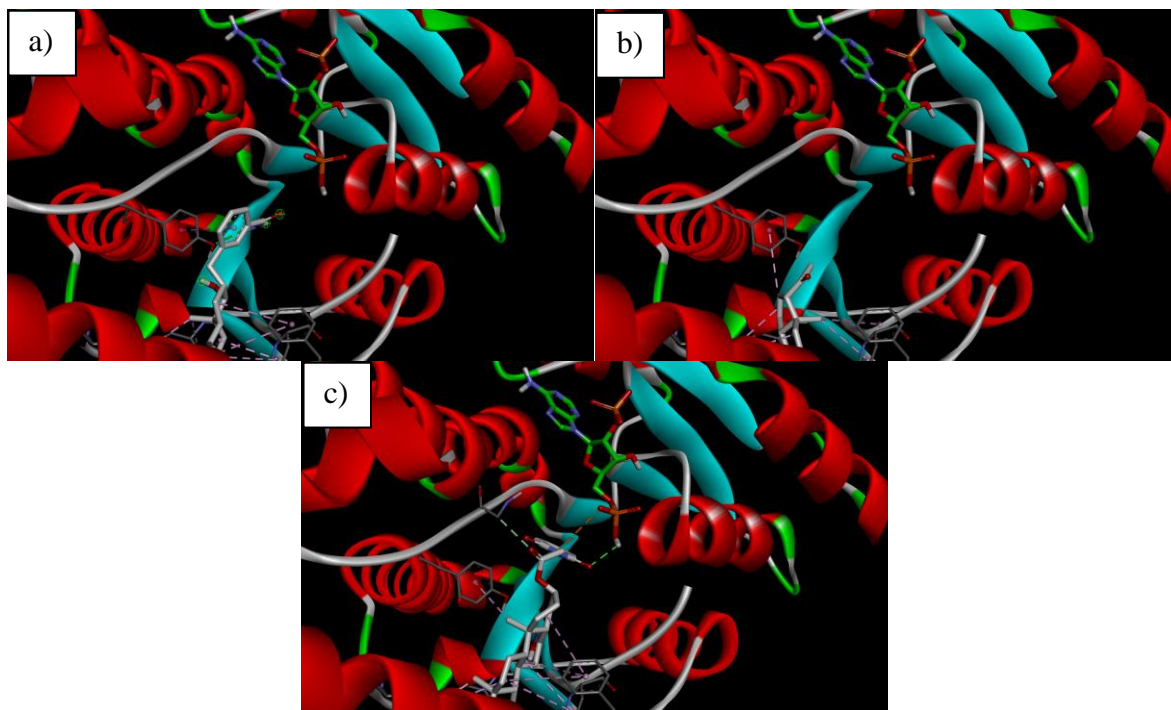


Figura 36. Interacciones mostradas (verde: puentes de hidrógeno; morado: alquil/ π -alquil) entre 17 β -HSD con los compuestos; a) PBRM; b) Androstenediona; c) **47i**; mediante *DiscoveryStudio 2021*.

De los derivados 22-oxocolestánicos sólo el **50d** no tuvo un efecto potencial inhibitorio con la 5 α -reductasa, donde los demás compuestos tuvieron una posible actividad inhibitoria específica para esta enzima, por parte de los derivados estirostánicos todos presentaron un posible efecto inhibitorio hacia la CYP11A1, donde los compuestos **47e** (fenilalanina en 3 y cetona en 6), **47f** (triptófano en 3 y cetona en 6), **47i** (ftalamidato de glicina en 3 y oxima en 6); **47l** (fenilalanina en 3 y NOH en 6); **47m** (triptófano en 3 y NOH en 6); **47n** (Tirosina en 3 y NOH en 6), presentaron a su vez una inhibición conjunta hacia la 17 β -HSD, mientras que **47a**, **47k** y **47n** tuvieron una posible inhibición conjunta para la 5 α -reductasa.

Como se observa en la tabla 28, el presentar un triptófano (**47m**, **47f**) o fenilalanina (**47e**, **47l**) en el carbono 3 aumento la afinidad por la enzima 17 β -HSD para los derivados cetónicos e hidroxiimínicos, por otro lado, de los 2 derivados con fenilalanina en el carbono 3 (**47e**, **47l**) solamente el derivado hidroxiimínico tuvo una posible inhibición para 17 β -HSD.

Tabla 28. Compuestos con inhibición verdadera (dentro del sitio activo, color rojo) o falsa (fuera del sitio activo, verde) con las enzimas analizadas.

Moléculas	CYP17A1	CYP21A2	CYP19A1	CYP11A1	5 α -reductasa	11 β -HSD	17 β -HSD
47a	F	F	F	V	V	F	F
47b	F	F	F	V	F	F	V
47c	F	F	F	V	F	F	F
47d	F	F	F	V	F	F	F
47e	F	F	F	V	F	F	V
47f	F	F	F	V	F	F	V
47g	F	F	F	V	F	F	F
47h	F	F	F	V	F	F	V
47i	F	F	F	V	F	F	V
47j	F	F	F	V	F	F	F
47k	F	F	F	V	V	F	F
47l	F	F	F	V	F	F	V
47m	F	F	F	V	F	F	V
47n	F	F	F	V	V	F	V
50a	F	F	F	V	V	F	F
50b	F	F	F	V	V	F	F
50c	F	F	F	V	V	F	F
50d	F	F	F	V	F	F	F
50e	F	F	F	V	V	F	F
50f	F	F	F	V	V	F	F
50g	F	F	F	V	V	F	F
50h	F	F	F	V	V	F	F

Para la 5 α -reductasa, la presencia de un hidroximino (**50c**) o cetona (**50d**) en el carbono 6 generó una pérdida de su potencial actividad inhibitoria, en ambos casos se tiene una interacción con la NADP en la cadena lateral, diferenciándose en el tipo de interacción, se tiene en el carbono 26 una interacción alquilo para **50d** y de van der Waals para **50c**, cabe resaltar que en ambos casos en la posición 26 se tiene un grupo acetato, esto se debe a cambios de interacción al tener un grupo aceptor de hidrógenos en el caso de la cetona (**50d**) lo que permite generar puentes de hidrógeno con aminoácidos como la prolina-31, por otro lado el contar con un grupo donador de hidrógenos como es el hidroximino, en lugar de este puente solo se generan interacciones de van der Waals, perdiendo su potencial actividad

inhibitoria y reafirmando la importancia de estas modificaciones puntuales para su actividad biológica (figura 37).

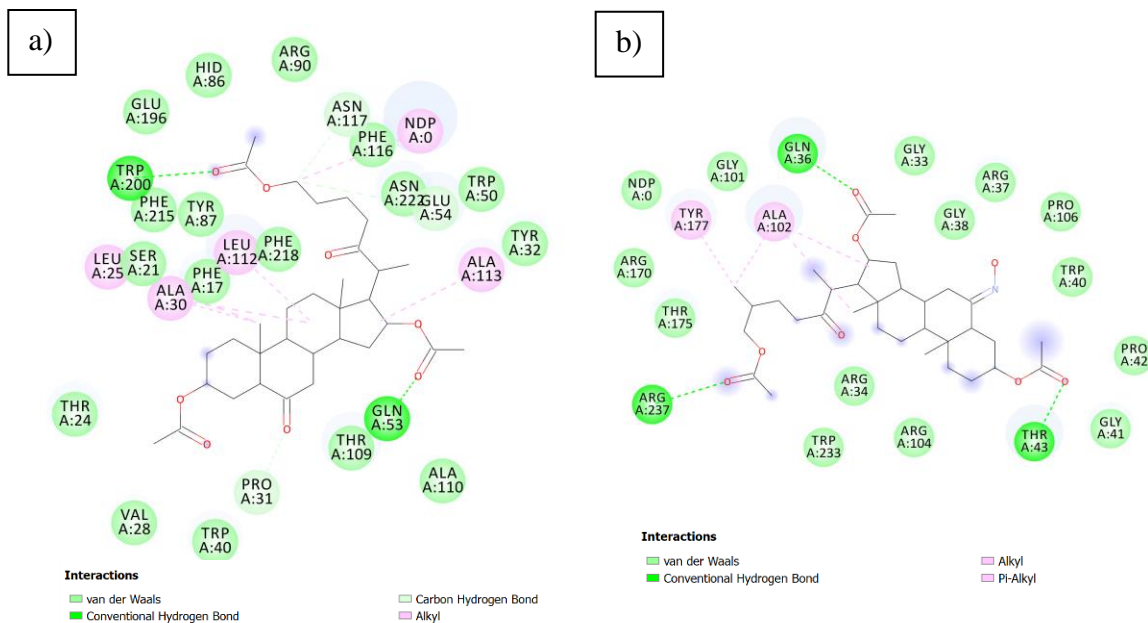
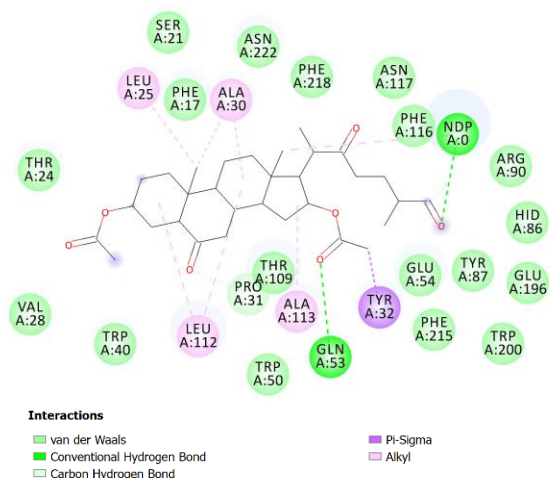


Figura 37. Diagrama 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) **50c**; b) **50d**; obtenida mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Por parte de las moléculas **50e** y **50g** (figura 38), ambas moléculas tienen una cetona en la posición 6, con la diferencia de una cetona (**50e**) o hidroxiiimino (**50g**) en la posición 27, uno de los aspectos más importantes a resaltar en este caso es un cambio en la interacción con el cofactor NADP, la presencia de la cetona permite generar un puente de hidrógeno con el cofactor, mientras que el hidroxiiimino genera una interacción de repulsión con la NADP disminuyendo la EA, así como la pérdida de interacción π -sigma con el grupo acetato, lo que genera un cambio en la posición de la molécula respecto a la proteína.

a)



b)

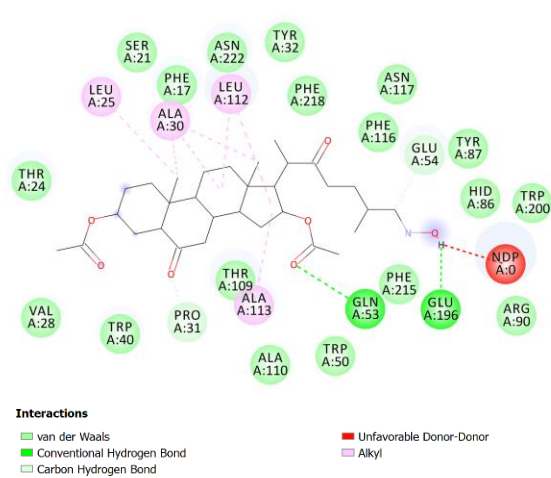


Figura 38. Diagrama 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) **50e**; b) **50g**; obtenida mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Como se observa en la figura 39, la laxogenina (**47a**) que no tuvo un posible efecto inhibitorio con la 17 β -HSD presenta solamente interacciones del tipo alquilo y de van der Waals, mientras que el derivado con fenilalanina en la posición 3 y cetona en 6 (**47e**) presentó una posible actividad inhibitoria, este aumento de la EA puede atribuirse a la presencia de puentes de hidrógeno con la cetona en el carbono 6 con la serina-141 y tirosina-155, esto a pesar de que la fenilalanina solo presenta interacciones de van der Waals, por lo que se puede atribuir este cambio en actividad biológica a la orientación de la molécula respecto a la proteína y no a la posición dentro del sitio activo, ya que el NADP presenta interacciones en ambos casos próximos al anillo A de la molécula.

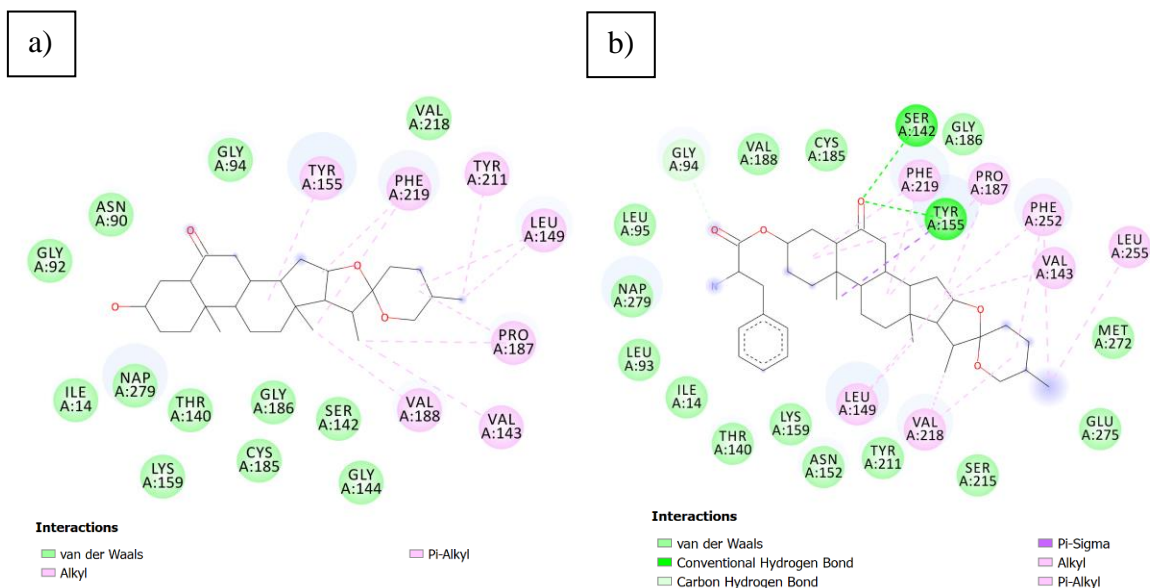


Figura 39. Diagrama 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) **47a**; b) **47e**; obtenida mediante *DiscoveryStudio 2021*.

En el caso de los compuestos **47i** y **47f** (figura 40), ambos presentaron actividad biológica con la enzima 17 β -HSD, diferenciándose en el tipo de interacción, con la cetona en posición 6 en el caso de **47f** presenta puentes de hidrógeno con serina-142 y tirosina-155, y solo interacciones de van der Waals al tener un hidroximino (**47i**) en el mismo carbono, a pesar de poseer de igual forma un oxígeno al tener una diferente hibridación (sp^3 para el hidroximino y sp^2 para la cetona) así como la proximidad de un nitrógeno con hibridación sp^2 lo cual imposibilita la posibilidad de este oxígeno de generar puentes de hidrógeno.

Por parte de las modificaciones en la posición 3, el ftalamidato de glicina (**47i**) presenta puentes de hidrógeno con el cofactor NADP mientras que el triptófano (**47f**) presentó una interacción π -anión entre los electrones π del indol, y uno de los oxígenos del NADP (figura 40), en ambos se conserva la interacción de van der Waals de la cetona del éster con la glicina-94, lo que nos permite observar la similitud de posición de ambas moléculas respecto a la enzima.

6.3.3 Derivados de 3 β ,5 α -dihidroespirost-6-ona.

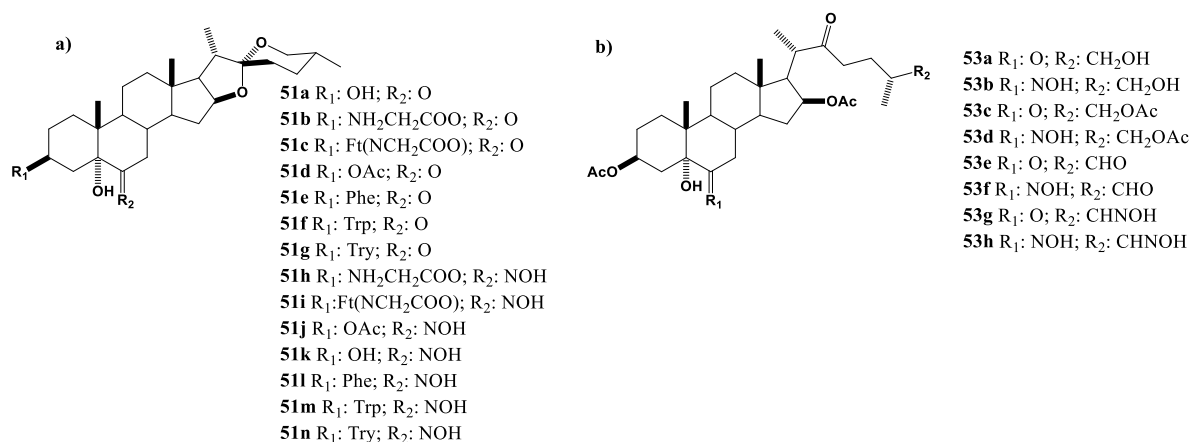


Figura 41. Derivados; a) espirostánicos; b) 22-oxocolestánicos.

En este caso los derivados espirostánicos como se observa en la tabla 29; **51b** (glicina en 3 y cetona en 6); **51e** (fenilalanina en 3 y cetona en 6), **51f** (triptófano en 3 y cetona en 6); **51g** (tirosina en 3 y cetona en 6); **51h** (glicina en 3 y NOH en 6); **51j** (acetato en 3 y NOH en 6); **51k** (OH en 3 y NOH en 6) y **51n** (tirosina en 3 y NOH en 6) tuvieron inhibición selectiva hacia la CYP11A1. **51i** (ftalamidato de glicina en 3 y NOH en 6) tuvo selectividad hacia la 17 β -HSD. **51l** (fenilalanina en 3 y NOH en 6) y **51m** (triptófano en 3 y NOH en 6) tuvieron inhibición en conjunto para la 17 β -HSD, mientras que el **51a** (OH en 3 y cetona en 6) inhibe de manera conjunta a la CYP11A1 y la 5 α -reductasa. Como se observa en la tabla 29, el presentar un ftalamidato de glicina en 3 y una cetona en 6 (**51b**), así como un acetato en 3 y cetona en 6 (**51d**) disminuye la afinidad por la CYP11A1. Mientras que el tener el mismo ftalamidato de glicina en 3 y NOH en 6 (**51i**) genera una selectividad hacia la 17 β -HSD. Por parte de los derivados 22-oxocolestánicos **53c** (cetona en 6 y OH en 26), **53d** (NOH en 6 y OH en 26) y **53f** (NOH en 3 y cetona en 26) fueron los únicos que no presentaron una posible actividad inhibitoria específica hacia la 5 α -reductasa.

Tabla 29. Energías de acoplamiento de las moléculas (kcal/mol) con sus respectivos cristales.

Moléculas	CYP17A1	CYP21A2	CYP19A1	CYP11A1	5 α -reductasa	11 β -HSD	17 β -HSD
51a	F	F	F	V	V	F	F
51b	F	F	F	V	F	F	V
51c	F	F	F	F	F	F	F
51d	F	F	F	F	F	F	F

51e	F	F	F	V	F	F	F
51f	F	F	F	V	F	F	F
51g	F	F	F	V	F	F	F
51h	F	F	F	V	F	F	V
51i	F	F	F	F	F	F	V
51j	F	F	F	V	F	F	F
51k	F	F	F	V	F	F	F
51l	F	F	F	V	F	F	V
51m	F	F	F	V	F	F	V
51n	F	F	F	V	F	F	F
53a	F	F	F	V	V	F	F
53b	F	F	F	V	V	F	F
53c	F	F	F	F	F	F	F
53d	F	F	F	V	F	F	F
53e	V	F	F	V	V	F	F
53f	F	F	F	V	F	F	F
53g	F	F	F	V	V	F	F
53h	F	F	F	V	V	F	F

Como se observa en la figura 42, los compuestos **51c** y **51i**, con ftalamidato de glicina en el carbono 3 y cetona (**51c**) o hidroximínico (**51i**) en la posición 6, no tuvieron un efecto inhibitorio para la CYP11A1, sin embargo, el derivado hidroximínico (**51i**) presentó una posible actividad inhibitoria específica para la 17 β -HSD, al analizar las interacciones de estas moléculas con la CYP11A1, se observan interacciones no favorables por parte del hidroxilo en el carbono 5 de ambas moléculas con el residuo de glutamina-351 (figura 42), sin embargo, la molécula **51m** con la misma interacción de repulsión con la glutamina-351 presenta una presunta inhibición con CYP11A1, esto podría explicarse por la capacidad de los electrones π del indol del triptófano para deslocalizarse y generar interacciones π -sigma con la leucina-96 y una interacción π - π con el grupo hemo, una capacidad que no tiene el ftalamidato por la presencia de carbonilos que se encuentran retirando densidad electrónica. Se observa algo similar para la molécula **51n** ya que el fenilo de la tirosina presenta a su vez una interacción π - π , en este caso con la fenilalanina-77.

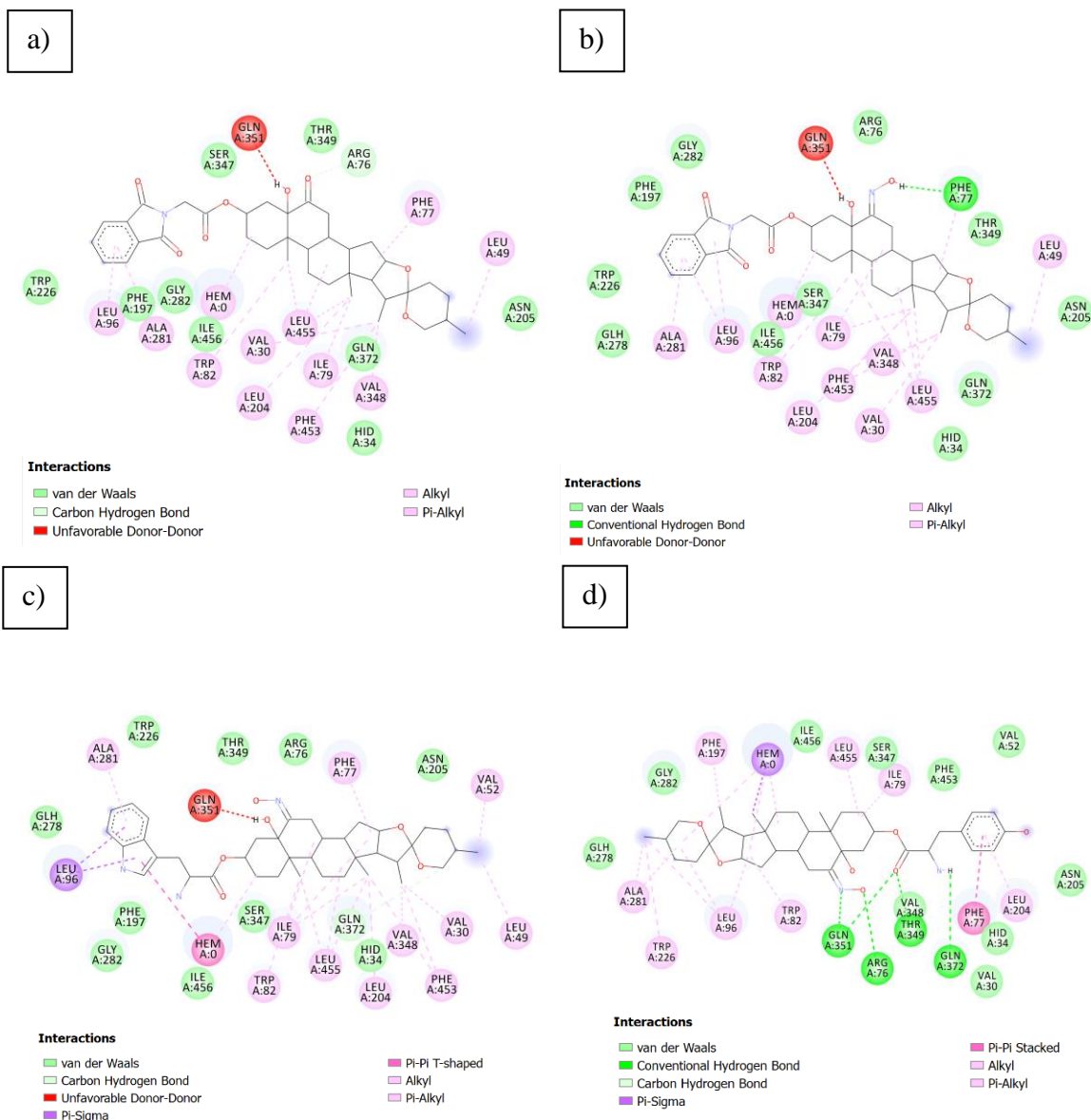


Figura 42. Diagramas 2D de interacciones entre la CYP11A1 y; a) **51c**; b) **51i**; c) **51m**; d) **51n** obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Para las moléculas **51d** y **51j** (figura 43) donde la única diferencia es la presencia de una cetona (**51d**) o un hidroxiimino o en 6 (**51j**) se observa que la molécula con el hidroxiimino presenta una posible inhibición de la CYP11A1, a pesar de tener una interacción de repulsión con la glutamina-351, y no contar con interacciones $\pi-\pi$ o puentes de hidrógeno, como en el caso anterior que establecieran la unión molécula-enzima, por lo que las interacciones de van der Waals así como las de alquilo fueron suficientes para generar una posible actividad inhibitoria con esta enzima, por otro lado el tener una cetona en el carbono 6 (**51d**) genera la pérdida de esta actividad, a pesar del puente de hidrógeno entre el hidroxilo en 5 y la serina-

147 así como no contar con interacciones de repulsión. Las interacciones de repulsión van a disminuir la afinidad compuesto-enzima, mientras que las otras interacciones van a tener un incrementar esta afinidad.

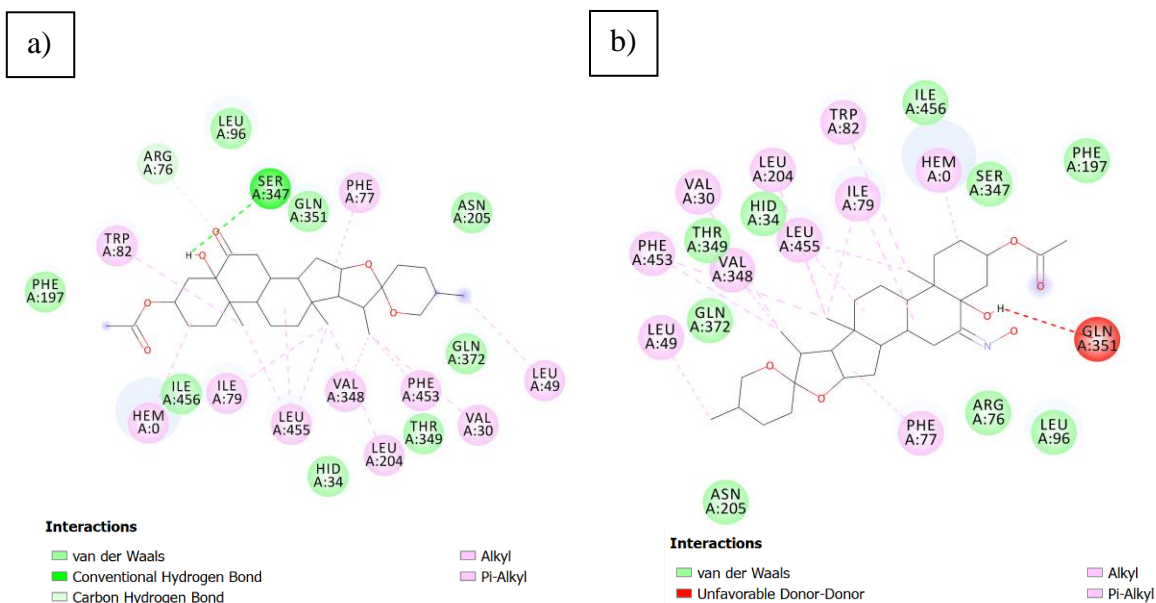


Figura 43. Diagramas 2D de interacciones entre la CYP11A1 y; a) **51d**; b) **51j**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Para la 5 α -reductasa (figura 44) los compuestos **53c** y **53d** no tuvieron posible actividad inhibitoria con esta enzima a pesar de generar diversos puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals, esto debido a que no se encuentran dentro del sitio activo, lo cual puede observarse al no haber interacción con el cofactor NADP.

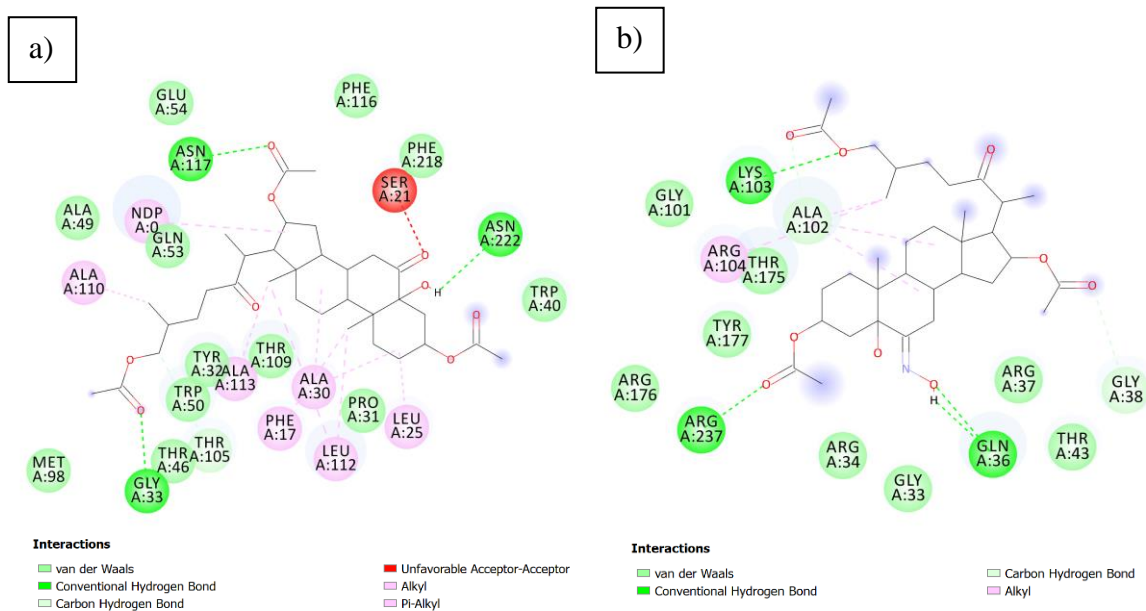


Figura 44. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) **53c**; b) **53d**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

De igual forma al comparar los compuestos **53e** y **53f** (figura 45) que se diferencian entre sí al tener en la posición 6 una cetona (**53e**) o un grupo hidroximínico (**53f**), se encontró que el compuesto **53e** tiene un posible efecto inhibitorio específico hacia la 5 α -reductasa, por otro lado, su contraparte hidroximínica (**53f**) no tiene actividad contra ninguna de las enzimas, a pesar de encontrarse en una similar orientación espacial, lo cual se observa al presentar la misma interacción del cofactor NADP con la cetona en el carbono 27, por lo que este cambio en su posible actividad biológica podría explicarse por la interacción de repulsión que tiene el hidroximínico de **53f** con la treonina-24.

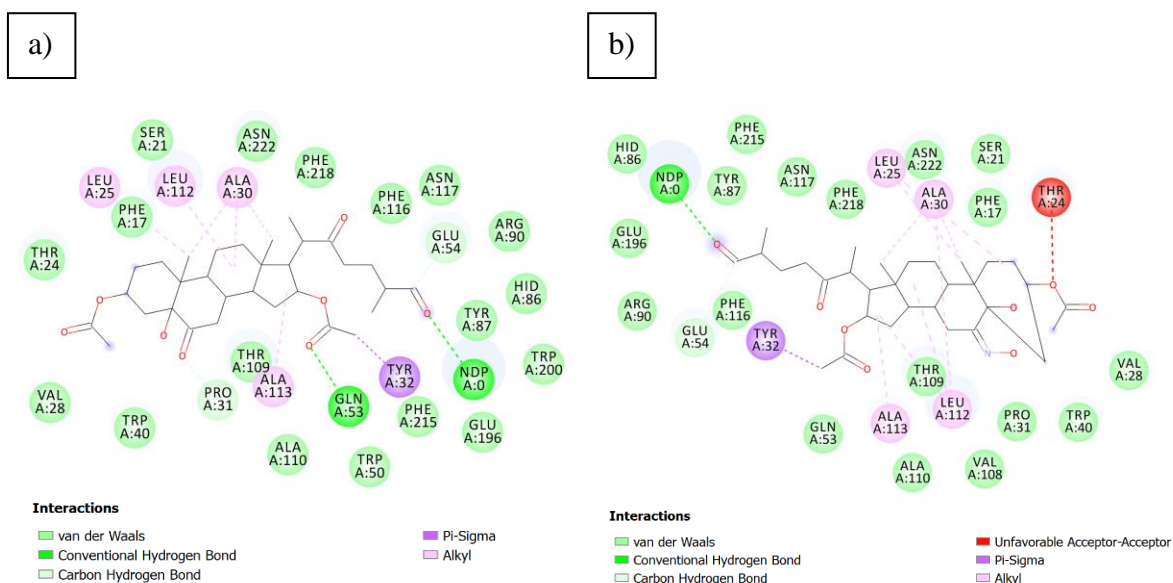


Figura 45. Diagramas 2D de interacciones 5 α -reductasa y; a) **53e**; b) **53f**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Para 17 β -HSD (figura 46) se encontró que el derivado hidroximínico con ftalamidato de glicina en la posición 3 (**51i**) presento una inhibición específica a esta enzima, mientras que su contraparte hidroximínica (**51c**) no presento actividad contra las enzimas analizadas. Analizando específicamente los cambios de interacción con esta enzima, se observa que la cetona en 6 (**51i**) presenta 2 puentes de hidrógeno (con serina-142 y tirosina-155) mientras que el hidroximínico (**51c**) presenta no solo 3 puentes de hidrógeno (con glicina-186, cisteína-185 y serina-142), sino 1 interacción π -anión y 1 puente de hidrógeno entre el NADP y el ftalamidato, lo cual explica esta diferencia en actividad entre los 2 derivados.

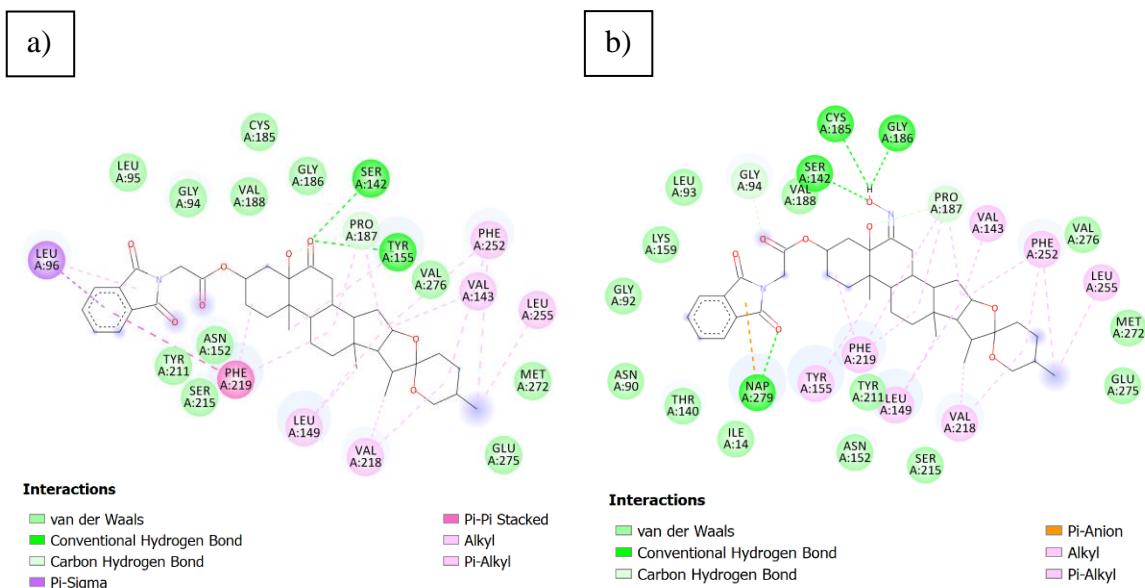


Figura 46. Diagramas 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) **51c**; b) **51i**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Entre los 2 derivados esteroideos (figura 47) con fenilalanina en la posición 3, ambos tuvieron una posible inhibición de la CYP11A1, sin embargo se encontró que al contar con un hidroximino en el carbono 6 (**51i**) presenta una actividad inhibitoria dual para la 17 β -HSD, al contrario que su contraparte hidroximínica (**51e**), esto puede explicarse por una interacción de repulsión entre el hidroxilo en la posición 5 α y la valina-188, mientras que el **51i** presenta una interacción π -azufre con la cisteina-185, así como un puente de hidrógeno entre el hidroxilo en 5 α y la misma valina-, lo cual resalta la importancia de estas modificaciones puntuales para la interacción molécula-proteína.

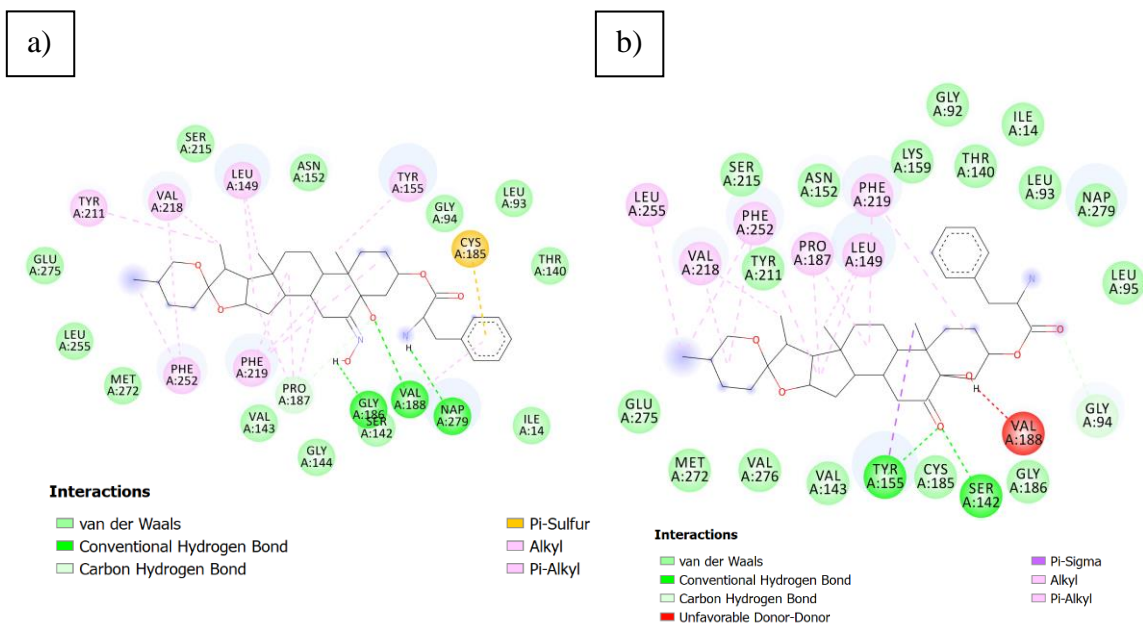


Figura 47. Diagramas 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) **51I**; b) **51E**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

6.3.4 Derivados del 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona.

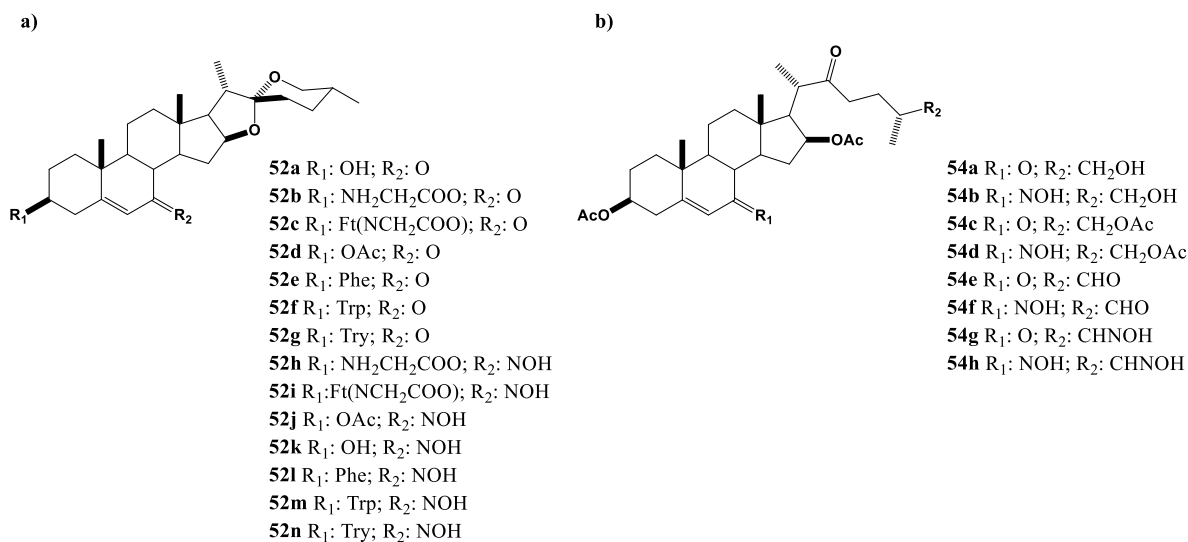


Figura 48. Derivados; a) espirostánicos; b) 22-oxocholestánicos.

Todos los derivados espirostánicos presentaron una posible actividad inhibitoria con la CYP11A1 (tabla 30), donde la molécula **52c** (ftalamidato de glicina en 3 y cetona en 6), **52d** (acetato en 3 y cetona en 6); **52f** (triptófano en 3 y cetona en 6) y **52l** (fenilalanina en 3 y NOH en 6) inhibieron también la 17 β -HSD, mientras la **52k** (OH en 3 y NOH en 6) inhibió

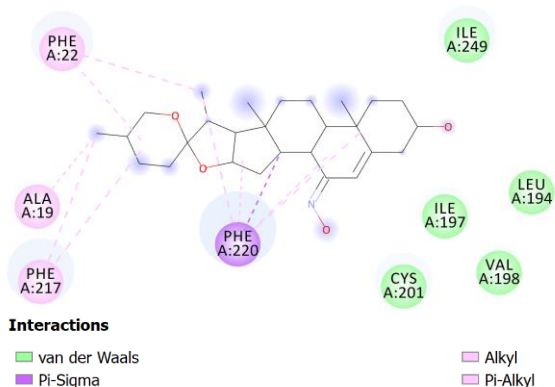
la CYP17A1 y **52a** la 5 α -reductasa, por otro lado, la **52h** inhibió estas 2 enzimas, así como la 17 β -HSD y la 5 α -reductasa.

Cuando se tiene un ftalamidato de glicina (**52c**, **52i**), triptófano (**52f**, **52m**), o acetato en 3 (**52d**, **52j**), la presencia de una cetona u oxima genera una presunta inhibición selectiva hacia la CYP11A1 cuando se tiene una cetona en 7, mientras que el derivado hidroxiimínico presentó también una inhibición conjunta hacia 17 β -HSD. Por otro lado, en el caso de la glicina, y fenilalanina en 3, sus derivados hidroxiimínicos (**52h**, **52l**) tuvieron una inhibición conjunta hacia la CYP11A1/17 β -HSD, donde la **52h** tuvo a su vez un posible efecto inhibitorio hacia la 5 α -reductasa, mientras los derivados cetónicos (**52b**, **52e**) presentaron una inhibición selectiva hacia las mismas enzimas. Los derivados con OH en 3 tuvieron un efecto inhibitorio específico hacia la CYP11A1 en el caso del derivado cetónico (**52a**) y una inhibición dual hacia la CYP17A1 por parte del derivado hidroxiimínico (**52k**).

Tabla 30. Energías de acoplamiento de las moléculas (kcal/mol) con sus respectivos cristales.

Moléculas	CYP17A1	CYP21A2	CYP19A1	CYP11A1	5 α -reductasa	11 β -HSD	17 β -HSD
52a	V	F	F	V	V	F	F
52b	F	F	F	V	F	F	F
52c	F	F	F	V	F	F	V
52d	F	F	F	V	F	F	V
52e	F	F	F	V	F	F	F
52f	F	F	F	V	F	F	V
52g	F	F	F	V	F	F	F
52h	F	F	F	V	V	F	V
52i	F	F	F	V	F	F	F
52j	V	F	F	V	F	F	F
52k	V	F	F	V	F	F	F
52l	F	F	F	V	F	F	V
52m	F	F	F	V	F	F	F
52n	F	F	F	V	F	F	F
54a	F	F	F	F	F	F	F
54b	F	F	F	V	V	F	F
54c	F	F	F	V	F	F	V
54d	F	F	F	V	F	F	F

a)



b)

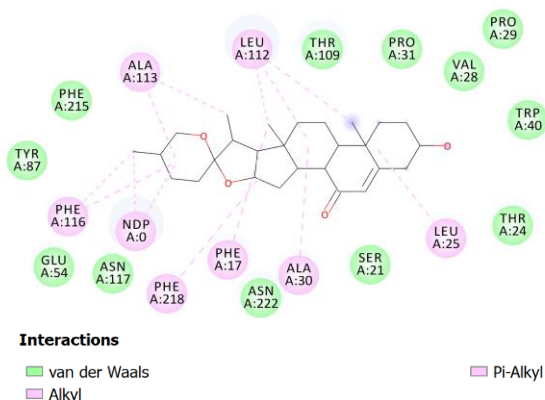
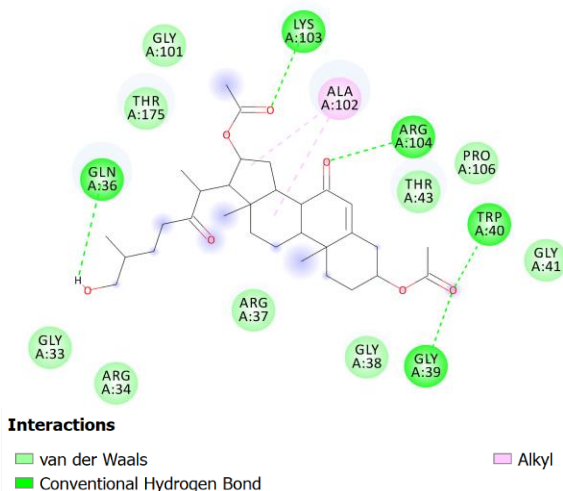


Figura 50. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) **52k**; b) **52a**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Los derivados 22-oxocolestánicos (figura 51) con un hidroxilo en la posición 26, presentaron posible actividad inhibitoria por parte del derivado hidroxiimínico **54b** e inactividad por parte del derivado cetónico **54a**. Esto se explica por presentar una mayor cantidad de interacciones de van der Waals, alquilo, así como una interacción π -alquilo, a pesar de que la contraparte cetónica (**54a**) presenta una mayor cantidad de puentes de hidrógeno en comparación al derivado hidroxiimínico, estas no tuvieron un efecto sobre la afinidad suficiente como para llegar a un posible efecto inhibitorio.

a)



b)

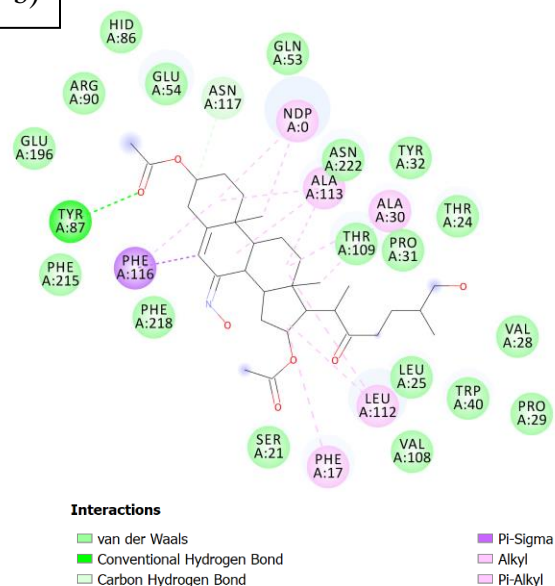


Figura 51. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) **54a**; b) **54b**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Los derivados esteroideales **52c** y **52d** presentaron una actividad inhibitoria hacia la 17 β -HSD (figura 52) y CYP11A1, a pesar de contar con ya sea un grupo voluminoso (**52c** con ftalamidato de glicina) o un grupo relativamente pequeño (**52d** con un grupo acetato), donde su contraparte hidroxiimínica (**52i** y **52j**) no tiene esta actividad biológica, lo cual puede explicarse por la falta de estabilización del puente de hidrógeno que puede generar la cetona en 7 con la serina-147.

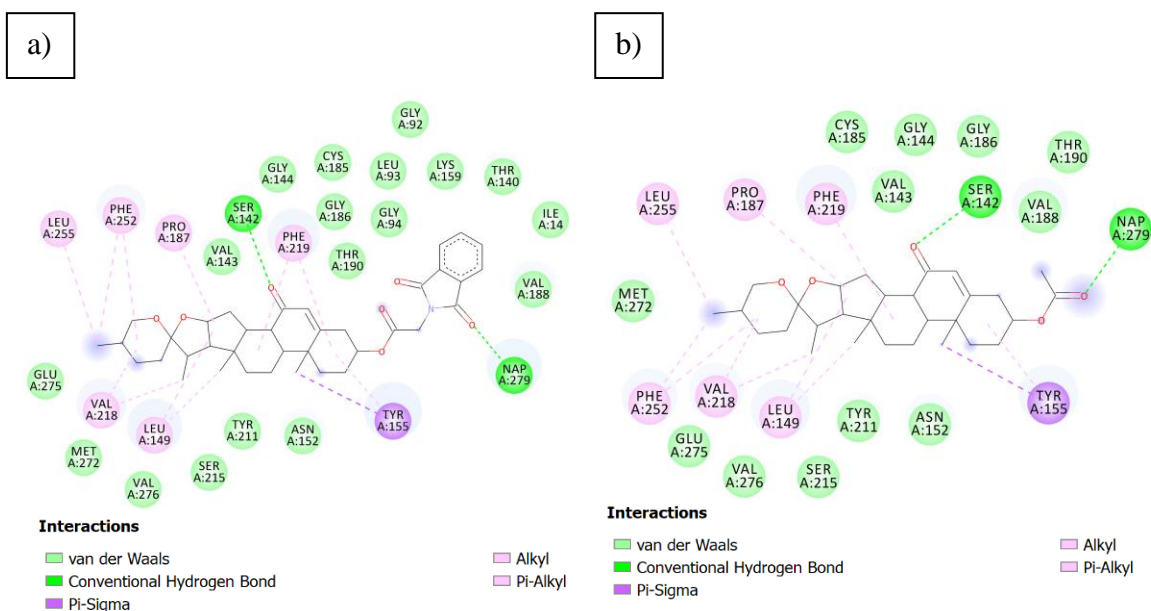


Figura 52. Diagramas 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) **52c**; b) **52d**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Por otra parte al tener una glicina en el carbono 3, el derivado hidroxiimínico (**52h**) presenta la actividad inhibitoria hacia la 17 β -HSD, mientras que su contraparte cetónica (**52b**) no tiene esta actividad, a pesar de tener una estabilización por puente de hidrógeno con la tirosina-211 (figura 53), esto puede explicarse por la orientación espacial del derivado hidroxiimínico (**52h**), ya que esta permite la generación de un puente de hidrógeno con el cofactor NADP así como una interacción polar hacia la cetona del éster del grupo acetato, así como una mayor cantidad de interacciones de van der Waals, lo cual confiere una mayor EA a pesar de presentar una interacción de repulsión hacia la asparagina-90.

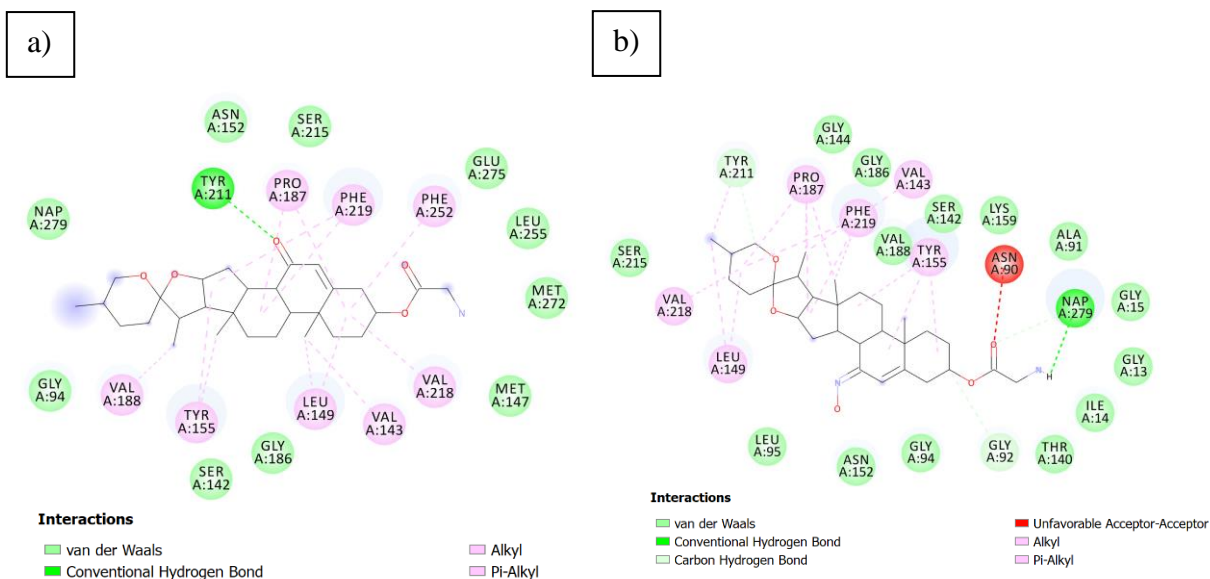


Figura 53. Diagramas 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) **52b**; b) **52h**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

6.3.5 Derivados de botogenina

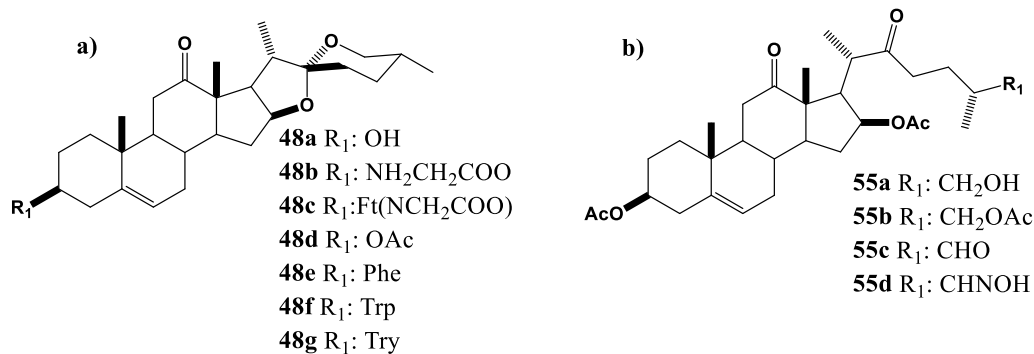


Figura 54. Derivados; a) espirostánicos; b) 22-oxocolestánicos.

Los derivados **48b** (glicina en 3), **48e** (fenilalanina en 3) y **48f** (triptófano en 3) inhibieron simultáneamente la CYP11A1 y 17 β -HSD (tabla 31), **48a** (OH en 3) inhibió selectivamente la CYP11A1, así como el compuesto **48c** (ftalamidato de glicina en 3) inhibió de forma selectiva la enzima 17 β -HSD.

Tabla 31. Energías de acoplamiento de las moléculas (kcal/mol) con sus respectivos cristales.

Moléculas	CYP17A1	CYP21A2	CYP19A1	CYP11A1	5 α -reductasa	11 β -HSD	17 β -HSD
48a	F	F	F	V	F	F	F
48b	F	F	F	V	F	F	V
48c	F	F	F	V	F	F	V
48d	F	F	F	V	F	F	F
48e	F	F	F	V	F	F	V
48f	F	F	F	V	F	F	V
48g	F	F	F	V	F	F	F
55a	F	F	F	V	V	F	V
55b	F	F	F	V	F	F	F
55c	F	F	F	V	V	F	F
55d	F	F	F	V	F	F	F

Se encontraron 2 derivados 22oxocolestánicos con una posible actividad inhibitoria selectiva hacia la 5 α -reductasa, el derivado **55a** con un hidroxilo en la posición 26 y **55c** con una cetona en la posición 26.

En la figura 55 por parte del derivado 22-oxocolestánico **55a** se observa una estabilización por 2 puentes de hidrógeno del hidroxilo en la posición 26 con el glutamato-196 así como el cofactor NADP, una interacción π -alquilo con la tirosina-32 y el acetato en el carbono 16, así como mayores interacciones de van der Waals y de alquilo.

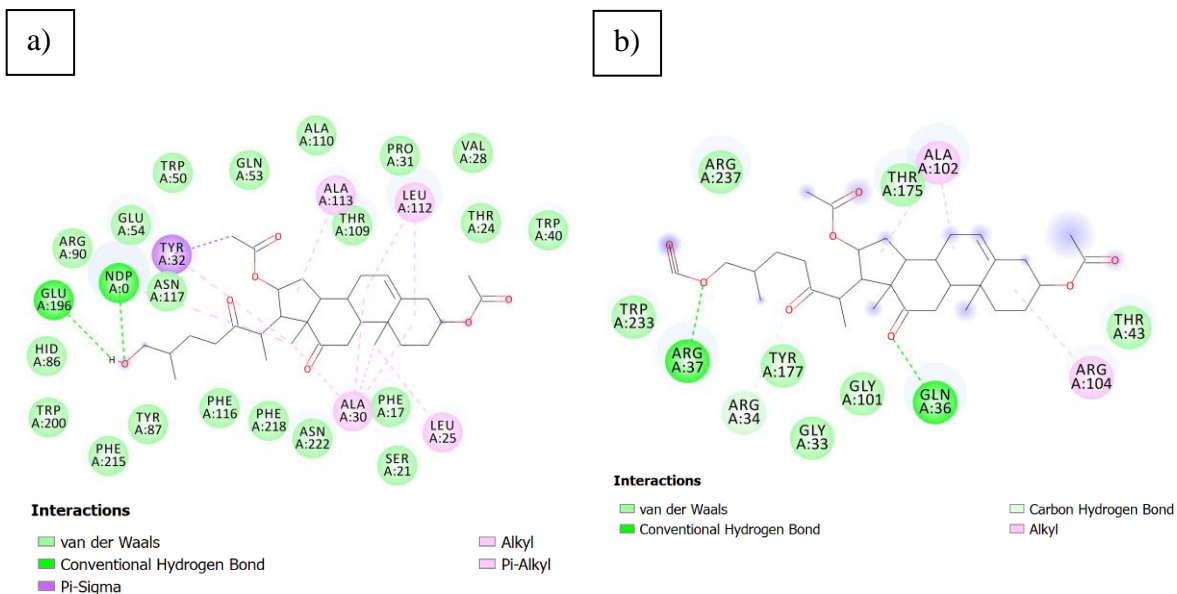


Figura 55. Diagramas 2D de interacciones entre la 5α -reductasa y; a) **55a**; b) **55b**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Como se observa en la figura 56, el derivado 22-oxocolestánico con una cetona en la posición 26 (**55c**) presentó una posible inhibición selectiva para la 5α -reductasa en comparación al derivado hidroxiimínico **55d**, lo cual puede explicarse por la mayor cantidad de puentes de hidrógeno (4) por parte del derivado hidroxiimínico (**55d**) en comparación al cetónico (**55c** con 2 puentes) sin embargo para el **55c** se tiene una interacción π -alquilo con el acetato en el carbono 16, así como una mayor cantidad de interacciones de alquilo, lo cual sugiere que la presencia de grupos funcionales aceptores de puentes de hidrógeno tiene un efecto positivo sobre la actividad biológica hacia esta enzima.

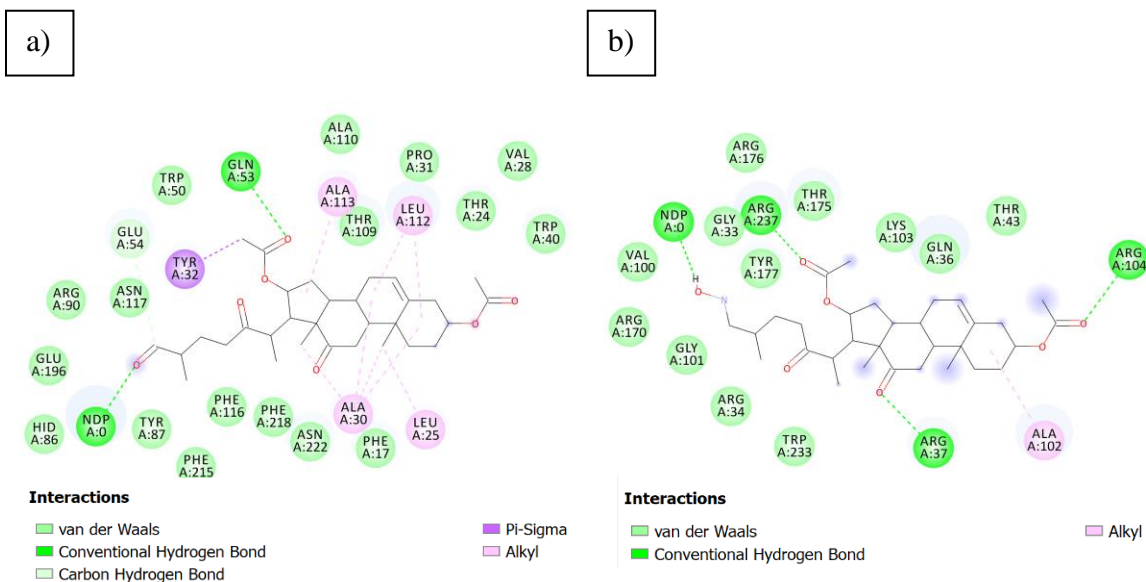
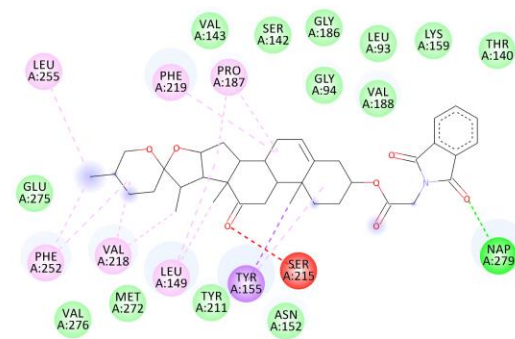


Figura 56. Diagramas 2D de interacciones entre la 5α -reductasa y; a) **55c**; b) **55d**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Para la enzima 17β -HSD (figura 57) se encontró que los derivados esteroestánicos **48c** (ftalamidato de glicina en 3) junto con **48f** (triptófano) y **48e** (fenilalanina) presentan una actividad inhibidora en comparación a derivados con grupos menos voluminosos en la posición 3. Al analizar las interacciones se observa que estos grupos funcionales generan puentes de hidrógeno con el cofactor NADP por parte del triptófano (**48f**) y ftalamidato de glicina (**48c**), así como una interacción π -anión por parte de los electrones π del triptófano, lo cual va a incrementar la estabilidad de esta interacción y por lo tanto la EA con esta enzima.

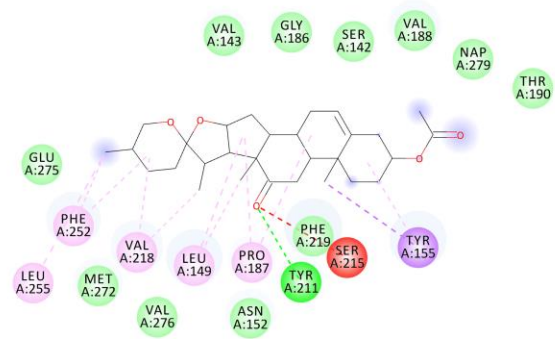
a)



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Unfavorable Acceptor-Acceptor
- Pi-Sigma
- Alkyl
- Pi-Alkyl

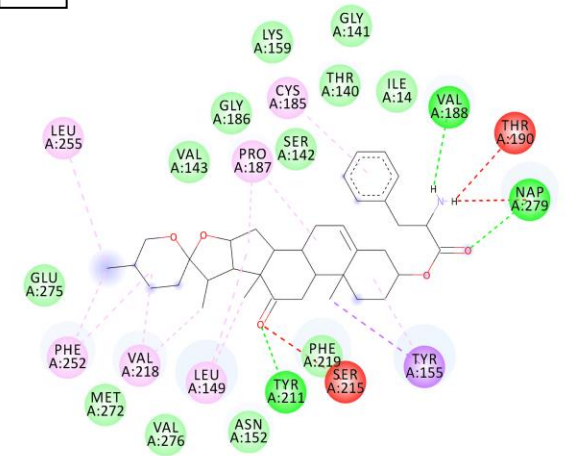
b)



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Unfavorable Acceptor-Acceptor
- Pi-Sigma
- Alkyl
- Pi-Alkyl

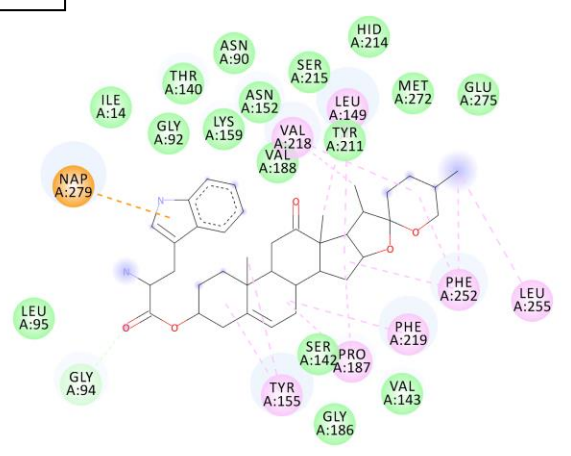
c)



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Unfavorable Donor-Donor
- Unfavorable Acceptor-Acceptor
- Pi-Sigma
- Alkyl
- Pi-Alkyl

d)



Interactions

- van der Waals
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Anion
- Alkyl
- Pi-Alkyl

Figura 57. Diagramas 2D de interacciones entre la 17β-HSD y; a) 48c; b) 48d; c) 48e; d) 48f obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

6.3.6 Derivados de hecogenina

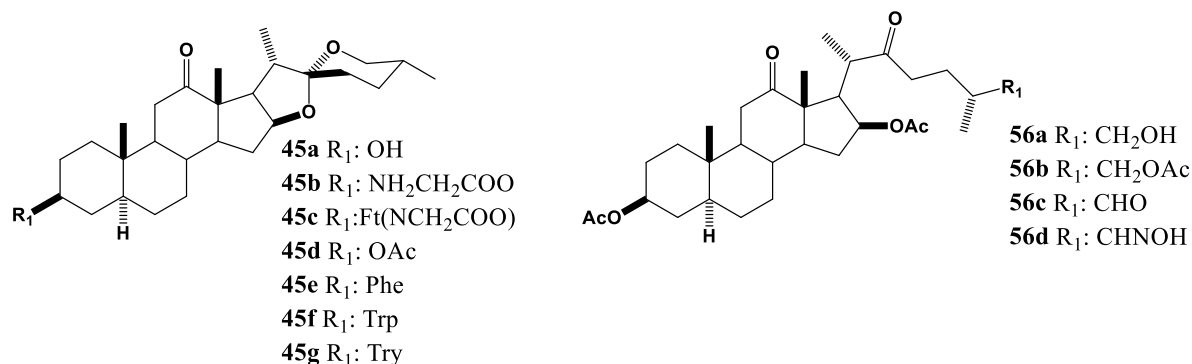


Figura 58. Derivados; a) espiroestánicos; b) 22-oxocholestanicos.

Todos los derivados espiroestánicos presentaron una posible inhibición de la CYP11A1 (tabla 32), los 22-oxocholestanicos presentaron una posible inhibición para la 5 α -reductasa con excepción del derivado hidroximínico **56d**. Los compuestos **45a** (hidroxilo en 3), **45b** (glicina en 3), **45c** (ftalamidato de glicina en 3) y **45f** (triptófano en 3) inhibieron simultáneamente la CYP11A1 y la 17 β -HSD, además de la 5 α -reductasa por parte del derivado **45a**.

Tabla 32. Energías de acoplamiento de las moléculas (kcal/mol) con sus respectivos cristales.

Moléculas	CYP17A1	CYP21A2	CYP19A1	CYP11A1	5 α -reductasa	11 β -HSD	17 β -HSD
45a	F	F	F	V	V	F	V
45b	F	F	F	V	F	F	V
45c	F	F	F	V	F	F	V
45d	F	F	F	V	F	F	F
45e	F	F	F	V	F	F	F
45f	F	F	F	V	F	F	V
45g	F	F	F	V	F	F	F
56a	V	F	F	F	V	F	F
56b	F	F	F	V	V	F	F
56c	V	F	F	F	V	F	F
56d	F	F	F	V	F	F	F

Al realizar un análisis de interacciones (figura 59), se observa por parte del compuesto **56a** una mayor cantidad de interacciones de van der Waals y alquilo, así como una interacción de π -alquilo con la tirosina-32 en comparación al derivado hidroximínico (**56d**), lo cual explica

la inactividad de **56d** hacia esta enzima, a pesar de contar con 2 puentes de hidrógeno con la arginina-167 y glutamina-89 en comparación a 1 con la glutamina-53 por parte del derivado **56a**.

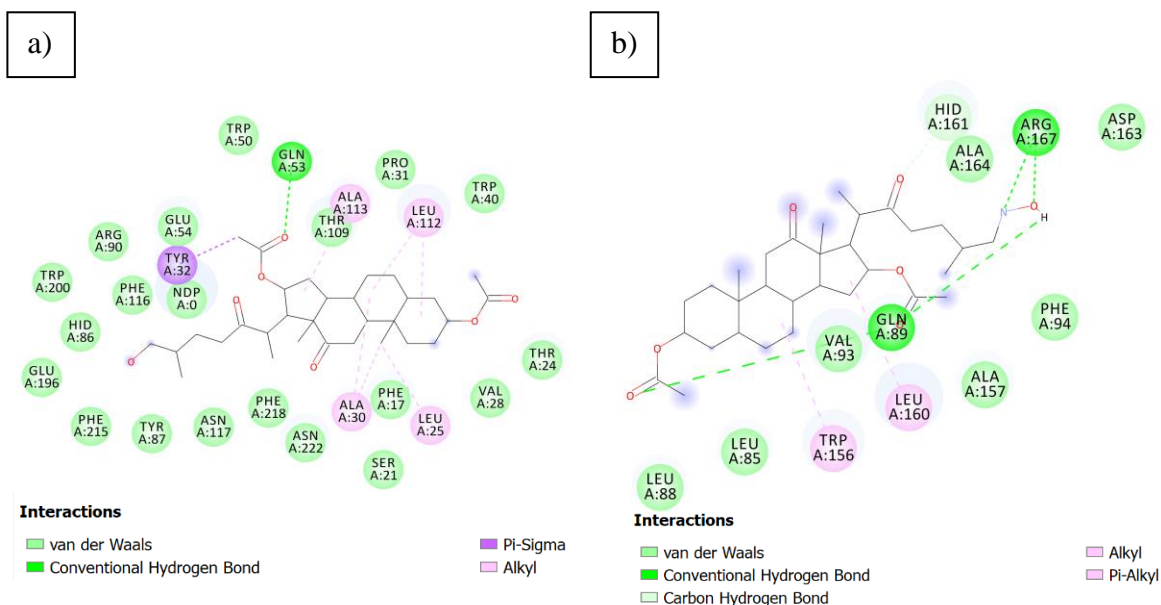


Figura 59. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) **56a** c; b) **56d**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Por parte de los compuestos **56b** y **56c** (figura 60) ambos presentaron una actividad inhibitoria específica hacia la enzima 5 α -reductasa, lo cual puede explicarse por las interacciones alquilo, van der Waals, así como los puentes de hidrógeno generados por las cetonas del éster del grupo acetato en la posición 16, así como en el carbono 26 por parte del **56c**.

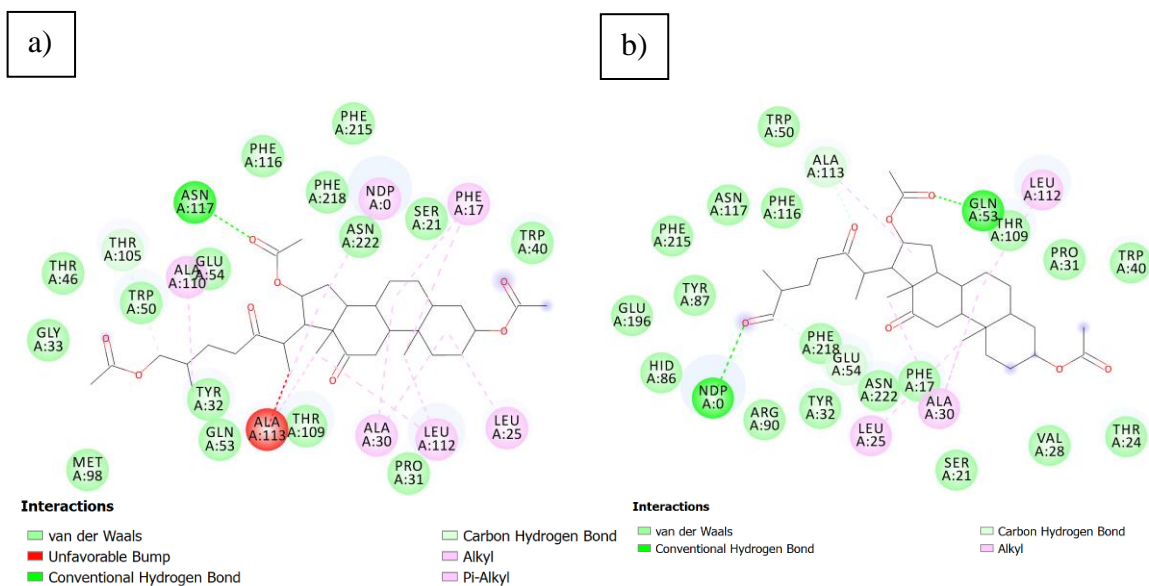
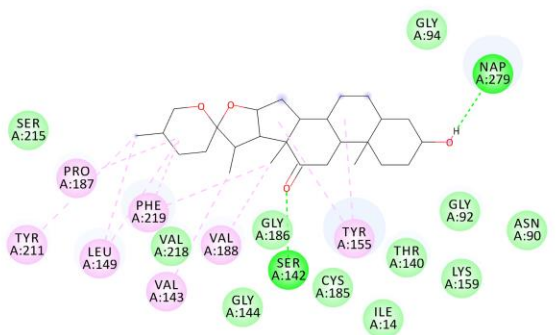


Figura 60. Diagramas 2D de interacciones entre la 5 α -reductasa y; a) **56b** c; b) **56c**; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Para la 17 β -HSD los derivados esteroideicos, **45a**, **45b** y **45c** tuvieron una posible actividad inhibitoria para 17 β -HSD (figura 61), mientras que el derivado **45d** con un acetato en el carbono 3 no presento esta actividad. Esto puede explicarse mediante la presencia de puentes de hidrogeno con el cofactor NADP por parte del hidroxilo (**45a**), hidroxiimino (**45b**), y ftalamidato de glicina (**45c**) donde este ultimo tambien genero una interaccion π -anion, mientras que el compuesto **45d** presento solo interacciones de van der Waals, alquilo, asi como π -alquilo.

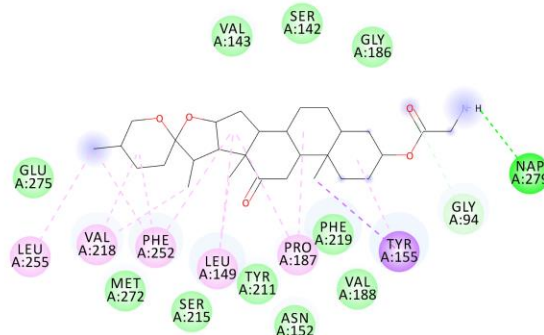
a)



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Alkyl
- Pi-Alkyl

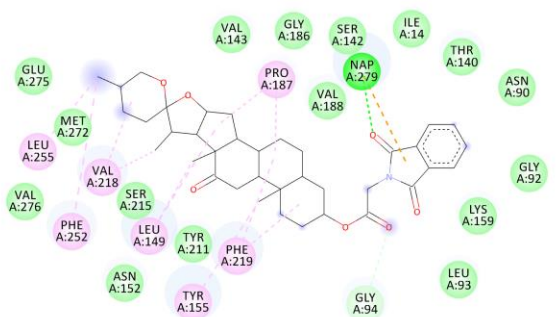
b)



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Sigma
- Alkyl
- Pi-Alkyl

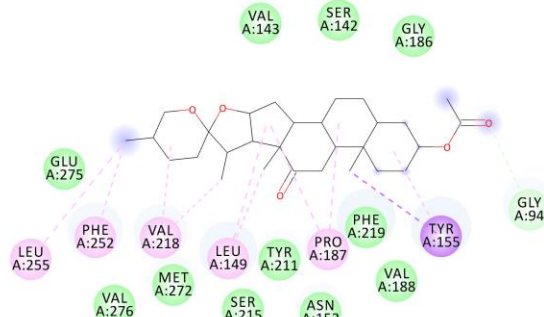
c)



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Anion
- Alkyl
- Pi-Alkyl

d)



Interactions

- van der Waals
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Sigma
- Alkyl
- Pi-Alkyl

Figura 61. Diagramas 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) **45a c**; b) **45b**; c) **45c**; d) **45d** obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

Por parte de los derivados **45e** (fenilalanina), **45f** (triptófano) y **45g** (tirosina) como se observa en la figura 62, estos presentaron una inhibición hacia la CYP11A1, por parte del derivado **45f** además de esta actividad, tuvo una inhibición conjunta hacia la enzima 17 β -HSD. Esta diferencia de actividad entre estos 3 compuestos puede explicarse por la presencia de una interacción π -anión con el cofactor NADP por parte del derivado con triptófano en la posición 3 (**45f**), lo cual incremento la EA lo suficiente para generar una posible actividad inhibitoria, por parte del **45g** el contar con 1 puente de hidrógeno y 1 interacción π -sigma con la valina-218 no fue suficiente para presentar actividad inhibitoria, y por último el **45e** no tiene interacciones que establezcan esta unión enzima-molécula por la fenilalanina en la posición 3.

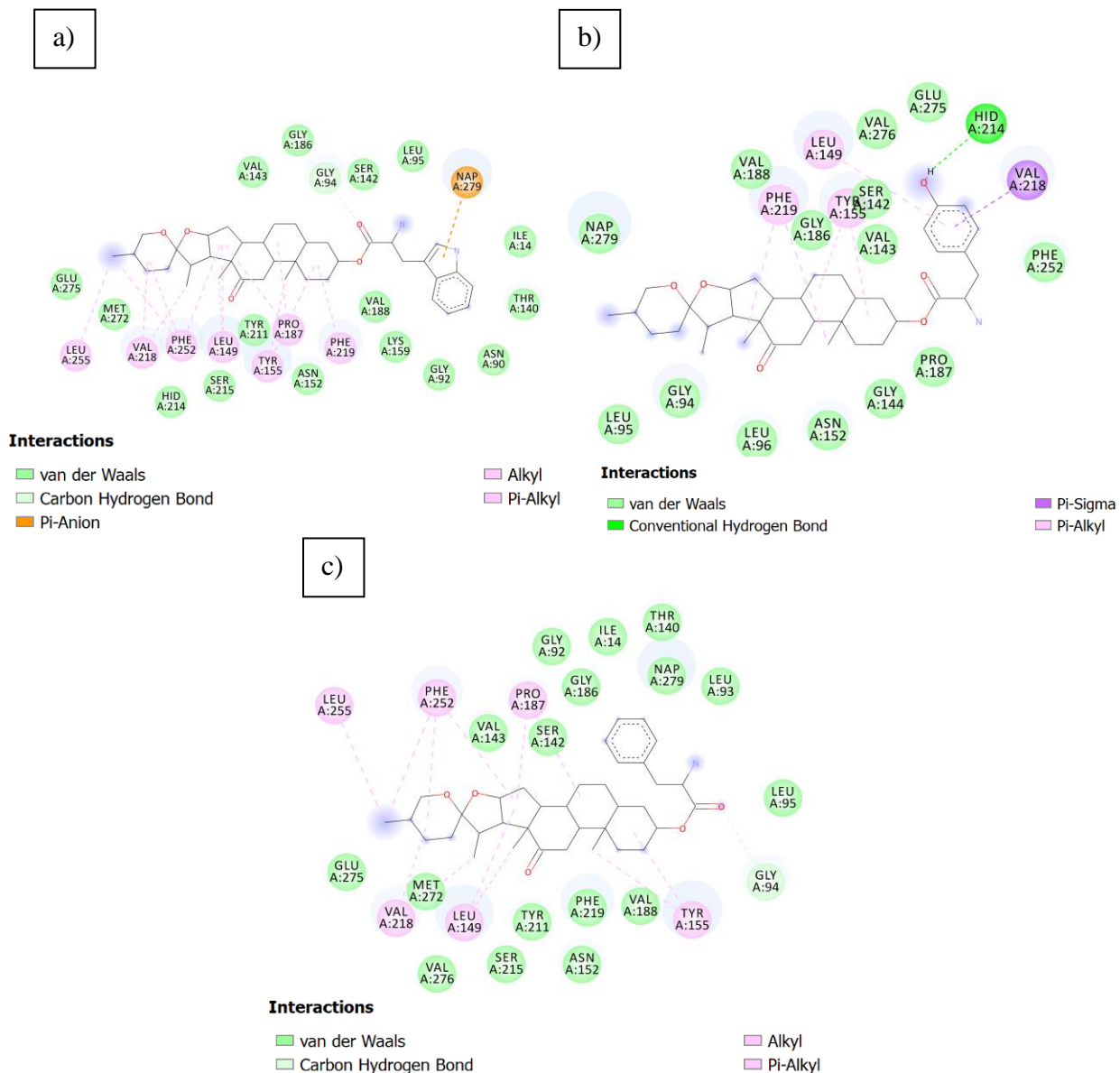


Figura 62. Diagrama 2D de interacciones entre la 17 β -HSD y; a) 45f; b) 45g; c) 45e; obtenidos mediante *DiscoveryStudio 2021*.

6.3.7 Inhibidores selectivos

En total se encontraron 32 posibles inhibidores selectivos para la CYP11A1, 2 para la 17 β -HSD y 21 para la 5 α -reductasa (tabla 33).

Tabla 33. Moléculas encontradas con un posible efecto inhibitorio con su correspondiente(s) enzima(s) inhibida(s).

Molécula	Enzima inhibida
44a, 44b, 44c, 44d, 44e, 44f, 44g, 47b, 47c, 47d, 47g, 47h, 47j, 51b, 51e, 51f, 51g, 51h, 51j, 51k, 51n, 52b, 52e, 52g, 52i, 52j, 52m, 48a, 48g, 45d, 45e, 45g	CYP11A1
51i, 48c	17 β -HSD
50a, 50b, 50c, 50e, 50f, 50g, 50h, 53a, 53b, 53e, 53g, 53h, 54b, 54e, 54f, 54g, 55a, 55c, 56a, 56b, 56c	5 α -reductasa

Para la CYP11A1 (figura 63) aquellos compuestos que presentaron posible actividad inhibitoria fueron de naturaleza espiroestánica. Dentro de los cuales se encuentran, todos los derivados de diosgenina (**44a**), laxogenina (**47b**), 3 β ,5 α -dihidroxiestirost-6-ona (**51a**), 3 β -hidroxiestirost-5-en-7-ona (**52b**), botogenina (**48a**) y hecogenina (**45d**).

Para la diosgenina (**45a**) todos los derivados presentaron posible actividad contra esta enzima, para derivados de laxogenina (**47a**), en su mayoría fueron los derivados cetónicos los que tuvieron posible actividad inhibitoria, y 2 hidroxiimínicos; para la 3 β ,5 α -dihidroxiestirost-6-ona (**51a**) y 3 β -hidroxiestirost-5-en-7-ona (**52a**), las moléculas base no presentaron actividad, por otro lado, principalmente los derivados cetónicos tuvieron una actividad inhibitoria. Por último, 2 derivados de botogenina (**48a**) y 3 de hecogenina (**45a**) presentaron esta actividad.

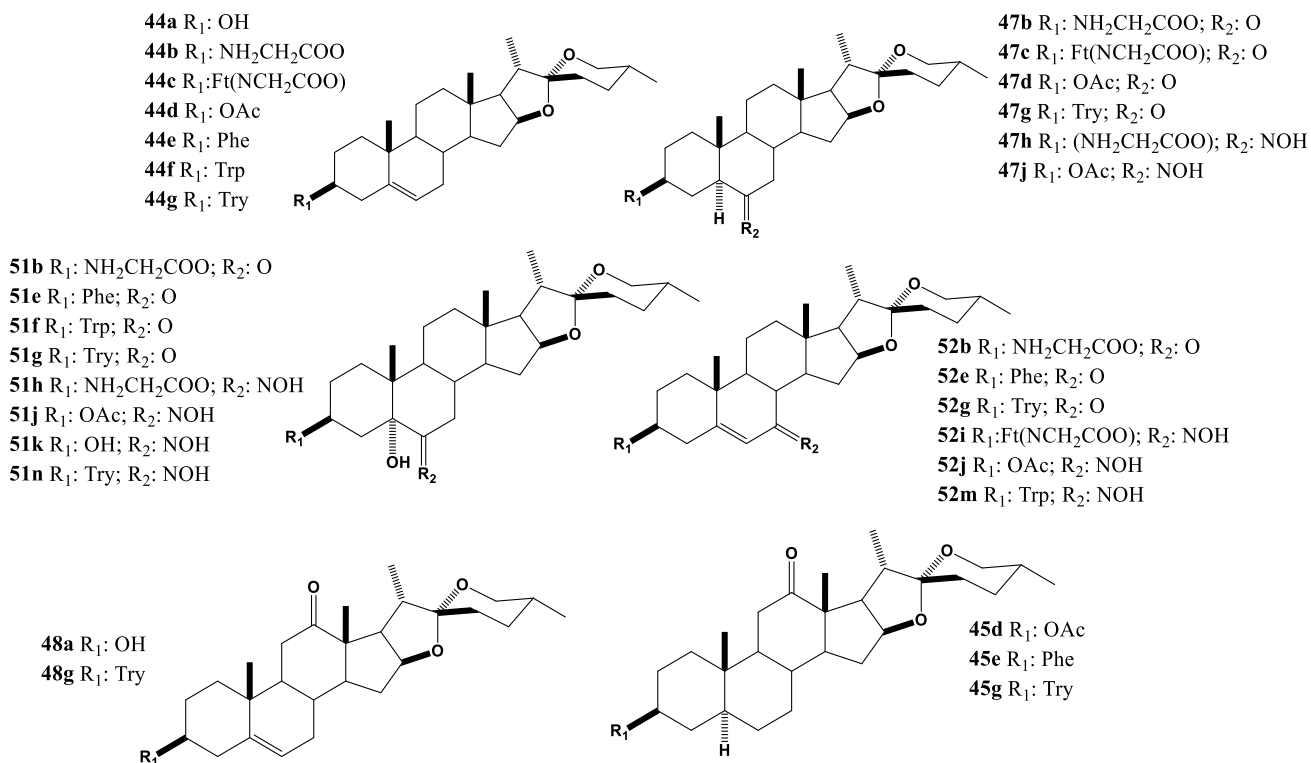


Figura 63. Compuestos con posible actividad inhibitoria selectiva hacia la CYP11A1.

Para la enzima 17 β -HSD (figura 64), sólo el derivado hidroxiimínico **51i** de la 3 β ,5 α -dihidroxiestero-6-ona y **48c** de botogenina presentaron posible actividad inhibitoria, ambos compuestos son derivados esteroestánicos, con un ftalamidato de glicina en el carbono 3, con la diferencia de la cetona en la posición 12 para el **48c**, en el caso del **51i** un hidroxilo en la posición 5a, así como un hidroxiimino en el carbono 6, lo cual reafirma la importancia de modificaciones puntuales en la búsqueda de moduladores de la esteroidogénesis.

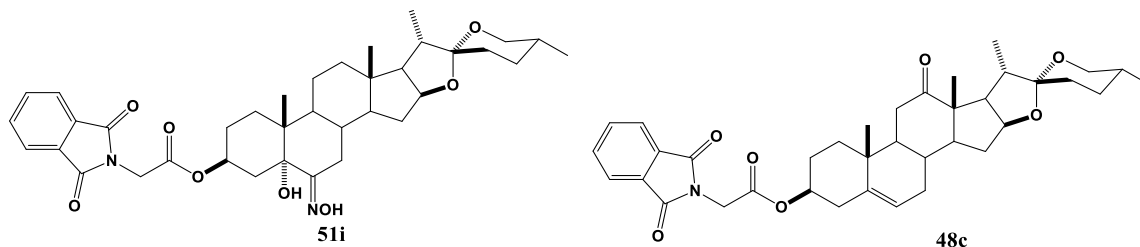


Figura 64. Compuestos con posible actividad inhibitoria selectiva hacia la 17 β -HSD.

En el caso de la 5 α -reductasa (figura 65), todos los derivados 22-oxocolestánicos presentaron una posible actividad inhibitoria, siendo en su mayoría derivados cetónicos (11) en comparación a los derivados hidroxiimínicos (7) para la posición 3.

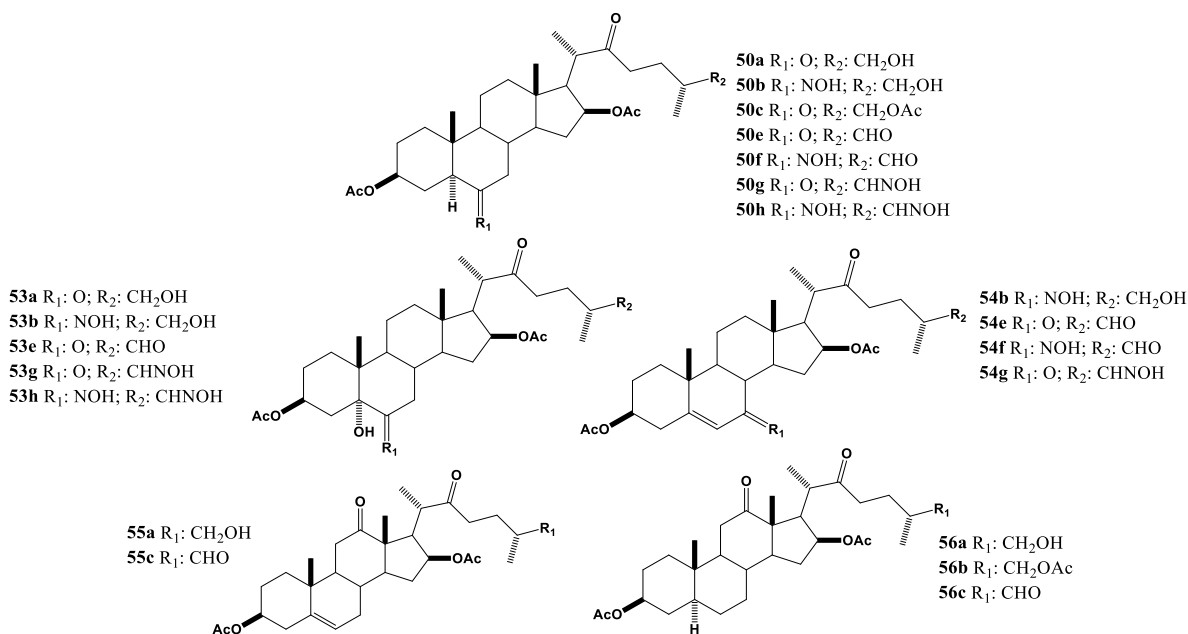


Figura 65. Compuestos con posible actividad inhibitoria selectiva hacia la 5 α -reductasa.

6.3.8 Inhibidores no selectivos

19 compuestos inhibieron de manera conjunta la CYP11A1 y 17 β -HSD, solo 1 inhibió a las CYP11A1 y CYP17A1 de forma conjunta, 5 compuestos las enzimas CYP11A1/5 α -reductasa, y se encontraron que 3 compuestos presentan posible capacidad inhibitoria de para la CYP11A1, 5 α -reductasa y 17 β -HSD (tabla 34).

Tabla 34. Moléculas encontradas con un posible efecto inhibitorio con su correspondiente(s) enzima(s) inhibida(s).

Molécula	Enzima inhibida
52k	CYP11A1/CYP17A1
47e, 47f, 47i, 47l, 47m, 47n, 51l, 51m, 52c, 52d, 52f, 52h, 52l, 48b, 48e, 48f, 45b, 45c, 45f	CYP11A1/17 β -HSD
47a, 47k, 47n, 51a, 52a,	CYP11A1/5 α - reductasa
47n, 52h, 45a	CYP11A1/5 α - reductasa/17 β -HSD

En este caso, los inhibidores de algunas de estas enzimas conjuntas pueden resultar útiles cuando existe una sobreexpresión de estas 2 enzimas, ya que se ha reportado que en ciertos casos de cRPC (cáncer de próstata resistente a castración), es necesario inhibir de forma

simultánea sea la CYP11A1 junto con la CYP17A1, [27], o la 17 β -HSD junto con la CYP17A1. [130]

El derivado hidroxiimínico **52k** de 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (figura 66) presentó una posible inhibición simultánea de la CYP11A1 y CYP17A1.

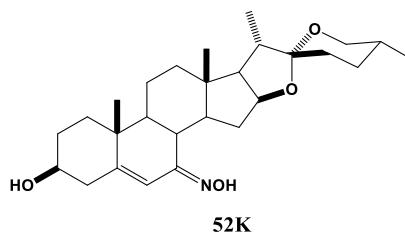


Figura 66. Compuesto con posible actividad inhibitoria para las CYP11A1/CYP17A1.

Para las CYP11A1/17 β -HSD (figura 67), de los derivados esteroídicos tabulados, al menos 2 compuestos de cada estructura presentaron una posible actividad biológica, siendo una mayor cantidad para los derivados de laxogenina (**47a**), en este caso una mayor cantidad de derivados hidroxiimínicos (8) que los cetónicos (5) tuvieron esta actividad, y de los aminoácidos tabulados, solo la tirosina no presento una posible actividad inhibitoria.

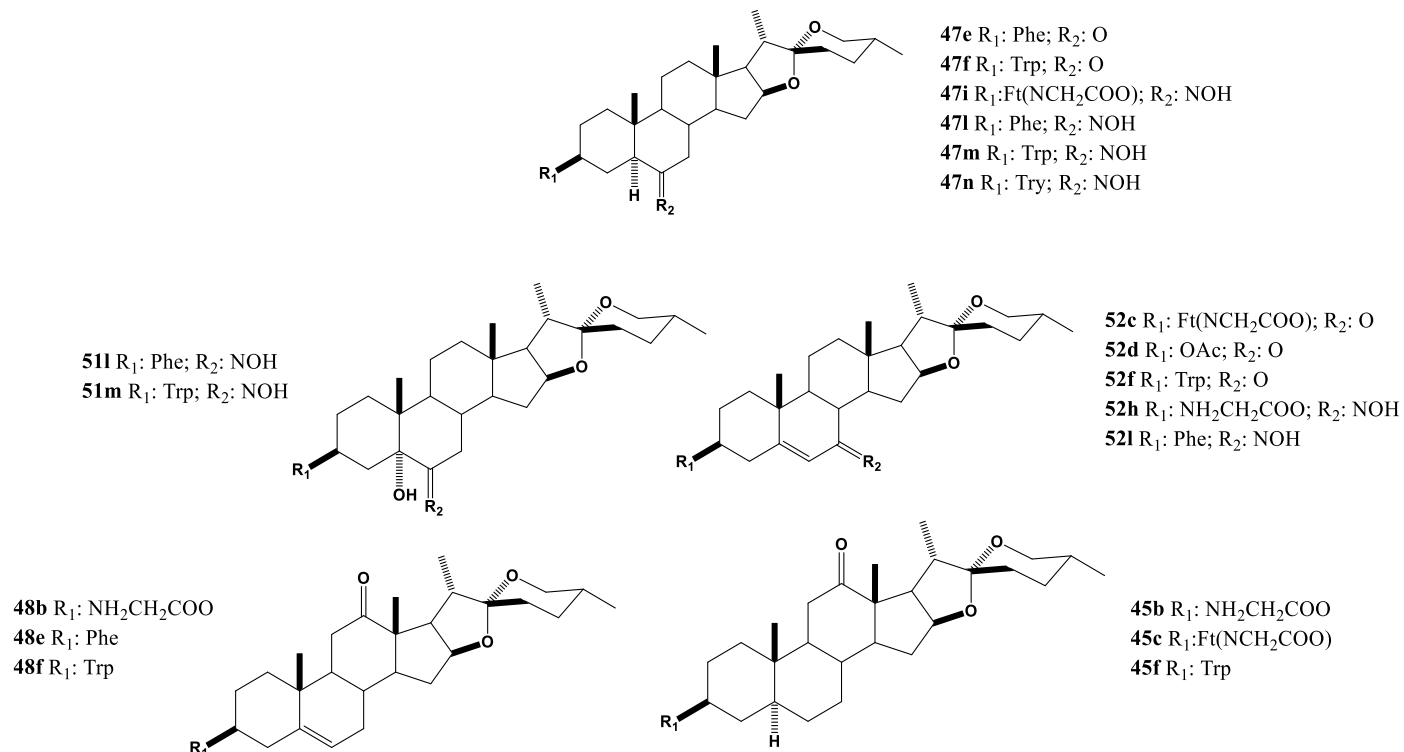


Figura 67. Compuestos con posible actividad inhibitoria hacia las CYP11A1/17 β -HSD.

Para las enzimas CYP11A1/5 α -reductasa (figura 68), los derivados esteroídicos de laxogenina (**47a**), 3 β ,5 α -dihidroxiestero-6-ona (**51a**) y 3 β -hidroxiestero-5-en-7-ona (**52a**) presentaron posible actividad, estos fueron: 2 derivados hidroxiimínicos de laxogenina (**47k**, **47n**), la laxogenina (**47a**), 3 β ,5 α -dihidroxiestero-6-ona (**51a**) y el derivado 3 β -hidroxiestero-5-en-7-ona (**52a**). Estos compuestos tienen en común la presencia de hidroxilos en el carbono 3, así como 1 hidroxilo en la tirosina para **47n**, así como una cetona en las posiciones 6 o 7.

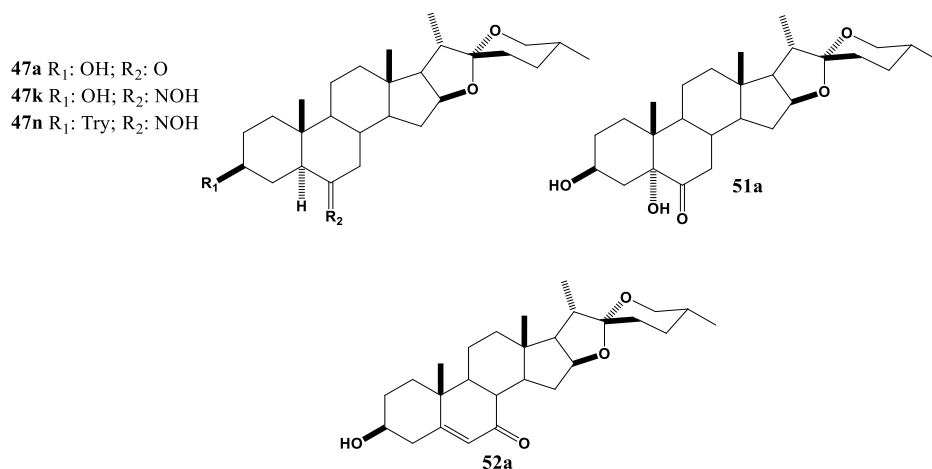


Figura 68. Compuestos con posible actividad inhibitoria hacia las CYP11A1/5 α -reductasa.

Se encontró a su vez que 3 compuestos tienen una posible actividad para 3 enzimas de forma simultánea, las CYP11A1/5 α -reductasa/17 β -HSD (figura 69). Estos compuestos son: la hecogenina (**52a**), el derivado hidroxiimínico de laxogenina **47n** con una tirosina en la posición 3, así como el derivado hidroxiimínico **52h** de 3 β -hidroxiestero-5-en-7-ona con una glicina en el carbono 3.

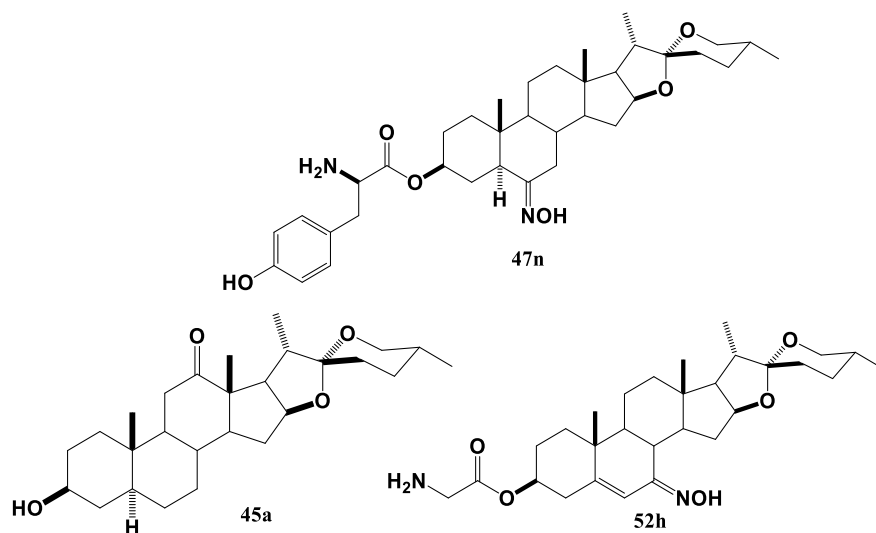


Figura 69. Compuestos con posible actividad inhibitoria hacia las CYP11A1/5 α -reductasa/17 β -HSD.

De estos 3 compuestos, dos presentan un grupo hidroxiimínico en las posiciones 5 (**47n**) y 6 (**52h**), estos 2 a su vez tienen un aminoácido en el carbono 3 (tirosina para **47n** y glicina para **52h**), sin embargo **45a**, no tiene similitud con estos 2, esto reafirma la necesidad de esta clase de estudios para la predicción de posibles interacciones cruzadas, ya que un análisis comparativo de grupos funcionales o propiedades químicas como polaridad, no arrojaría estos mismos resultados, lo cual podría llevar a posibles efectos secundarios por la inhibición de estas 3 enzimas.

6.4 COMPUESTOS SELECCIONADOS PARA SÍNTESIS.

Cómo se observa en la tabla 35, todos los compuestos seleccionados inhiben la CYP11A1, difiriendo en una actividad específica por parte de la diosgenina (**44a**), botogenina (**48a**) y acetato de hecogenina (**45d**), mientras que la laxogenina inhibió a su vez a la 17 β -HSD, y por último la 3 β ,5 α -dihidroxiestero-6-ona (**51a**) y el derivado 3 β -hidroxiestero-5-en-7-ona (**52a**) presentaron una inhibición dual hacia la CYP11A1 y 5 α -reductasa.

Tabla 35. Actividad inhibitoria por parte de los compuestos seleccionadas hacia las enzimas CYP11A1, 17 β -HSD y 5 α -reductasa, donde el color rojo indica inhibición y verde actividad no inhibitoria.

Compuesto	CYP11A1	17 β -HSD	5 α -reductasa
Diosgenina (44a)	Red	Green	Green
Laxogenina (47a)	Red	Red	Green
3 β ,5 α -dihidroxiestirost-6-ona (51a)	Red	Green	Red
Botogenina (48a)	Red	Green	Green
3 β -hidroxiestirost-5-en-7-ona (52a)	Red	Green	Red
Acetato de hecogenina (45d)	Red	Green	Green

Los compuestos seleccionados para síntesis (figura 70) fueron la diosgenina (**44a**), laxogenina (**47a**), la 3 β ,5 α -dihidroxiestirost-6-ona (**51a**), la botogenina (**48a**), derivado 3 β -hidroxiestirost-5-en-7-ona (**52a**), acetato de hecogenina (**45d**). Cabe resaltar que la ventaja de seleccionar las moléculas base y no aquellas con modificaciones para su síntesis y/o obtención, es su utilización para (posterior al trabajo presentado) posteriores análisis *in vitro* para comprobar y robustecer el estudio realizado, así como partiendo de estas moléculas es posible sintetizar algunos de los inhibidores específicos encontrados en el estudio, a su vez no se seleccionaron derivados hidroxiimínicos debido a que en el análisis estadístico se encontró que derivados estirostánicos así como 22-oxocolestánicos no tenían un efecto relevante sobre la EA con las enzimas analizadas, al solo tener efecto sobre la enzima CYP19A1 por parte de los derivados 22-oxocolestánicos.

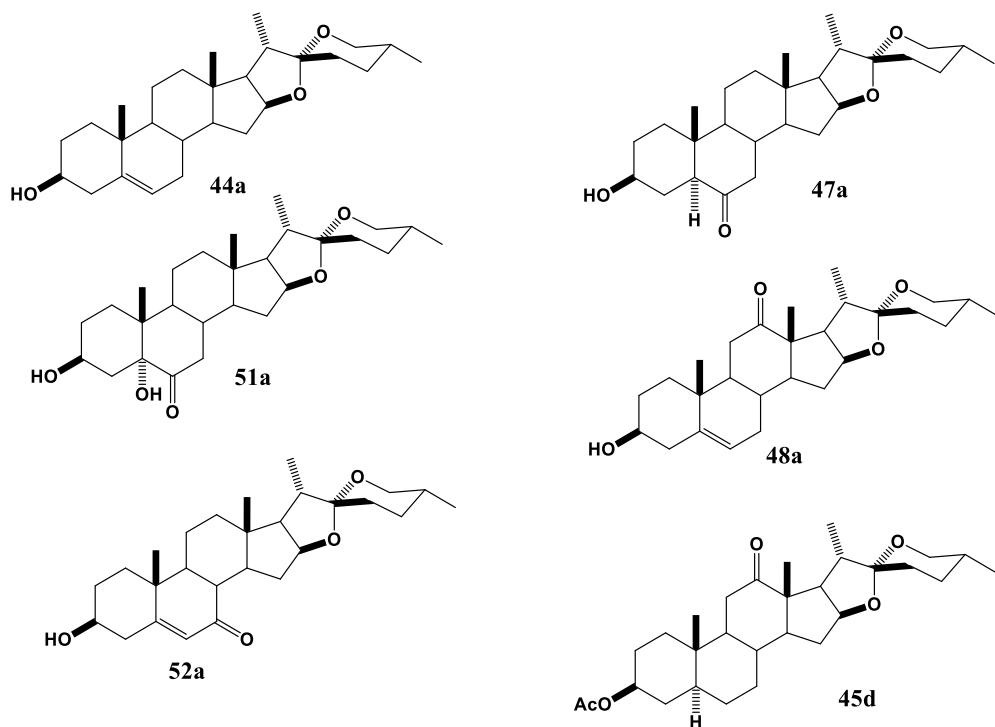
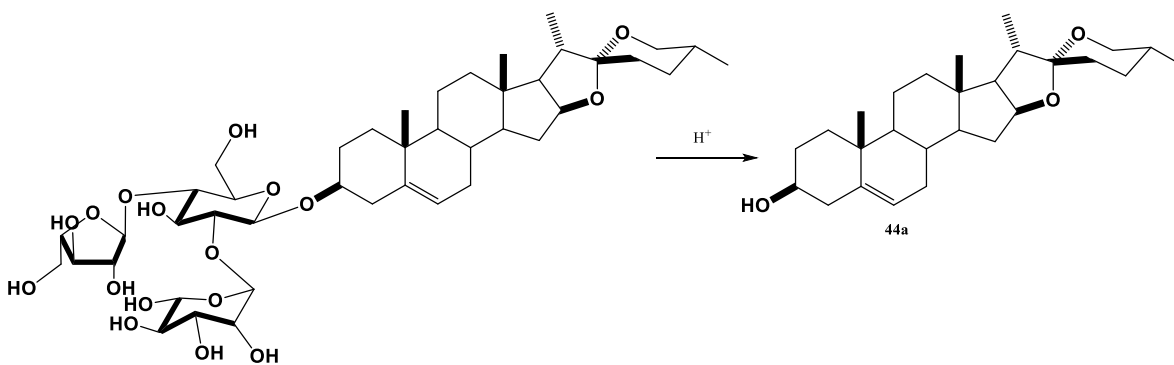


Figura 70. Derivados seleccionados para su síntesis.

6.5 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN

6.5.1 Diosgenina (44a).

La diosgenina (**44a**) fue obtenida mediante extracciones de barbasco (*dioscorea composita*), obteniendo primero una mezcla de saponinas como la dioscina, y posteriormente la diosgenina (**44a**) mediante una hidrólisis ácida química (esquema 13) así como procesos de purificación (separación por cromatografía) [131]



Esquema 13. Hidrólisis ácida de la dioscina para obtención de la diosgenina (**44a**).

Una vez obtenida la diosgenina pura se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) donde se localizaron las señales características de este compuesto, y se compararon con lo reportado en la bibliografía. [131] Al analizar el espectro (figura 71), puede observarse la señal más desplazada a frecuencias más altas (5.35 ppm) por parte del protón vinílico del carbono 6, siguiendo a menor frecuencia la señal del protón en posición 16. Por otra parte, las señales de los 2 protones en posición 26, entre 3.3 y 3.6 ppm. Se asignó la señal perteneciente al protón del carbono 7 para posterior comparación al obtener el compuesto 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (**52a**).

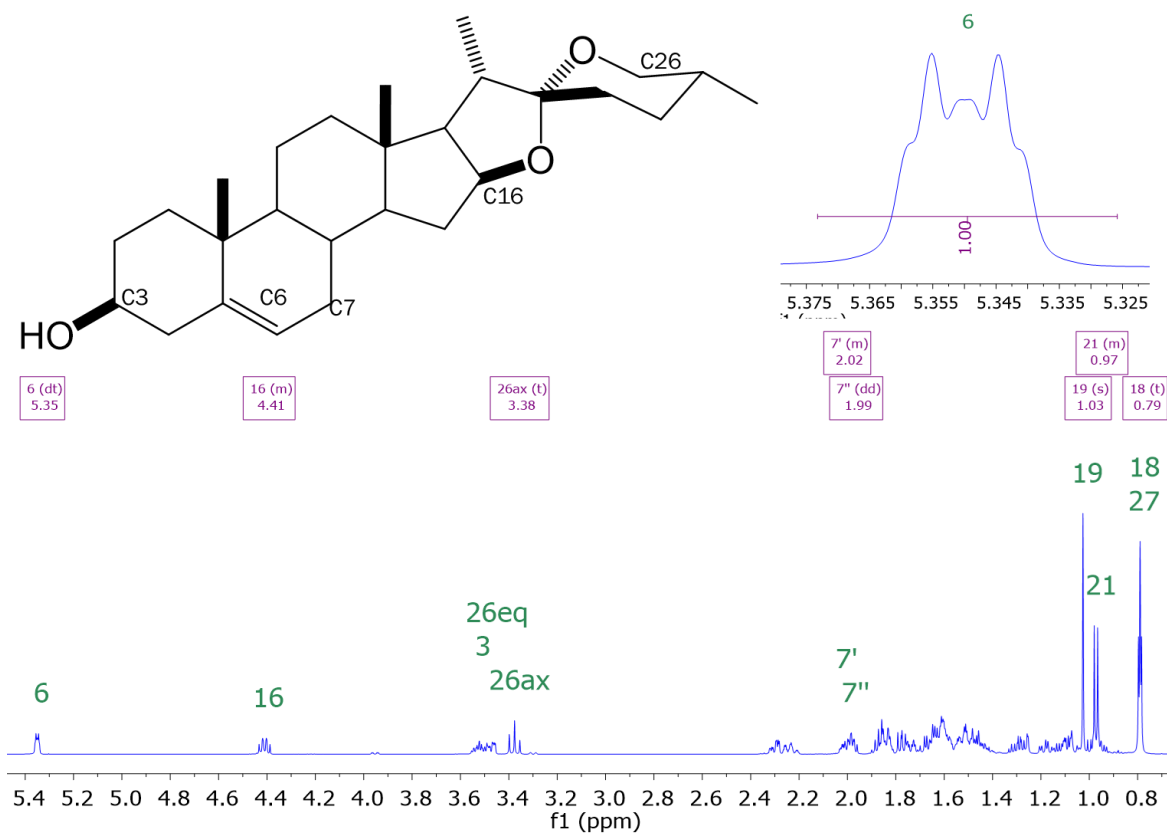


Figura 71. Espectro de ¹H de diosgenina (**44a**) pura a 500 MHz.

En el espectro de ¹³C (figura 72) se observa un desplazamiento a mayor frecuencia por parte del carbono vinílico 5 unido al carbono 10 y 4, siguiendo el otro carbono vinílico 6, siguiendo el carbono 22 unido a 2 grupos éter, lo que explica este desplazamiento, siguiendo 16 por tener de igual forma estar unido a un éter, posteriormente se encuentra 3 que presenta un hidroxilo, 26 (unido a otro éter).

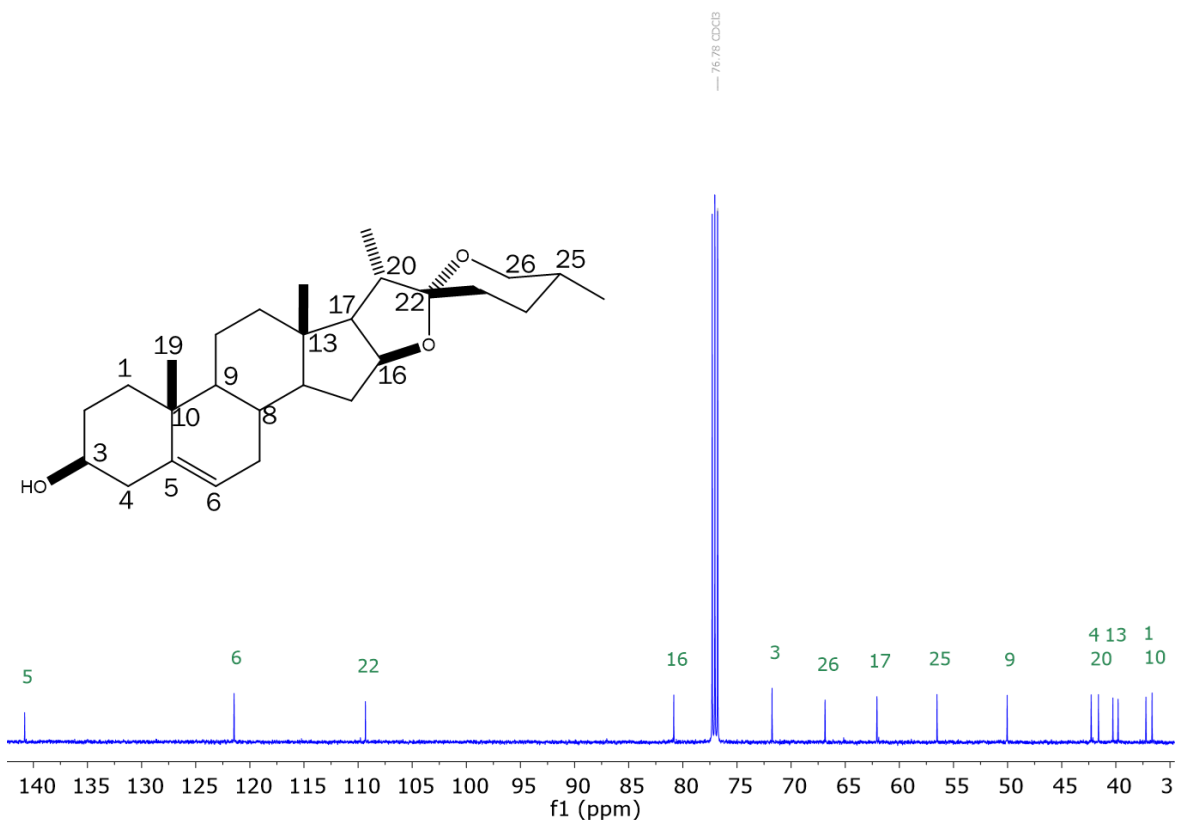


Figura 72. Espectro de ^{13}C de diosgenina.

6.5.2 Acetato de hecogenina (45d).

Para la obtención de este compuesto se partió de una mezcla comercial de acetato de hecogenina y se realizó una purificación mediante columna cromatográfica, para proceder a obtener su espectro de RMN, donde se buscaron las señales características de este compuesto y se compararon con lo reportado en la bibliografía. [131] En este espectro (figura 73) se observa que la señal a mayor frecuencia es la del hidrógeno en la posición 3 debido a la desprotección que confiere el grupo éster del acetato en el carbono 3, siguiendo la señal del protón en el carbono 16 por la presencia del éter, los hidrógenos ecuatorial y axial de la posición 26, por último, el desplazamiento de la señal del protón en 11 es debido a la presencia de la cetona en el carbono 12. El protón en la posición 17 se encuentra desplazado a una mayor frecuencia que los protones en la posición 11 por la cercanía al oxígeno unido al carbono 16, mientras el desplazamiento de los protones en la posición 11 es causada por el carbonilo 12.

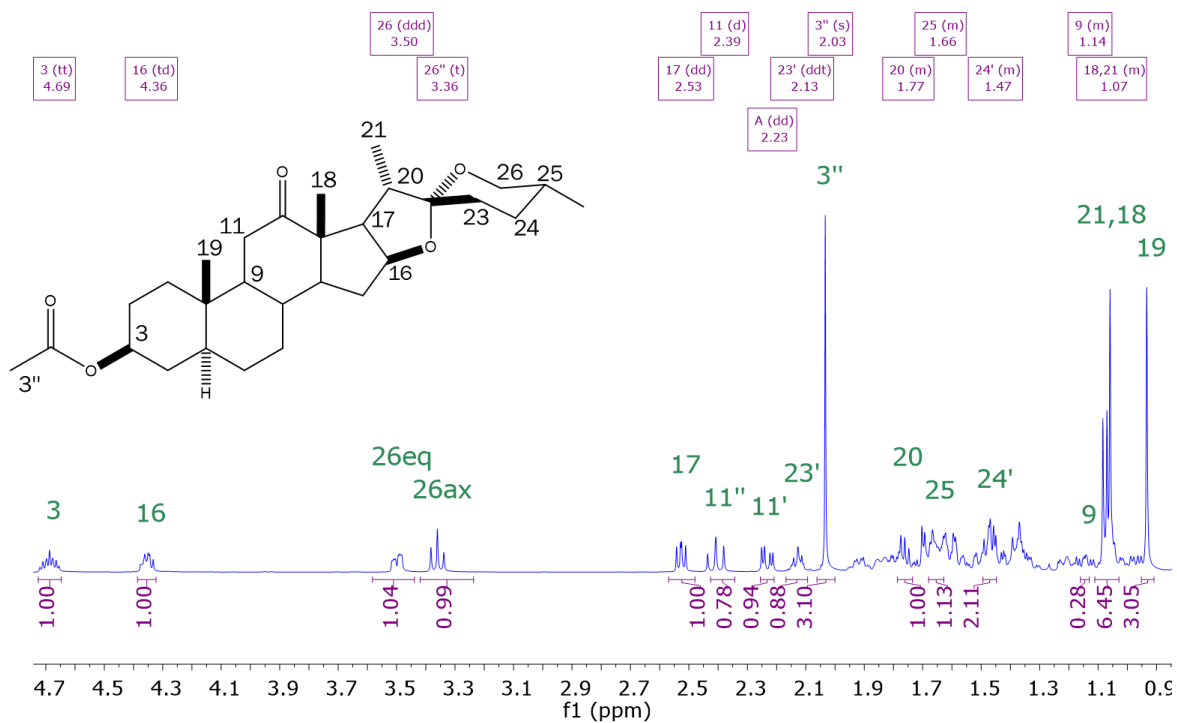


Figura 73. Espectro ¹H de acetato de hecogenina (45d).

Como se observa en la figura 74, el carbono con mayor desplazamiento es el carbonilo 12, siguiendo el carbonilo de éster del grupo acetilo en la posición 3, siguiendo el carbono 22 unido a 2 grupos éter, posteriormente los carbonos 16, 3 y 26 correspondientes que están unidos a 1 oxígeno, siguiendo los carbonos 13, 5 y 17, y por último los metilos 27, 18, 21 y 19.

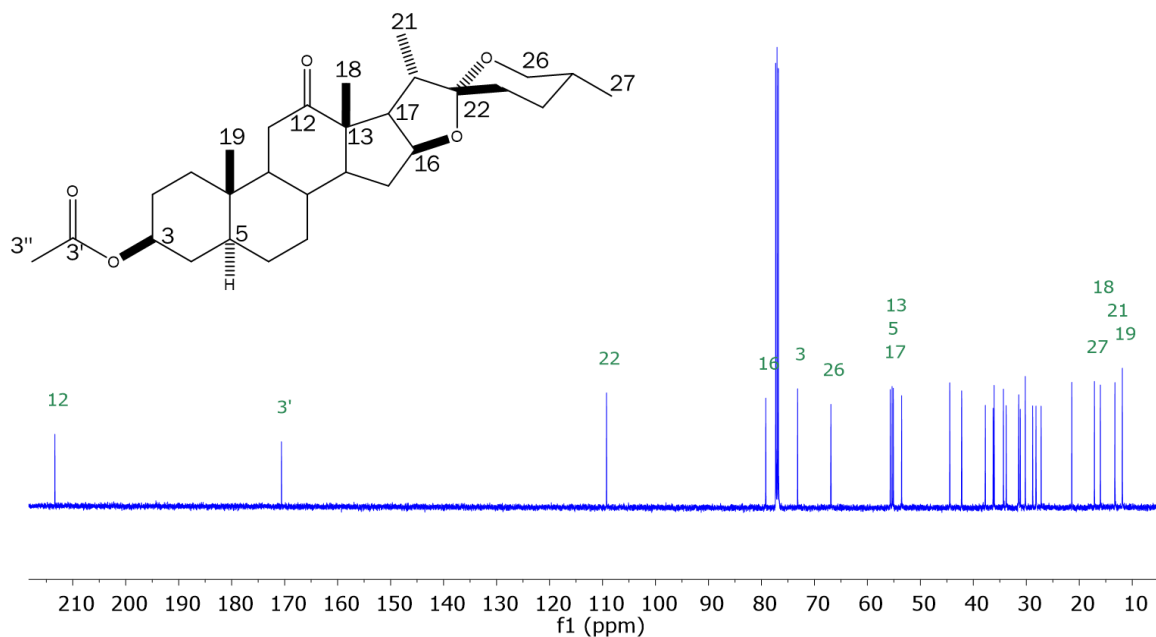
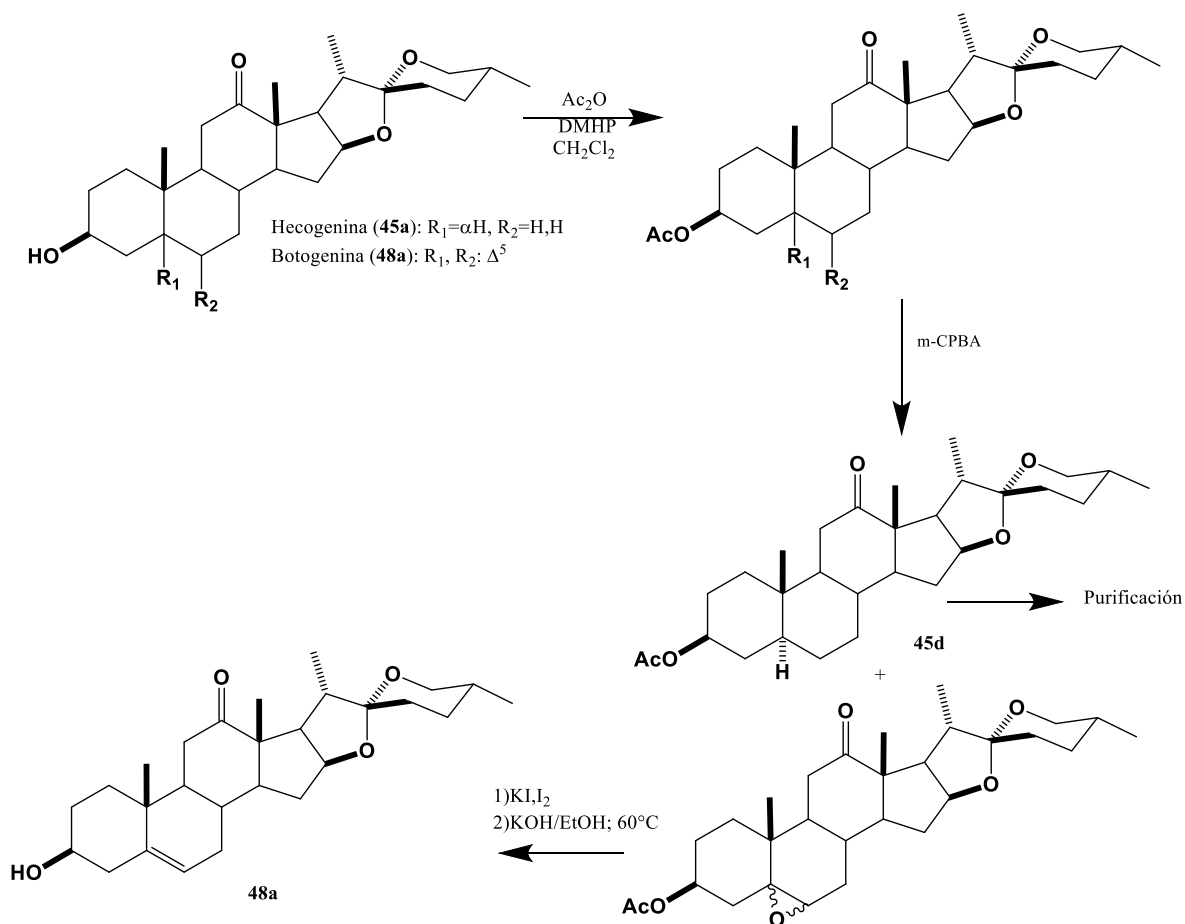


Figura 74. Espectro de ^{13}C de acetato de hecogenina (**45d**).

6.5.3 Botogenina (**48a**).

Para la obtención de la botogenina (**48a**) se partió de una mezcla de botogenina y hecogenina, los cuales no tienen una diferencia de polaridad suficiente para su separación directa en columna cromatográfica, por lo cual se realizó una derivatización (esquema 14) haciendo reaccionar el doble enlace de la botogenina en los carbonos 5 y 6 para generar un epóxido el cual aumenta la diferencia de polaridad, permitiendo su separación, y posteriormente mediante una hidrólisis básica se recupera este doble enlace, la ventaja de esta secuencia de reacciones es que nos permite obtener el acetato de hecogenina (**45d**) que fue seleccionado para síntesis, así como la botogenina (**48a**). Se obtuvo un rendimiento final del 35% de la botogenina **48a**.



Esquema 14. Derivatización de botogenina (48a) a partir de una mezcla de hecogenina (45a) y botogenina (48a).

En el caso del espectro de ^1H (figura 75) de botogenina (48a), se observa la señal del protón vinílico en 6 con un mayor desplazamiento debido a presentar una mayor desprotección, siguiendo los protones en el carbono 16 unidos al grupo éter, siguiendo el protón en el carbono 3 donde se tiene un hidroxilo, siguiendo los protones de 26 que a su vez están unidos a un grupo éter, posteriormente se tiene los protones de los carbonos 11 (vecino a un carbonilo), 4 y 7 (carbonos alílicos).

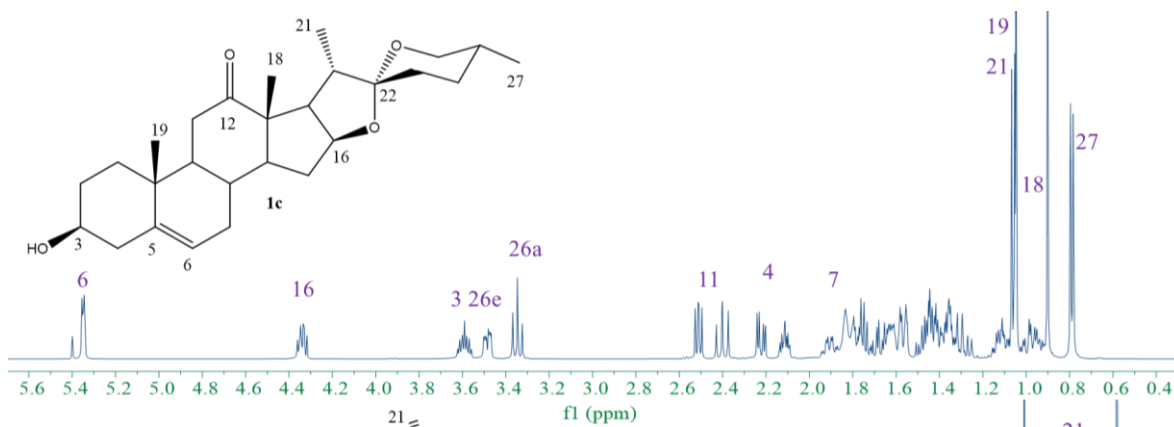
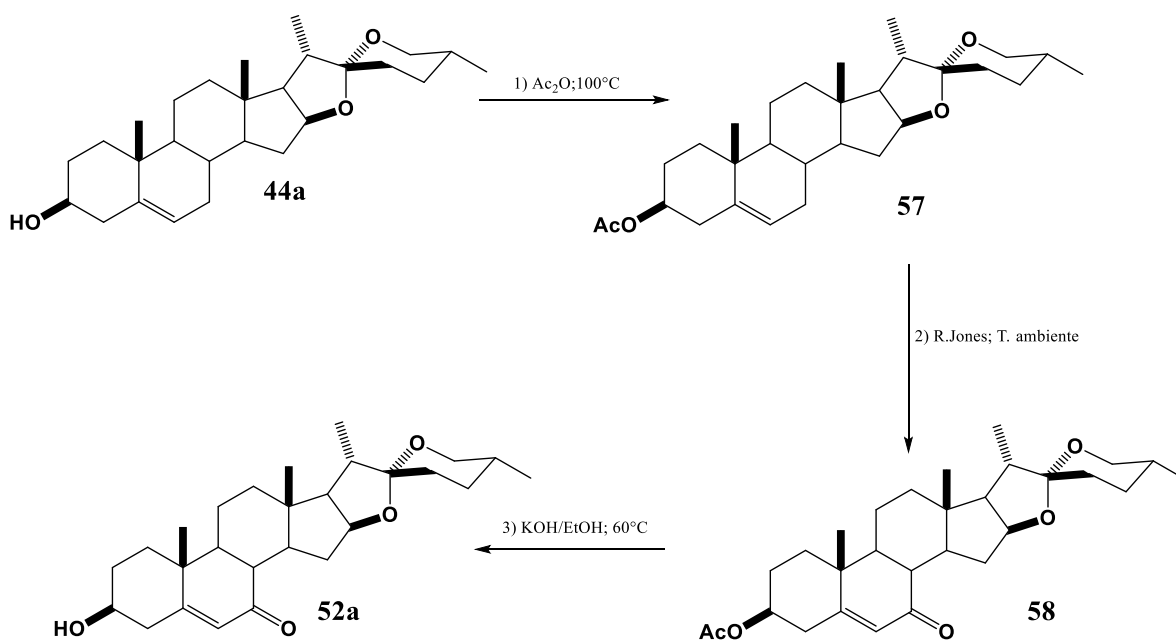


Figura 75. Espectro ^1H de botogenina.

6.5.4 3β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (52a).

Para la obtención del derivado 3β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (**52a**), este va a sintetizarse a partir de la diosgenina (esquema 15), como primera reacción se va a realizar una acetilación en la posición 3 para proteger el hidroxilo del acetato y así, posteriormente mediante el reactivo de Jones va a realizarse una oxidación en el carbono 7 obteniendo una cetona, y por último mediante una hidrólisis básica va a liberarse el acetato en el carbono 3 para obtener el derivado 3β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (**52a**).



Esquema 15. Síntesis del derivado 3β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (**52a**) a partir de diosgenina (**44a**).

Se obtuvieron los espectros de RMN de los compuestos **57**, **58** y **52a**. Una vez purificado el compuesto **57**, mediante RMN se comprobó la presencia de este compuesto, comparando las señales con lo reportado en la bibliografía (figura 76), se observa la señal del protón vinílico en la posición 6 con un mayor desplazamiento por contar con una mayor desprotección por el doble enlace, a lo cual le sigue la señal del protón en 3 debido a la desprotección otorgada por la presencia del acetato, siguiéndole la señal del carbono 16, así como los hidrógenos de la posición 26, estas 2 señales presentan este desplazamiento por la presencia de un éter vecino, de igual forma se localizaron las señales de los metilos 19 y 21, donde 19 presenta una señal simple por estar unido a un carbono cuaternario y 21 presenta una señal doble por tener como vecino a un carbono terciario. [131]

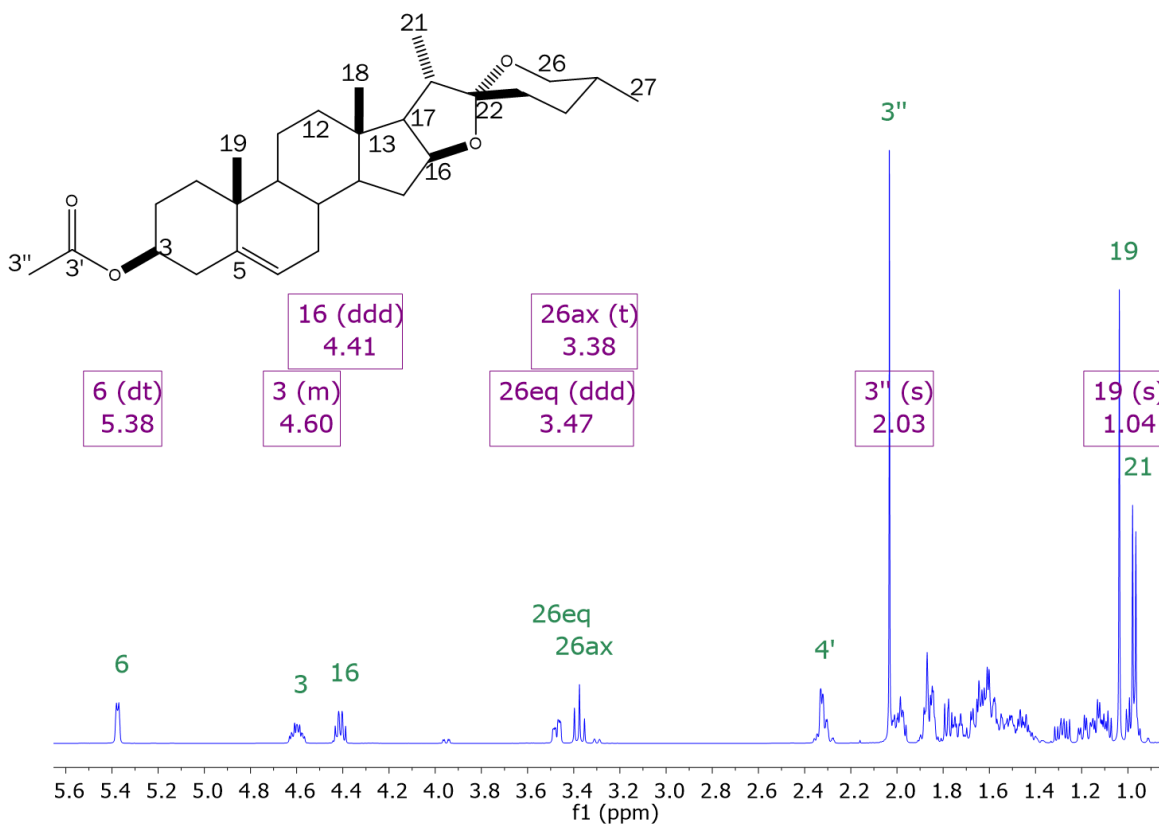


Figura 76. Espectro ¹H de acetato de diosgenina (**57**).

Cómo se observa en la figura 77, el carbono que presenta un mayor desplazamiento es el 3', que es el carbonilo del éster, siguiendo los carbonos vinílicos 5 y 6, posteriormente los carbonos 22 y 16 que están unidos a un grupo éter, encontrándose el 22 a mayores frecuencias debido a la presencia de 2 oxígenos vecinos, mientras que 16 sólo está unido a 1, a esto le siguen el carbono 3 (unido a un éster) y 26 (unido a un éter).

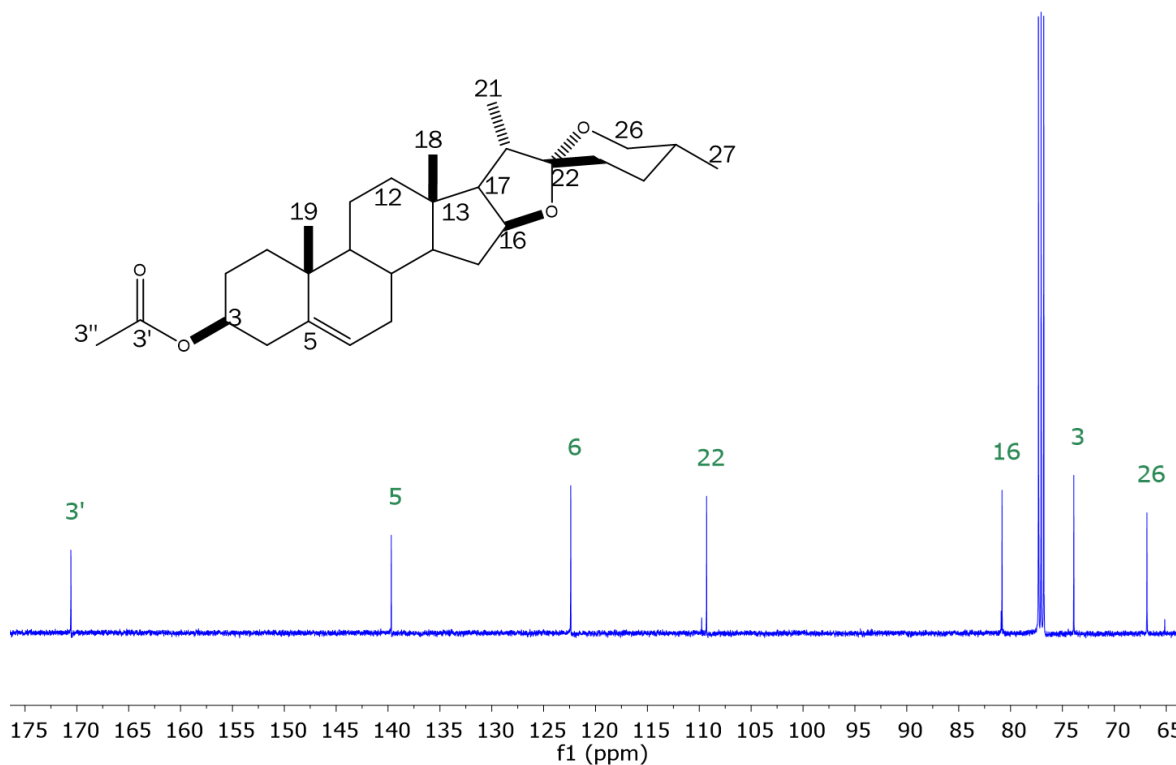


Figura 77. Espectro de ¹³C de acetato de diosgenina (57)

Por parte del compuesto **58** (figura 78), se observa a mayor frecuencia la señal la del protón vinílico en el carbono 6, si se compara con el acetato de diosgenina (**57**) esta señal presenta un desplazamiento a una mayor frecuencia (5.71 ppm en comparación a 5.38 ppm), esto debido a la presencia de una cetona α - β insaturada, otro cambio que se observó fue en el desplazamiento de las señales de los protones en la posición 4, donde se observa una mayor separación de los protones ecuatoriales y axiales, debido a la proximidad de la cetona en el carbono 7 lo que genera una mayor desprotección y por ende un desplazamiento a mayores frecuencias, por parte de las demás señales no se observó otro cambio de desplazamiento.

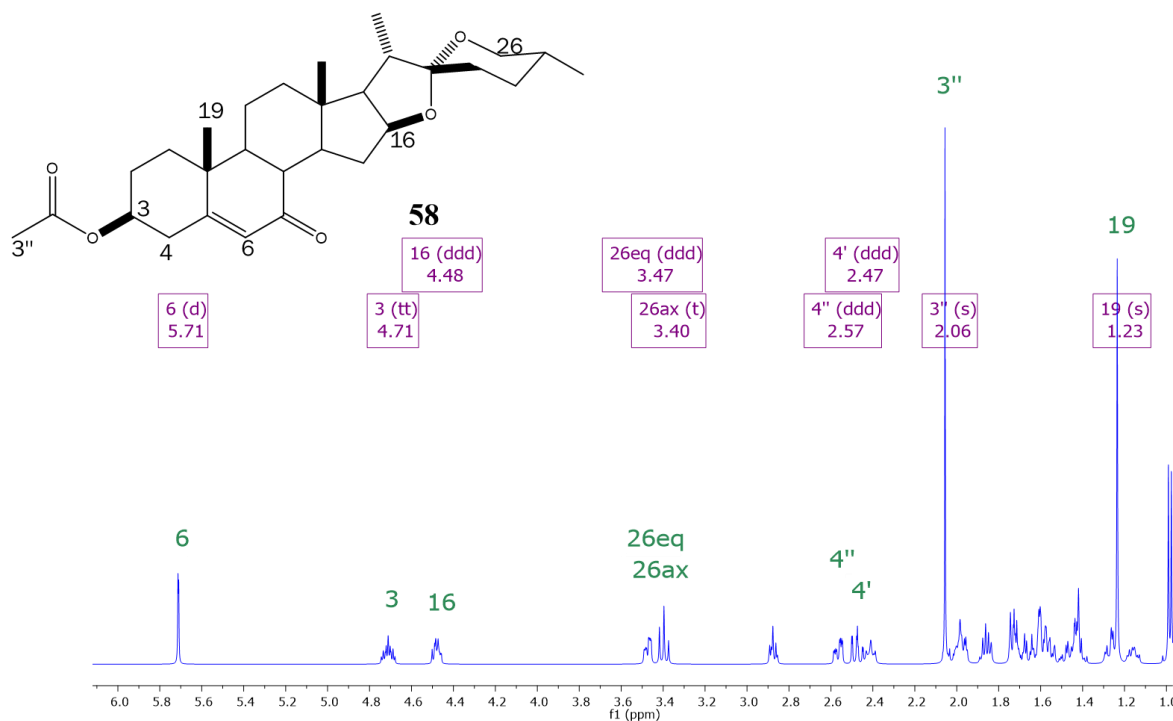


Figura 78. Espectro de ^1H de 3 β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (**58**).

En el espectro de ^{13}C (figura 79), la señal con mayor desplazamiento fue la del carbonilo en la posición 7, siguiendo el carbonilo del éster del acetilo en el carbono 3, siguiendo el carbono vinílico 5, al cual le sigue el carbono vinílico 6, posteriormente el carbono 22 que está unido a 2 éteres lo cual le confiere este desplazamiento a una mayor frecuencia, siguiendo el carbono 16 (1 éter vecino), 3 (grupo acetato vecino) y 26 (1 éter vecino), siguiendo este mismo principio de desprotección. [131]

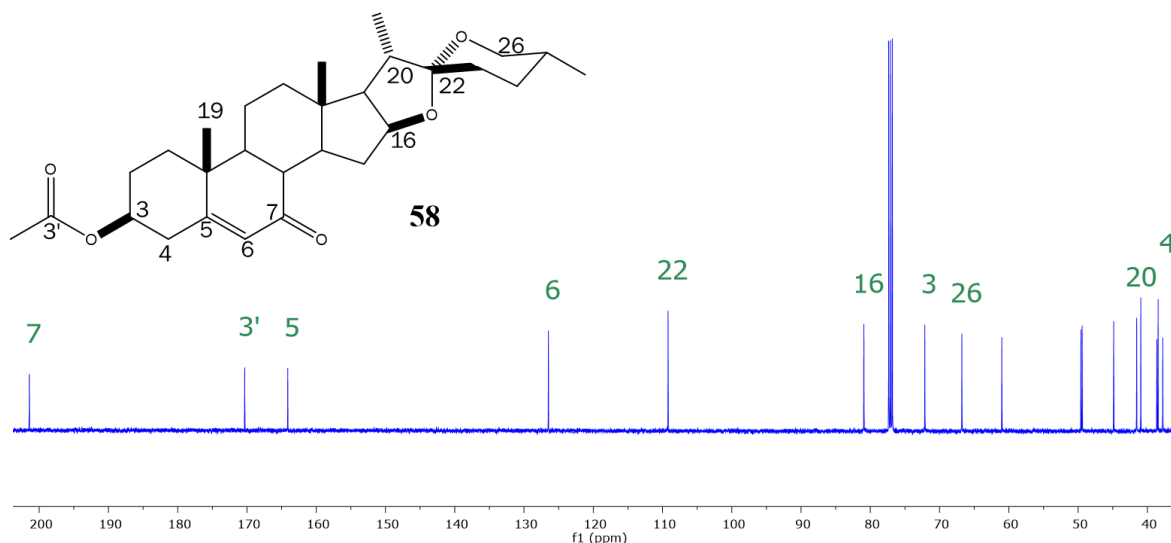


Figura 78. Espectro de ^{13}C de acetato de diosgenina (**57**).

Por último para el derivado **52a** (figura 80) se comparó el espectro de RMN con las señales de la diosgenina observando un cambio en la señal del protón vinílico en la posición 6, el cual presento un desplazamiento a mayores frecuencias de 0.28 ppm debido a la desprotección que confiere la cetona en el carbono 7 así como la presencia de un carbonilo con hibridación sp^2 como vecino, de igual forma se observa el cambio de una señal doble de triples a una señal simple debido a la desaparición de los hidrógenos del carbono 7 con los cuales acoplarse, a su vez se observa la perdida de la señal de los protones en la posición 7 al volverse este carbono cuaternario y no tener estos mismos hidrógenos.

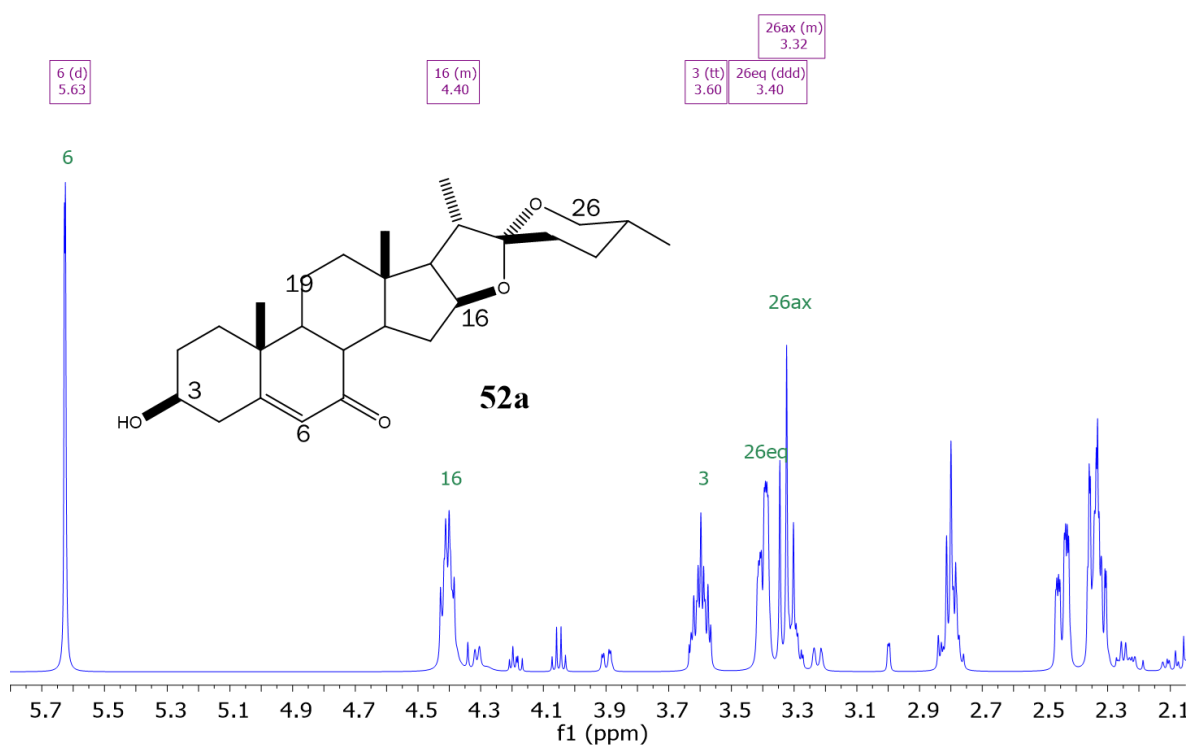


Figura 79. Espectro de ^1H del 3β -hidroxiespirost-5-en-7-ona (**52a**)

Como se observa en la figura 81, para el derivado **52a**, el carbono con mayor desplazamiento fue el carbonilo de la cetona α,β -insaturada en la posición 7, esto debido a la deslocalización de electrones π , donde la deslocalización va a ser favorecida hacia la cetona, generando una mayor desprotección, posteriormente se tiene el carbono vinílico 5 y 6, donde el 5 se presenta a mayor frecuencia debido al mismo fenómeno de deslocalización presentando un mayor carácter electrofílico, contrario al 6 que se encuentra a menores frecuencia, el carbono 22 y

16 están unidos a un éter, mientras que 3 está unido a un hidroxilo, y por último se tienen los carbonos 17, 9 y 14.

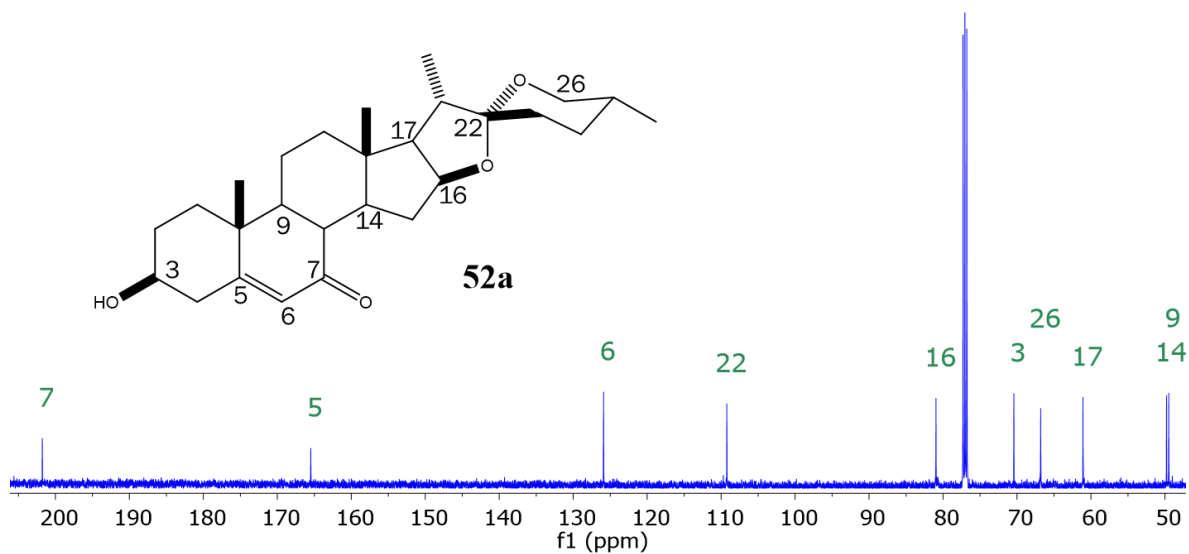


Figura 80. Espectro de ¹³C del derivado 3β-hidroxiestrost-5-en-7-ona (52a).

7 Conclusiones

Mediante el uso de docking molecular y analizando las energías de activación de 99 derivados hidroxiimínicos y cetónicos de estructuras espiroestánicas y 22-oxocolestánicas, se encontraron posibles inhibidores específicos y no específicos de enzimas asociadas a la esteroidogénesis (tabla 36), donde aquellos con inhibición no específica, podrían por esta interacción, presentar posibles efectos secundarios.

Tabla 36. Compuestos con posible actividad inhibitoria.

Molécula	Enzima(s) inhibida(s)
44a, 44b, 44c, 44d, 44e, 44f, 44g, 47b, 47c, 47d, 47g, 47h, 47j, 51b, 51e, 51f, 51g, 51h, 51j, 51k, 51n, 52b, 52e, 52g, 52i, 52j, 52m, 48a, 48g, 45d, 45e, 45g	CYP11A1
51i, 48c	17 β -HSD
50a, 50b, 50c, 50e, 50f, 50g, 50h, 53a, 53b, 53e, 53g, 53h, 54b, 54e, 54f, 54g, 55a, 55c, 56a, 56b, 56c	5 α -reductasa
52k	CYP11A1/CYP17A1
47e, 47f, 47i, 47l, 47m, 47n, 51l, 51m, 52c, 52d, 52f, 52h, 52l, 48b, 48e, 48f, 45b, 45c, 45f	CYP11A1/17 β -HSD
47a, 47k, 47n, 51a, 52a	CYP11A1/5 α -reductasa
47n, 52h, 45a	CYP11A1/5 α -reductasa/17 β -HSD

Analizando estos resultados, se seleccionaron 4 compuestos de 99 (figura 82) evaluados con potencial actividad moduladora de la esteroidogénesis. De estos 4 compuestos, la diosgenina (**44a**) fue obtenida mediante extracciones de *dioscorea composita* y una posterior de hidrólisis ácida, para el acetato de hecogenina (**45d**) y botogenina (**48a**), estas fueron obtenidos a través de un proceso de derivatización, por último, el cuarto compuesto fue sintetizado a partir de diosgenina.

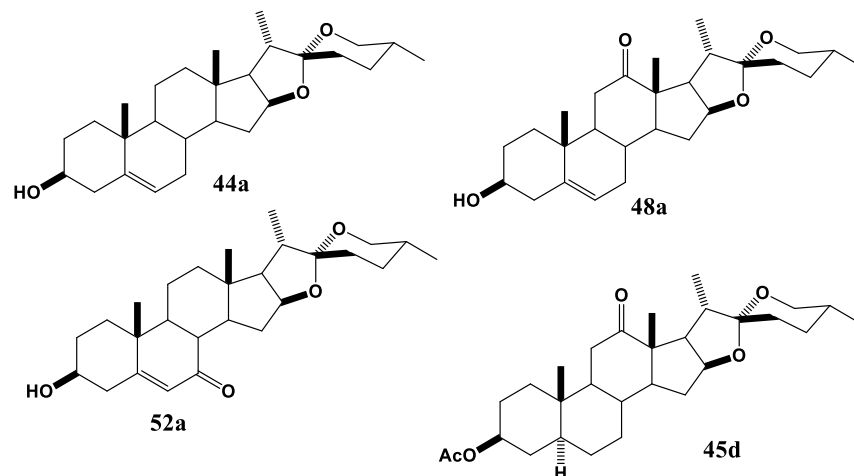


Figura 81. Compuestos aislados, sintetizados y caracterizados.

Con los crecientes costos del desarrollo de fármacos, así como la gran cantidad de medicamentos a la venta con efectos secundarios por interacción cruzada, el uso de estudios interaccionales in silico es una herramienta con una alta viabilidad y utilidad. Las modificaciones puntuales realizadas a estructuras espirostánicas y 22-oxocolestánicas en algunos casos modificaron la posible actividad biológica, esto debido al cambio de electronegatividad y por consiguiente las interacciones polares con las enzimas, así como los diferentes tamaños de estos grupos funcionales al generar un impedimento estérico con las mismas.

Con base en los resultados anteriores, de acuerdo a la hipótesis planteada, se encontró que algunos de los compuestos espirostánicos tienen un efecto inhibitorio sobre las enzimas de la esteroidogénesis, y por parte de los derivados 22-oxocolestánicos se encontró que contrario a lo que se planteó, algunos derivados analizados, presentan actividad inhibitoria hacia algunas de las enzimas de la esteroidogénesis.

8 Bibliografía

- [1] R. Ferraldeschi, N. Sharifi, R.J. Auchus, G. Attard, Molecular pathways: Inhibiting steroid biosynthesis in prostate cancer, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 3353–3359. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0931>.
- [2] R.A. Masamreh, T.A. Filippova, Y.I. Haurychenka, K.A. Sherbakov, A. V. Veselovsky, V. V. Shumyantseva, A. V. Kuzikov, The interactions of a number of steroid-metabolizing cytochromes P450 with abiraterone D4A metabolite: spectral analysis and molecular docking, *Steroids*. 162 (2020) 108693. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108693>.
- [3] H.L. Claahsen-van der Grinten, P.W. Speiser, S.F. Ahmed, W. Arlt, R.J. Auchus, H. Falhammar, C.E. Flück, L. Guasti, A. Huebner, B.B.M. Kortmann, N. Krone, D.P. Merke, W.L. Miller, A. Nordenström, N. Reisch, D.E. Sandberg, N.M.M.L. Stikkelbroeck, P. Touraine, A. Utari, S.A. Wudy, P.C. White, Congenital Adrenal Hyperplasia—Current Insights in Pathophysiology, Diagnostics, and Management, *Endocr. Rev.* 43 (2022) 91–159. <https://doi.org/10.1210/edrv/bnab016>.
- [4] D. Porubek, CYP17A1: A Biochemistry, Chemistry, and Clinical Review, *Curr. Top. Med. Chem.* 13 (2013) 1364–1384. <https://doi.org/10.2174/1568026611313120002>.
- [5] A.W. Norman, H.L. Henry, *Hormones: Third Edition*, 2014. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02025-X>.
- [6] S. Ekins, Predicting undesirable drug interactions with promiscuous proteins in silico, *Drug Discov. Today*. 9 (2004) 276–285. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)03008-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)03008-3).
- [7] J.F. Westphal, Macrolide - Induced clinically relevant drug interactions with cytochrome P-450A (CYP) 3A4: An update focused on clarithromycin, azithromycin and dirithromycin, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 50 (2000) 285–295. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2000.00261.x>.
- [8] F.K. Yoshimoto, R.J. Auchus, The diverse chemistry of cytochrome P450 17A1 (P450c17, CYP17A1), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 151 (2015) 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.026>.
- [9] L. Giampietro, M. Gallorini, N. Gambacorta, A. Ammazalorso, B. De Filippis, A. Della Valle, M. Fantacuzzi, C. Maccallini, A. Mollica, A. Cataldi, O. Nicolotti, R. Amoroso, Synthesis, structure-activity relationships and molecular docking studies of phenyldiazenyl sulfonamides as aromatase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 224 (2021) 113737. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113737>.
- [10] A. Spinello, I. Ritacco, A. Magistrato, The catalytic mechanism of steroidogenic cytochromes P450 from all-atom simulations: Entwinement with membrane environment, redox partners, and post-transcriptional regulation, *Catalysts*. 9 (2019) 1–22. <https://doi.org/10.3390/catal9010081>.
- [11] Y.C. Lin, G. Cheung, E. Porter, V. Papadopoulos, The neurosteroid pregnenolone is synthesized by a mitochondrial P450 enzyme other than CYP11A1 in human glial cells, *J. Biol. Chem.* 298 (2022) 102110. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102110>.
- [12] P. Anagnostis, N. Katsiki, F. Adamidou, V.G. Athyros, 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors: novel agents for the treatment of metabolic syndrome and obesity-related disorders?, *Metabolism*. 62 (2013) 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.05.002>.
- [13] A. Kauschansky, M. Shohat, M. Frydman, A. Rösler, E. Greenbaum, L. Sirota, Syndrome of alopecia totalis and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency, *Am. J. Med. Genet.* 76 (1998) 28–31. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19980226\)76:1<28::AID-AJMG4>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19980226)76:1<28::AID-AJMG4>3.0.CO;2-L).
- [14] J.J. Ajduković, E.A. Djurendić, E.T. Petri, O.R. Klisurić, A.S. Čelić, M.N. Sakač, D.S. Jakimov, K.M.P. Gaši, 17(E)-Picolinylidene androstane derivatives as potential inhibitors of prostate cancer cell growth: Antiproliferative activity and molecular docking studies, *Bioorganic Med. Chem.* 21 (2013) 7257–7266. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.063>.
- [15] T. Komoda, T. Matsunaga, *Biochemistry for Medical Professionals*, 2015. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-01063-5>.
- [16] P. Concolino, A. Costella, Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-Hydroxylase Deficiency: A Comprehensive Focus on 233 Pathogenic Variants of CYP21A2 Gene, *Mol. Diagnosis Ther.* 22 (2018) 261–280. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0319-y>.
- [17] F. Azzouni, A. Godoy, Y. Li, J. Mohler, The 5 alpha-reductase isozyme family: A review of basic biology and their role in human diseases, *Adv. Urol.* 2012 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/530121>.
- [18] S. Diederich, C. Grossmann, B. Hanke, M. Quinkler, M. Herrmann, V. Bähr, W. Oelkers, In the search for specific inhibitors of human 11β-hydroxysteroid- dehydrogenases (11β-HSDs): Chenodeoxycholic acid selectively inhibits 11β- HSD-I, *Eur. J. Endocrinol.* 142 (2000) 200–207. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1420200>.
- [19] Y. Asemani, N. Zamani, M. Bayat, Z. Amirghofran, Allium vegetables for possible future of cancer treatment, *Phyther. Res.* 33 (2019) 3019–3039. <https://doi.org/10.1002/ptr.6490>.
- [20] S. Pham, S. Deb, D.S. Ming, H. Adomat, E. Hosseini-Beheshti, A. Zoubeydi, M. Gleave, E.S.T. Guns, Next-generation steroidogenesis inhibitors, dutasteride and abiraterone, attenuate but still do not eliminate androgen biosynthesis in 22RV1 cells in vitro, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144 (2014) 436–444. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.09.004>.
- [21] G. Verma, M.F. Khan, W. Akhtar, M.M. Alam, M. Akhter, M. Shaquiquzzaman, Molecular interactions of bisphenols and analogs with glucocorticoid biosynthetic pathway enzymes: an in silico approach, *Toxicol. Mech.*

- Methods. 28 (2018) 45–54. <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1356415>.
- [22] F. Stanzione, I. Giangreco, J.C. Cole, Use of molecular docking computational tools in drug discovery, 1st ed., Elsevier B.V., 2021. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>.
- [23] B.K. Shoichet, S.L. McGovern, B. Wei, J.J. Irwin, Lead discovery using molecular docking, (2002) 439–446.
- [24] C. Fehl, C.D. Vogt, R. Yadav, K. Li, E.E. Scott, J. Aubé, Structure-Based Design of Inhibitors with Improved Selectivity for Steroidogenic Cytochrome P450 17A1 over Cytochrome P450 21A2, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 4946–4960. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00419>.
- [25] N.J. Gumede, W. Nxumalo, K. Bisetty, L. Escuder Gilabert, M.J. Medina-Hernandez, S. Sagrado, Prospective computational design and in vitro bio-analytical tests of new chemical entities as potential selective CYP17A1 lyase inhibitors, *Bioorg. Chem.* 94 (2020) 103462. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103462>.
- [26] A.W. Norman, G. Litwack, *Steroid Hormones: Chemistry, Biosynthesis, and Metabolism*, Hormones. (1997) 49–86. <https://doi.org/10.1016/b978-012521441-4/50003-1>.
- [27] M. Rodríguez-Sanz, N. García-Giralt, D. Prieto-Alhambra, S. Servitja, S. Balcells, R. Pecorelli, A. Díez-Pérez, D. Grinberg, I. Tusquets, X. Nogues, CYP11A1 expression in bone is associated with aromatase inhibitor-related bone loss, *J. Mol. Endocrinol.* 55 (2015) 69–79. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0079>.
- [28] C. Wang, P.S. Pallan, W. Zhang, L. Lei, F.K. Yoshimoto, M.R. Waterman, M. Egli, F.P. Guengerich, Functional analysis of human cytochrome P450 21A2 variants involved in congenital adrenal hyperplasia, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 10767–10778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.792465>.
- [29] E.M. Petrunak, N.M. DeVore, P.R. Porubsky, E.E. Scott, Structures of human steroidogenic cytochrome P450 17A1 with substrates, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 32952–32964. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.610998>.
- [30] N. Strushkevich, F. MacKenzie, T. Cherkesova, I. Grabovec, S. Usanov, H.W. Park, Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 10139–10143. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019441108>.
- [31] N. Mast, A.J. Annalora, D.T. Lodowski, K. Palczewski, C.D. Stout, I.A. Pikuleva, Structural Basis for Three-step Sequential Catalysis by the Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme CYP11A1. *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 5607–5613. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.188433>.
- [32] E.M. Petrunak, S.A. Rogers, E.E. Scott, Structural and Functional Evaluation of Clinically- Relevant Inhibitors of Steroidogenic Cytochrome, 1 (2017). <https://doi.org/10.1124/dmd.117.075317>.
- [33] N.M. Devore, E.E. Scott, Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001, *Nature.* 482 (2012) 116–119. <https://doi.org/10.1038/nature10743>.
- [34] A.S. Park-basovizza, Insights into subtle conformational differences in the substrate-binding loop of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: a combined structural and, 160 (2012) 151–160. <https://doi.org/10.1042/BJ20110567>.
- [35] J. Benach, C. Filling, U.C.T. Oppermann, P. Roversi, K.D. Berndt, H. Jo, R. Ladenstein, Articles Structure of Bacterial 3 / 17 -Hydroxysteroid Dehydrogenase at 1 . 2 Å Resolution : A Model for Multiple Steroid Recognition, (2002) 14659–14668.
- [36] M. Mazumdar, D. Fournier, D. Zhu, C. Cadot, D. Poirier, S. Lin, Binary and ternary crystal structure analyses of a novel inhibitor with 17 β -HSD type 1: a lead compound for breast cancer therapy, 366 (2009) 357–366. <https://doi.org/10.1042/BJ20091020>.
- [37] C.-C.-S. Discrimination, E. Strain, Q. Han, R.L. Campbell, A. Gangloff, Y. Huang, S. Lin, Dehydroepiandrosterone and Dihydrotestosterone Recognition by Human Estrogenic 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, 275 (2000) 1105–1111.
- [38] C. Mazza, R. Breton, D. Housset, J.C. Fontecilla-camps, Unusual Charge Stabilization of NADP + in 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase, 273 (1998) 8145–8152.
- [39] A. Cassetta, J. Stojan, I. Krastanova, K. Kristan, M.B. Šveglj, D. Lamba, T.L. Rižner, Structural basis for inhibition of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases by phytoestrogens: The case of fungal 17 β -HSDcl, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.02.020>.
- [40] D.E.G. Hosh, Structure of the ternary complex of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with 3-hydroxyestra-1 , 3 , 5 , 7-tetraen-17-one (equilin) and NADP +, 96 (1999) 840–845.
- [41] D.G. I, V.Z. Pletnev, Z. Wawrzak, W.L. Duax, W. Pangborn, F. Labrie, S. Lin, Structure of human estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase at 2 . 20 Å resolution, (2013).
- [42] Q. Xiao, L. Wang, H. Fan, Structure of human steroid 5 α -reductase 2 with anti- androgen drug nasteride, (n.d.).
- [43] Y. Han, Q. Zhuang, B. Sun, W. Lv, S. Wang, Q. Xiao, B. Pang, Y. Zhou, F. Wang, P. Chi, Q. Wang, Z. Li, L. Zhu, F. Li, D. Deng, Y. Chiang, Z. Li, R. Ren, Crystal structure of steroid reductase SRD5A reveals conserved steroid reduction mechanism, *Nat. Commun.* (2021) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20675-2>.
- [44] P.S. Pallan, C. Wang, L. Lei, F.K. Yoshimoto, R.J. Auchus, M.R. Waterman, F.P. Guengerich, M. Egli, Human cytochrome P450 21A2, the major steroid 21-hydroxylase: Structure of the enzyme•progesterone substrate complex and rate-limiting C-H bond cleavage, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 13128–13143. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.646307>.
- [45] L.D. Julian, Z. Wang, T. Bostick, S. Caille, R. Choi, M. Degraffenreid, Y. Di, X. He, R.W. Hungate, J.C. Jaen, J. Liu, M. Monshouwer, D. Mcminn, Y. Rew, A. Sudom, D. Sun, H. Tu, S. Ursu, N. Walker, X. Yan, Q. Ye, J.P. Powers, Discovery of Novel , Potent Benzamide Inhibitors of 11 -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (11 -

- HSD1) Exhibiting Oral Activity in an Enzyme Inhibition ex Vivo Model 3, 1 (2008) 3953–3960.
- [46] D. Sun, Z. Wang, Y. Di, J.C. Jaen, M. Labelle, J. Ma, S. Miao, A. Sudom, L. Tang, C.S. Tomooka, H. Tu, S. Ursu, N. Walker, X. Yan, Q. Ye, J.P. Powers, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Discovery and Initial SAR of Arylsulfonylpiperazine Inhibitors of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (11 β -HSD1), 18 (2008) 3513–3516. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.025>.
- [47] L. Johansson, C. Fotsch, M.D. Bartberger, V.M. Castro, M. Chen, M. Emery, S. Gustafsson, C. Hale, D. Hickman, E. Homan, S.R. Jordan, R. Komorowski, A. Li, K. Mcrae, G. Moniz, G. Matsumoto, C. Orihuela, G. Palm, M. Veniant, M. Wang, 2-Amino-1 , 3-thiazol-4 (5 H) -ones as Potent and Selective 11 -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibitors: Enzyme - Ligand Co-Crystal Structure and Demonstration of Pharmacodynamic Effects in C57Bl / 6 Mice, 4 (2008) 2933–2943.
- [48] H. Tu, J.P. Powers, J. Liu, S. Ursu, A. Sudom, X. Yan, H. Xu, D. Meininger, M. Degraffenreid, X. He, J.C. Jaen, D. Sun, M. Labelle, H. Yamamoto, B. Shan, N.P.C. Walker, Z. Wang, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* Distinctive molecular inhibition mechanisms for selective inhibitors of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 16 (2008) 8922–8931. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.08.065>.
- [49] J. Li, L.J. Kennedy, S.J. Walker, H. Wang, J.J. Li, Z. Hong, P. Stephen, O. Connor, X. Ye, S.Y. Chen, S. Wu, D.S. Yoon, A. Nayeem, M. Daniel, V. Ramamurthy, P.E. Morin, S. Sheriff, M. Wang, T.M. Harper, R. Golla, R. Seethala, T.W. Harrity, R.P. Ponticciello, N.N. Morgan, J.R. Taylor, R. Zebo, B.D. Maxwell, F. Moulin, D.A. Gordon, J.A. Robl, Discovery of Clinical Candidate BMS-823778 as an Inhibitor of Human 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (11 β -HSD-1), 1 (2018). <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00307>.
- [50] J. Li, L.J. Kennedy, H. Wang, J.J. Li, S.J. Walker, Z. Hong, S.P.O. Connor, A. Nayeem, D.M. Camac, P.E. Morin, S. Sheri, M. Wang, T. Harper, R. Golla, R. Seethala, R.P. Ponticciello, N.N. Morgan, J.R. Taylor, R. Zebo, D.A. Gordon, A. Robl, Optimization of 1,2,4-Triazolopyridines as Inhibitors of Human 11 beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (11 beta-HSD-1), *ACS Med. Chem. Lett.* 5 (2014) 803–808. <https://doi.org/10.1021/ml500144h>.
- [51] D. Ghosh, J. Lo, D. Morton, D. Valette, J. Xi, J. Griswold, S. Hubbell, C. Egbuta, W. Jiang, J. An, H.M.L. Davies, Novel aromatase inhibitors by structure-guided design, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 8464–8476. <https://doi.org/10.1021/jm300930n>.
- [52] D. Ghosh, J. Griswold, M. Erman, W. Pangborn, Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase, *Nature.* 457 (2009) 219–223. <https://doi.org/10.1038/nature07614>.
- [53] J. Lo, G. Di Nardo, J. Griswold, W. Jiang, G. Gilardi, D. Ghosh, Structural Basis for the Functional Roles of Critical Residues in Human Cytochrome P450 Aromatase, (2013). <https://doi.org/10.1021/bi400669h>.
- [54] D. Ghosh, C. Egbuta, J. Lo, Testosterone complex and non-steroidal ligands of human aromatase, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 181 (2018) 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.02.009>.
- [55] K. Mukai, H. Sugimoto, K. Kamiya, R. Suzuki, Current Research in Structural Biology Spatially restricted substrate-binding site of cortisol-synthesizing CYP11B1 limits multiple hydroxylations and hinders aldosterone synthesis, *Curr. Res. Struct. Biol.* 3 (2021) 192–205. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2021.08.001>.
- [56] C. Characterization, Structure of human cortisol-producing cytochrome P450 11B1 bound to the breast cancer drug fadrozole provides insights for drug design, (2018). <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006214>.
- [57] N. Strushkevich, A.A. Gilep, L. Shen, C.H. Arrowsmith, A.M. Edwards, S.A. Usanov, H. Park, Structural Insights into Aldosterone Synthase Substrate Specificity and Targeted Inhibition, 27 (2013) 315–324. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1287>.
- [58] S. Brixius-anderko, E.E. Scott, Aldosterone Synthase Structure With Cushing Disease Drug LCI699 Highlights Avenues for Selective CYP11B Drug Design, (2021) 751–759. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17615>.
- [59] R.E. Martin, J.D. Aebi, B. Hornsperger, H. Krebs, B. Kuhn, A. Kuglstatler, A.M. Alker, H. Peter, S. Mu, D. Burger, G. Ottaviani, W. Riboulet, P. Verry, X. Tan, K. Amrein, A. V Mayweg, Discovery of 4-Aryl-5,6,7,8-tetrahydroisoquinolines as Potent, Selective, and Orally Active Aldosterone Synthase (CYP11B2) Inhibitors: In Vivo Evaluation in Rodents and Cynomolgus Monkeys, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 8054–8065. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00851>.
- [60] Y. Liu, J. Wu, M. Zhou, W. Chen, D. Li, Z. Wang, B. Hornsperger, J.D. Aebi, H. Märki, B. Kuhn, L. Wang, A. Kuglstatler, J. Benz, S. Müller, R. Hochstrasser, G. Ottaviani, J. Xin, S. Kirchner, S. Mohr, P. Verry, W. Riboulet, H.C. Shen, A. V Mayweg, K. Amrein, X. Tan, Discovery of 3-Pyridyl Isoindolin-1-one Derivatives as Potent , Selective and Orally Active Aldosterone Synthase (CYP11B2) Inhibitors, (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00233>.
- [61] N. Phosrithong, Æ.J. Ungwitayatorn, Molecular docking study on anticancer activity of plant-derived natural products, *Med. Chem. (Los. Angeles).* 19 (2010) 817–835. <https://doi.org/10.1007/s00044-009-9233-5>.
- [62] C. Gröschel, S. Tennakoon, E. Kállay, Cytochrome P450 Vitamin D Hydroxylases in Inflammation and Cancer, *Adv. Pharmacol.* 74 (2015) 413–458. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.03.002>.
- [63] K. Burns, N.A. Helsby, Cytochrome P450 in GtoPdb v.2021.2, IUPHAR/BPS Guid. to Pharmacol. CITE. 2021 (2021). <https://doi.org/10.2218/gtopdb/f242/2021.2>.
- [64] N. Mast, M. Linger, I.A. Pikuleva, Inhibition and stimulation of activity of purified recombinant CYP11A1 by therapeutic agents, *Mol. Cell. Endocrinol.* 371 (2013) 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.10.013>.

- [65] R. Oksala, K. Räsänen, M. Karimaa, R. Riikonen, M. Ramela, P. Vehmaan-Kreula, O. Simola, P. Rummakko, G. Wohlfahrt, M. Mustonen, CYP11A1 inhibition as a therapeutic approach for the treatment of castration resistant prostate cancer, *Ann. Oncol.* 29 (2018) viii292. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy284.044>.
- [66] A.A. Gilep, T.A. Sushko, S.A. Usanov, At the crossroads of steroid hormone biosynthesis: The role, substrate specificity and evolutionary development of CYP17, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1814 (2011) 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.021>.
- [67] M. Costa-Santos, C.E. Kater, R.J. Auchus, Two Prevalent CYP17 Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in 24 Brazilian Patients with 17-Hydroxylase Deficiency, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 49–60. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031021>.
- [68] B.K. Edwards, A. Noone, A.B. Mariotto, E.P. Simard, Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2010, Featuring Prevalence of Comorbidity and Impact on Survival Among Persons With Lung, Colorectal, Breast, or Prostate Cancer, (2014). <https://doi.org/10.1002/cncr.28509>.
- [69] A. Villavicencio, K. Bacallao, C. Avellaira, F. Gabler, A. Fuentes, M. Vega, Androgen and estrogen receptors and co-regulators levels in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia, *Gynecol. Oncol.* 103 (2006) 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.03.029>.
- [70] S. Crucitta, M. Del Re, F. Paolieri, F. Bloise, A. Sbrana, E. Sammarco, C. Mercinelli, F. Cucchiara, L. Fontanelli, L. Galli, R. Danesi, CYP17A1 polymorphism c.-362T>C predicts clinical outcome in metastatic castration-resistance prostate cancer patients treated with abiraterone, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 86 (2020) 527–533. <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04133-w>.
- [71] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2019, *CA. Cancer J. Clin.* 69 (2019) 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
- [72] T. Iguchi, S. Tamada, M. Kato, S. Yasuda, Y. Machida, T. Ohmachi, K. Ishii, H. Iwata, S. Yamamoto, T. Kanamaru, K. Morimoto, T. Hase, K. Tashiro, K. Harimoto, T. Deguchi, T. Adachi, K. Iwamoto, Y. Takegaki, T. Nakatani, Enzalutamide versus flutamide for castration-resistant prostate cancer after combined androgen blockade therapy with bicalutamide: the OCUU-CRPC study, *Int. J. Clin. Oncol.* 25 (2020) 486–494. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01554-3>.
- [73] L. Dong, R.C. Zieren, W. Xue, T.M. de Reijke, K.J. Pienta, Metastatic prostate cancer remains incurable, why?, *Asian J. Urol.* 6 (2019) 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2018.11.005>.
- [74] A. NaAllah, Y.O. Ayipo, D.I. Komolafe, S. Solihu, B. Bamidele, M.A. Alabi, A.A. Balogun, A.T. Abdulazeez, M.N. Mordi, Phytochemical screening and in silico pharmacological profiling of ethanolic extract of *Aframomum melegueta* for prostate carcinoma, *J. Appl. Pharm. Sci.* 11 (2021) 132–145. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.110715>.
- [75] R.M. Lunn, D.A. Bell, J.L. Mohler, J.A. Taylor, Prostate cancer risk and polymorphism in 17 hydroxylase (CYP17) and steroid reductase (SRD5A2), *Carcinogenesis.* 20 (1999) 1727–1731. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.9.1727>.
- [76] M. Kirby, C. Hirst, E.D. Crawford, Characterising the castration-resistant prostate cancer population: A systematic review, *Int. J. Clin. Pract.* 65 (2011) 1180–1192. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2011.02799.x>.
- [77] C.S. Higano, E.D. Crawford, New and emerging agents for the treatment of castration-resistant prostate cancer, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 29 (2011) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.08.013>.
- [78] E. Therapeutics, 4-PREGNENE-3-ONE-20 β -CARBOXALDEHYDE: A POTENT INHIBITOR OF 17 α -HYDROXYLASE/C17,20-LYASE AND OF 5 α -REDUCTASE*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42 (1992) 313–320.
- [79] P. Nuhn, J.S. De Bono, K. Fizazi, S.J. Freedland, M. Grilli, P.W. Kantoff, G. Sonpavde, C.N. Sternberg, S. Yegnasubramanian, E.S. Antonarakis, Update on Systemic Prostate Cancer Therapies: Management of Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer in the Era of Precision Oncology, *Eur. Urol.* 75 (2019) 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.03.028>.
- [80] S.E. Barrie, G.A. Potter, P.M. Goddard, B.P. Haynes, M. Dowsett, M. Jarman, Pharmacology of novel steroidal inhibitors of cytochrome P45017 α (17 α -hydroxylase/C17-20 lyase), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 50 (1994) 267–273. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(94\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0960-0760(94)90131-7).
- [81] N.A. Al-Masoudi, K.M. Mahdi, N.A. Abdul-Rida, B.A. Saeed, M. Engel, A new pregnenolone analogues as privileged scaffolds in inhibition of CYP17 hydroxylase enzyme. Synthesis and in silico molecular docking study, *Steroids.* 100 (2015) 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.05.002>.
- [82] E. Gianti, R.J. Zauhar, Modeling androgen receptor flexibility: A binding mode hypothesis of CYP17 inhibitors/antiandrogens for prostate cancer therapy, *J. Chem. Inf. Model.* 52 (2012) 2670–2683. <https://doi.org/10.1021/ci3002342>.
- [83] D. Isoenzyme, E. In, M.H. Prostate, Characterization of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Isoenzyme Expression in Benign and, 41 (1996) 37–41.
- [84] S.E. Bulun, Y.H. Cheng, M.E. Pavone, P. Yin, G. Imir, H. Utsunomiya, S. Thung, Q. Xue, E.E. Marsh, H. Tokunaga, H. Ishikawa, T. Kurita, E.J. Su, 17-Hydroxysteroid dehydrogenase-2 deficiency and progesterone resistance in endometriosis, *Semin. Reprod. Med.* 28 (2010) 44–50. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1242992>.
- [85] E.R. Simpson, M.S. Mahendroo, G.D. Means, M.W. Kilgore, M.M. Hinshelwood, S. Graham-Lorence, B. Amarnah, Y. Ito, C.R. Fisher, M.D. Michael, C.R. Mendelson, S.E. Bulun, Aromatase cytochrome p450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, *Endocr. Rev.* 15 (1994) 342–355. <https://doi.org/10.1210/edrv-15->

- 3-342.
- [86] R. Le Lain, K.J. Barrell, G.S. Saeed, P.J. Nicholls, C. Simons, A. Kirby, R. Le Lain, K.J. Barrell, G.S. Saeed, P.J. Nicholls, C. Simons, A. Kirby, Some Coumarins and Triphenylethene Derivatives as Inhibitors of Human Testes Microsomal 17 β - hydroxysteroid Dehydrogenase (17 β -HSD Type 3): Further Studies with Tamoxifen on the Rat Testes Microsomal Enzyme Some Coumarins and Triphenylethene Derivat, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 6366 (2008). <https://doi.org/10.1080/14756360290026441>.
- [87] D. Poirier, Inhibitors of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases, (2003) 453–477.
- [88] C. Thieffry, M. Van Wynendaele, A. Aynaci, M. Maja, C. Dupuis, A. Lorient, E. Marbaix, P. Henriot, Ag-205 upregulates enzymes involved in cholesterol biosynthesis and steroidogenesis in human endometrial cells independently of pgrmc1 and related mapr proteins, *Biomolecules.* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/biom11101472>.
- [89] R. Spencer, Comparison Finasteride and Genital, 131 (1992) 1149–1156.
- [90] L. Frisén, A. Nordenström, H. Falhammar, H. Filipsson, G. Holmdahl, P.O. Janson, M. Thorén, K. Hagenfeldt, A. Möller, A. Nordenskjöld, Gender role behavior, sexuality, and psychosocial adaptation in women with congenital adrenal hyperplasia due to CYP21A2 deficiency, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 3432–3439. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0636>.
- [91] J. Malikova, T. Zingg, R. Fingerhut, S. Sluka, M. Grössl, R. Bernhardt, J. Mcdougall, A. V Pandey, C.E. Flüch, HIV Drug Efavirenz Inhibits CYP21A2 Activity with Possible Clinical Implications, (2019). <https://doi.org/10.1159/000500522>.
- [92] L. Schloms, A.C. Swart, Rooibos Flavonoids Inhibit the Activity of Key Adrenal Steroidogenic Enzymes, Modulating Steroid Hormone Levels, (2014) 3681–3695. <https://doi.org/10.3390/molecules19033681>.
- [93] R.A.S. Schweizer, A.G. Atanasov, B.M. Frey, A. Odermatt, A rapid screening assay for inhibitors of 11 β - hydroxysteroid dehydrogenases (11 β -HSD): flavanone selectively inhibits 11 β -HSD1 reductase activity, 212 (2003) 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.09.027>.
- [94] S.A. Latif, H.A. Pardo, M.P. Hardy, D.J. Morris, Endogenous selective inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms 1 and 2 of adrenal origin, 243 (2005) 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.08.006>.
- [95] N. Tagawa, R. Yuda, S. Kubota, M. Wakabayashi, Y. Yamaguchi, D. Kiyonaga, N. Mori, E. Minamitani, H. Masuzaki, Y. Kobayashi, 17 β -Estradiol inhibits 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in rodent adipocytes, (2003) 131–139. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0021>.
- [96] S.E. Bulun, D. Chen, I. Moy, D.C. Brooks, H. Zhao, Aromatase, breast cancer and obesity: A complex interaction, *Trends Endocrinol. Metab.* 23 (2012) 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.10.003>.
- [97] I.E. Smith, M. Dowsett, Aromatase Inhibitors in Breast Cancer, (2003) 2431–2442.
- [98] L.W.L. Woo, C. Bubert, O.B. Sutcliffe, A. Smith, S.K. Chander, M.F. Mahon, A. Purohit, M.J. Reed, B.V.L. Potter, Dual Aromatase - Steroid Sulfatase Inhibitors, (2007) 3540–3560.
- [99] C.Z. Ai, H.Z. Man, Y. Saeed, D.C. Chen, L.H. Wang, Y.Z. Jiang, Computational insight into crucial binding features for metabolic specificity of cytochrome P450 17A1, *Informatics Med. Unlocked.* 15 (2019) 100172. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2019.100172>.
- [100] C.H. Munkboel, T.B. Rasmussen, C. Elgaard, M.L.K. Olesen, A.C. Kretschmann, B. Styrihave, The classic azole antifungal drugs are highly potent endocrine disruptors in vitro inhibiting steroidogenic CYP enzymes at concentrations lower than therapeutic Cmax, *Toxicology.* 425 (2019) 152247. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152247>.
- [101] S. Ahmad, M.F. Khan, S. Parvez, M. Akhtar, S. Raisuddin, Molecular docking reveals the potential of phthalate esters to inhibit the enzymes of the glucocorticoid biosynthesis pathway, *J. Appl. Toxicol.* 37 (2017) 265–277. <https://doi.org/10.1002/jat.3355>.
- [102] F.W. Yang, Y.X. Li, F.Z. Ren, J. Luo, G.F. Pang, Assessment of the endocrine-disrupting effects of organophosphorus pesticide triazophos and its metabolites on endocrine hormones biosynthesis, transport and receptor binding in silico, *Food Chem. Toxicol.* 133 (2019) 110759. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110759>.
- [103] A. Carrasco-Carballo, E. Marín-Merino, P. Merino-Montiel, B. Colin-Lozano, S.L.C. Hilerio, J.C. Hilario-Martínez, J. Sandoval-Ramírez, Steroidal Plant Growth Promoters vs. Phytopathogens, via Enzymatic Regulation; An *in Silico* Approach, *Adv. Enzym. Res.* 09 (2021) 55–71. <https://doi.org/10.4236/aer.2021.94006>.
- [104] L. Wang, Y. Hai, N. Huang, X. Gao, W. Liu, X. He, Human cytochrome P450 enzyme inhibition profile of three flavonoids isolated from: *Psoralea corylifolia*: In silico predictions and experimental validation, *New J. Chem.* 42 (2018) 10922–10934. <https://doi.org/10.1039/c7nj00884h>.
- [105] S.D. Desai, D.G. Desai, H. Kaur, Saponins and their biological activities, *Pharma Times.* 41 (2009) 13–16.
- [106] G.N. Lopez-Castillo, V. Alatríste, J. Sandoval-Ramírez, F. Luna, A. Carrasco-Carballo, Molecular Docking Studies of Spirostans as MAPK14 (P38 α) Inhibitors and Their Potential Use against Cancer, *J. Mol. Docking.* 1 (2021) 59–67. <https://doi.org/10.33084/jmd.v1i2.2904>.
- [107] A. V. Sirotkin, R. Alexa, S. Alwaseel, A.H. Harrath, The phytoestrogen, diosgenin, directly stimulates ovarian cell functions in two farm animal species, *Domest. Anim. Endocrinol.* 69 (2019) 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.04.002>.
- [108] G. Sethi, M.K. Shanmugam, S. Warriar, M. Merarchi, F. Arfuso, A.P. Kumar, A. Bishayee, Pro-apoptotic and anti-cancer properties of diosgenin: A comprehensive and critical review, *Nutrients.* 10 (2018).

- <https://doi.org/10.3390/nu10050645>.
- [109] K. Sato, S. Fujita, M. Iemitsu, Acute administration of diosgenin or dioscorea improves hyperglycemia with increases muscular steroidogenesis in STZ-induced type 1 diabetic rats, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143 (2014) 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.02.020>.
- [110] J.M.V. Hernández-Vázquez, H. López-Muñoz, M.L. Escobar-Sánchez, F. Flores-Guzmán, B. Weiss-Steider, J.C. Hilario-Martínez, J. Sandoval-Ramírez, M.A. Fernández-Herrera, L. Sánchez Sánchez, Apoptotic, necrotic, and antiproliferative activity of diosgenin and diosgenin glycosides on cervical cancer cells, *Eur. J. Pharmacol.* 871 (2020) 172942. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172942>.
- [111] C. Corbiere, B. Liagre, A. Bianchi, K. Bordji, M. Dauça, P. Netter, J.L. Beneytout, Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells., *Int. J. Oncol.* 22 (2003) 899–905. <https://doi.org/10.3892/ijo.22.4.899>.
- [112] A. Carrasco-Carballo, M. Guadalupe Hernández-Linares, M. Cárdenas-García, J. Sandoval-Ramírez, Synthesis and biological in vitro evaluation of the effect of hydroxyimino steroidal derivatives on breast cancer cells, *Steroids*. 166 (2021) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108787>.
- [113] O. Isbilen, E. Volkan, Allium Species in the Fight Against Cancer, *Cancer Ther.* (2020) 1–10.
- [114] M.A. Fernández-Herrera, J. Sandoval-Ramírez, H. López-Muñoz, L. Sánchez-Sánchez, Formation of the steroidal 3 β -hydroxy-6-oxo-moiety. synthesis and cytotoxicity of glucolaxogenin, *Arkivoc.* 2009 (2009) 170–184. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0010.d15>.
- [115] L.E. Mendie, Phytochemicals Target Growth Factor Receptors to Control Cancer : An In Silico Study, (2021) 1–19. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-768199/v1>.
- [116] J. Gasparotto, N. Somensi, A. Kunzler, C. Girardi, M. Pasquali, V. Ramos, A. Simoes-Pires, L. Quintans-Junior, A. Branco, J. Moreira, D. Gelain, Hecogenin Acetate Inhibits Reactive Oxygen Species Production and Induces Cell Cycle Arrest and Senescence in the A549 Human Lung Cancer Cell Line, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 14 (2014) 1128–1135. <https://doi.org/10.2174/1871520614666140408151751>.
- [117] C. Camoutsis, D. Trafalis, G. Pairas, A. Papageorgiou, 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, *Farmac.* 60 (2005) 826–829. <https://doi.org/10.1016/j.farmac.2005.07.006>.
- [118] R. Zeferino-Díaz, J.C. Hilario-Martínez, M. Rodríguez-Acosta, J. Sandoval-Ramírez, M.A. Fernández-Herrera, 22-Oxocholestanes as plant growth promoters, *Steroids*. 98 (2015) 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.03.005>.
- [119] M.A. Fernández-Herrera, H. López-Muñoz, J.M.V. Hernández-Vázquez, M. López-Dávila, M.L. Escobar-Sánchez, L. Sánchez-Sánchez, B.M. Pinto, J. Sandoval-Ramírez, 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, *Bioorganic Med. Chem.* 18 (2010) 2474–2484. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.02.051>.
- [120] R. Zeferino-Díaz, L. Olivera-Castillo, A. Dávalos, G. Grant, N. Kantún-Moreno, R. Rodríguez-Canul, S. Bernès, J. Sandoval-Ramírez, M.A. Fernández-Herrera, 22-Oxocholestane oximes as potential anti-inflammatory drug candidates, *Eur. J. Med. Chem.* 168 (2019) 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.035>.
- [121] B. Fernández, M.A. Ríos, L. Carballeira, Molecular mechanics (MM2) and conformational analysis of compounds with N-C-O units. Parametrization of the force field and anomeric effect, *J. Comput. Chem.* 12 (1991) 78–90. <https://doi.org/10.1002/jcc.540120109>.
- [122] J.J.P. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters, *J. Mol. Model.* 19 (2013) 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>.
- [123] A. Allouche, Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares, *J. Comput. Chem.* 32 (2012) 174–182. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- [124] Q. Xiao, L. Wang, S. Supekar, T. Shen, H. Liu, F. Ye, J. Huang, H. Fan, Z. Wei, C. Zhang, Structure of human steroid 5 α -reductase 2 with the anti-androgen drug finasteride, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19249-z>.
- [125] R.J. Santen, R.I. Misbin, Aminoglutethimide: Review of Pharmacology and Clinical Use, *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* 1 (1981) 95–119. <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1981.tb03557.x>.
- [126] D. Poirier, A. Nyachieo, A. Romano, J. Roy, D. Chai, B. Delvoux, C. Tomassetti, A. Vanhie, An irreversible inhibitor of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibits estradiol synthesis in human endometriosis lesions and induces regression of the non-human primate endometriosis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 222 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2022.106136>.
- [127] S.L. Sudduth, M.J. Koronkowski, H. Effects, C. Controversies, P. Cancer, H. Growth, A. Reactions, Finasteride: The First 5 α -Reductase Inhibitor, *Eval. New Drugs.* 13 (1992) 309–329.
- [128] X. Ye, S.Y. Chen, S. Wu, D.S. Yoon, H. Wang, Z. Hong, P.O. Connor, J. Li, J.J. Li, L.L. Kennedy, S.J. Walker, A. Nayeem, D.M. Camac, V. Ramamurthy, P.E. Morin, R. Zebo, R. Joseph, N.N. Morgan, R.P. Ponticciello, T. Harrity, A. Apedo, R. Golla, R. Seethala, M. Wang, T.W. Harper, B.G. Slecicka, B. He, D.K. Leahy, J. Li, R.L. Hanson, Z. Guo, Y. Li, J.D. Dimarco, B.D. Maxwell, F. Moulin, J.C. Barrish, D.A. Gordon, J.A. Robl, Discovery of Clinical Candidate 2-((2S,6S)-2-phenyl-6-hydroxyadamantan-2-yl)-novel selective 11 β -hydroxysteroid

- dehydrogenase type 1 inhibitor, *J. Med. Chem.* 60 (2017) 4932–4948. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00211>.
- [129] I. Viciano, S. Mart, Theoretical Study of the Mechanism of Exemestane Hydroxylation Catalyzed by Human Aromatase Enzyme, *J. Phys. Chem.* 120 (2016) 3331–3343. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b01014>.
- [130] C. Cai, S. Chen, P. Ng, G.J. Bublely, P.S. Nelson, A. Elahe, B. Marck, A.M. Matsumoto, N.I. Simon, H. Wang, S. Chen, S.P. Balk, Intratumoral De Novo Steroid Synthesis Activates Androgen Receptor in Castration Resistant Prostate Cancer and is Upregulated by Treatment with CYP17A1 Inhibitors, *Cancer Res.* 71 (2012) 6503–6513. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0532>. Intratumoral.
- [131] A. Carrasco Carballo, Síntesis y Evaluación Biológica de Nuevos Agentes Anticancerígenos y Promotores de Crecimiento Vegetal a Partir de Sapogeninas Esteroidales. Tesis MC, BUAP. (2018).