



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“DISEÑO Y SÍNTESIS DIRIGIDA DE DERIVADOS DE
5 α -HIDROXILAXOGENINA CONTRA EL SÍNDROME DE OVARIO
POLIQUÍSTICO EN MODELO DE RATA WISTAR”**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

ERIK ALEJANDRO LÓPEZ HERRERA

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. FELIX LUNA MORALES

CODIRECTOR DE TESIS: M. en C. ALAN CARRASCO CARBALLO

ASESOR TÉCNICO: M. en C. RODRIGO SORIANO VÁZQUEZ



Puebla Pue., Julio del 2020



Dedicado a mis papás, Alejandro y Cristina

Por todo el apoyo incondicional que siempre me dieron, pero principalmente, por ser las personas más fuertes que he conocido, dándome el mejor ejemplo siempre e inspirándome a ser quien soy hoy en día.



Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neuroendocrinología, FCQ-BUAP bajo la dirección del M. en C. Félix Luna Morales, profesor investigador titular.



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica, LESQO-BUAP, en el área de síndrome de ovario poliquístico, bajo la dirección del M. en C. Alan Carrasco Carballo, profesor investigador.

Agradecimientos

Al **M. en C. Félix Luna**, por haberme guiado en este proyecto, dedicándome atención, tiempo y paciencia, por compartir sus conocimientos y principalmente por haberme abierto las puertas de su laboratorio, permitiéndome explorar y explotar mi potencial en áreas del tipo biológica, por lo cual le estoy sumamente agradecido.

Al **Dr. Jesús Sandoval**, por el tiempo, atención y enorme apoyo brindado, por ser parte de mi comisión revisora con lo que se enriqueció ampliamente el trabajo y mi desarrollo profesional.

A la **Dra. Laura Orea**, por complementar y enriquecer el trabajo al ser parte de mi comisión revisora, agradeciéndole por el tiempo y dedicación otorgado en el presente trabajo, sumado al de las clases en química orgánica impartidas en la licenciatura de las cuales fui partícipe, enriqueciendo enormemente mi desarrollo profesional.

Al **M. en C. Rodrigo Soriano**, por la dedicación, paciencia y supervisión al transmitirme su experiencia y conocimientos que enriquecieron ampliamente el trabajo.

A la **VIEP** y a la **BUAP**, por el apoyo brindado a la investigación a lo largo de mi carrera universitaria con programas como *Haciendo ciencia en la BUAP* y becas otorgadas en distintas modalidades, permitiéndome un buen desempeño académico.

A la fundación **Telmex-Telcel**, por los estímulos y apoyo brindados a lo largo de toda la carrera con el programa de becarios a nivel nacional del cual fui partícipe, recalcando el impulso personal y profesional que generan mediante proyectos como los de MSXXI.

Al **M. en C. Alan Carrasco**, por el enorme compromiso y dedicación al proyecto y a mi desarrollo profesional y personal. Por recibirme como alumno, voluntario, becario y tesista, además de la confianza depositada en mí para la incursión en ésta área de investigación y de reacciones nuevas. Por hacer que la química se vea tan fácil y por compartir la pasión que tiene por ella, lo que me impulsó a adentrarme en el área que yo menos consideraba. Esto y por muchas cosas más te estoy profundamente agradecido.

A mis hermanos, Ricardo y Laura, por todas las chencheras y ocurrencias que hacemos, junto con cada momento formado en familia que han impactado positiva y profundamente en mi desarrollo personal y profesional; además, les agradezco por todo el apoyo incondicional que sé que tenemos pese a cualquier circunstancia.

A David, Vania, Mike Benítez, Majo, Pastrana, por ser los mejores amigos que alguien podría tener, por apoyarme a lo largo de toda la carrera a nivel profesional y personal, y por todas las ocurrencias y experiencias que generamos, haciendo de esta etapa de mi vida única e invaluable gracias a ustedes.

A mis amigos y compañeros de la licenciatura Jesss, Adri, Fer, Eric sin k, Rigo, Julie, Belén, Abril, más todos los no mencionados por cuestión de espacio, por toda clase de experiencias vividas en la carrera que hicieron única a nuestra generación.

A mis muchos compañeros de laboratorio LESQO, a la mejor compañera Bere, a mi mejor alumna Eunice, a los más grandes como la tía cochina Guíee, la señorita Lic. Daniela Monroy, y mi compañera libanesa Sarahí; y también los pequeños (ya no tan pequeños) Moni, Yair, Giss, Dani, Eli, Christian, Liz, Lalo, Janneth y a los muchos que faltan, por hacer tan amenos, divertidos y variados los momentos en el lab.

Historial académico

Parte de este trabajo fue presentado en los siguientes programas y congresos:

Haciendo Ciencia en la BUAP - Otoño 2017. VIEP-BUAP, con el proyecto “Identificación de estructuras esteroidales extraídas de barbasco del estado de Puebla”, bajo la dirección de la Dra. Maricela Rodríguez Acosta. **Erik Alejandro López Herrera.**

Haciendo Ciencia en la BUAP - Primavera 2018. VIEP-BUAP, con el proyecto “Esterificación de esteroides por anhídrido mixto” bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Hernández Linares **Erik Alejandro López Herrera.**

30 Aniversario del Jardín Botánico Universitario. Jardín Botánico Universitario BUAP, Puebla. 15 de junio de 2017, modalidad cartel: “Extracción vs síntesis parcial: obtención de laxogenina”. **Erik Alejandro López Herrera,** Jesús Alberto Rojas Morales, Yamili Itzel Gómez Méndez, Saraí Ramírez Gonzáles, Alan Carrasco Carballo, Maricela Rodríguez Acosta, María Guadalupe Hernández Linares.

1er Simposio Estudiantil del Laboratorio del Jardín Botánico Universitario. Jardín Botánico Universitario BUAP, Puebla el 22 y 23 de noviembre de 2017, modalidad cartel: “Extracción y purificación de estructuras esteroidales de barbasco del estado de Puebla”. **Erik Alejandro López Herrera.**

53 Congreso Mexicano de Química, 37º Congreso Nacional de Educación Química. Unidad Politécnica para el Desarrollo y la Competitividad Empresarial, CDMX del 2 al 5 de octubre de 2018, modalidad cartel: “Efecto de un átomo electroattractor sobre la selectividad de esterificaciones esteroidales”. Saraí Ramírez Gonzales, **Erik Alejandro López Herrera,** Alan Carrasco Carballo, Maricela Rodríguez Acosta, María Guadalupe Hernández Linares, Jesús Sandoval Ramírez.

53 Congreso Mexicano de Química. Unidad Politécnica para el Desarrollo y la Competitividad Empresarial, CDMX del 2 al 5 de octubre de 2018, modalidad cartel: “Optimización y escalamiento del proceso de extracción mediante equipo Soxhlet para la obtención de esteroides a partir de *Dioscorea composita*”, ganador del **Primer lugar** en el concurso nacional de carteles estudiantiles. Saraí Ramírez Gonzales, **Erik Alejandro López Herrera,** Alan Carrasco Carballo, Maricela Rodríguez Acosta, María Guadalupe Hernández Linares, Jesús Sandoval Ramírez.

54 Congreso Mexicano de Química. Centro Cultural Universitario BUAP, Puebla del 30 de septiembre al 3 de octubre de 2019, modalidad cartel: “Estudios *in silico* y síntesis de inhibidores esteroidales en la enzima CYP17A1”. **Erik Alejandro López Herrera,** María Guadalupe Hernández Linares, Jesús Sandoval Ramírez, Alan Carrasco Carballo.

54 Congreso Mexicano de Química. Centro Cultural Universitario BUAP, Puebla del 30 de septiembre al 3 de octubre de 2019, modalidad cartel: “Diseño *in silico* y síntesis de nuevos bloqueadores del receptor a estradiol alfa (ER α)”. **Erik Alejandro López Herrera**, Rodrigo Soriano Vásquez, Félix Luna Morales, Berenice Rebolledo Galindo, Jesús Sandoval Ramírez, Alan Carrasco Carballo.

Cuarto Simposio Iberoamericano en Química Orgánica (SIBEAQO-IV). Cuba del 4 al 8 de diciembre de 2019, modalidad cartel: “Diseño *in silico*, síntesis y evaluación biológica de derivados amino-ésteres esteroidales contra el síndrome de ovario poliquístico”. Alan Carrasco Carballo, Rodrigo Soriano Vázquez, **Erik Alejandro López Herrera**, Félix Luna Morales, Jesús Sandoval Ramírez.

1er Workshop de Investigación del Jardín Botánico Universitario y el Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica. Jardín Botánico Universitario BUAP, Puebla el 10 de diciembre de 2019, modalidad ponencia: “Diseño y síntesis dirigida de derivados 5 α -hidroxilaxogenina contra el síndrome de ovario poliquístico en modelo de rata Wistar”. **Erik Alejandro López Herrera**.

ÍNDICE

Agradecimientos	IV
Historial académico.....	V
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE GRÁFICAS	X
INDICE DE FIGURAS	X
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XIII
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Síndrome de ovario poliquístico.....	1
1.2 Tratamiento del SOP.....	3
1.3 Dianas objetivo	5
1.3.1 Receptor de estrógenos α y β (RE α y RE β).....	5
1.3.2 Receptor de andrógenos (RA)	6
1.3.3. Receptor de progestágenos (RP)	6
1.3.4 Proteína de unión a esteroides de respuesta rápida asociada a membrana (MARRS).....	6
1.3.5 Caspasa 3 (CSP-3).....	7
1.3.6 Inductor de apoptosis CD95 (CD95).....	7
1.3.7 Interleucina-6 (Il-6)	7
1.3.8 Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	8
1.4 Hormonas y su regulación	8
1.5 Esteroides y obtención de derivados de interés biológico	10
1.6 Herramientas de diseño <i>In Silico</i>	15
2. OBJETIVOS	16
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
3.1 Estudio de acoplamiento molecular	17
3.1.1 Receptor de estrógenos.....	18
❖Receptor de Estrógenos α (RE α).....	18
❖Receptor de estrógenos β (RE β)	20
3.1.2 Receptor de andrógenos (RA)	22
3.1.3 Receptor de progestágenos (RP)	24
3.1.4 Proteína de unión a esteroides de respuesta rápida asociada a membrana (MARRS).....	26

3.1.5 Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	28
3.1.6 Inductor de apoptosis CD95 (CD95)	30
3.1.7 Caspasa3 (CSP-3)	32
3.1.8 Interleucina-6 (IL-6)	34
3.2 Administración, Distribución, Metabolismo, Excreción (ADME)	37
3.3 Análisis teórico de selección de candidatos a síntesis	40
3.4 Síntesis orgánica de los candidatos seleccionados	42
3.4.1 Obtención y caracterización de diosgenina, Dg (28) como materia prima.....	44
3.4.2 Síntesis y caracterización de FtTrp (56) como materia prima.....	46
3.4.3 Síntesis y caracterización de FtTrpDg (48)	47
3.4.4 Síntesis y caracterización de FtTrpEpx α Dg (48a) y FtTrpEpx β Dg (48b)	48
3.4.5 Síntesis y caracterización de AcDg (34)	50
3.4.6 Síntesis y caracterización de Epx α AcDg (35a) y Epx β AcDg (35b)	51
3.4.7 Síntesis y caracterización de Ac5OHLaxo (36)	52
3.4.8 Síntesis y caracterización de 5OHLaxo (30)	54
3.4.9 Síntesis y caracterización de FtTrp5OHLaxo (47)	55
3.4.10 Síntesis y caracterización de Trp5OHLaxo (50)	56
3.5 Evaluación biológica en modelo de rata Wistar	57
4. CONCLUSIONES	63
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	65
5.1 Estudios de acoplamiento molecular	65
5.2 Síntesis química	65
5.2.1 Metodología de purificación y caracterización	65
5.2.2 Síntesis de compuestos	66
5.3 Evaluación biológica.....	73
6. ANEXOS	76
ANEXO A: Mecanismo de acción propuesto para la obtención de FtTrp (56).	76
ANEXO B: Mecanismo de acción propuesto para la obtención de FtTrp5OHLaxo (49).....	77
ANEXO C: Mecanismo de acción propuesto para la obtención de Trp5OHLaxo (50).	78
ANEXO D: Ciclo Estral de rata Wistar	79
ANEXO E: Tinción Hematoxilina-Eosina (H&E).....	80
7. BIBLIOGRAFÍA.....	81

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biosíntesis de hormonas esteroideas.	10
Esquema 2. Degradación de Marker.	12
Esquema 3. Semi-síntesis de laxogenina (40) y 5 α -hidroxilaxogenina (30).	13
Esquema 4. Reacción para la protección de grupos amino en a.a. mediante BOC ₂ O.	14
Esquema 5. Obtención de derivados de diosgenil-arginina.	14
Esquema 6. Rutas de síntesis propuestas: A (roja) y B (azul).	17
Esquema 7. Rutas de síntesis propuestas: A (rojo) y B (azul).	43
Esquema 8. Reacción para la obtención de ftalamidato de triptófano, FtTrp (56).	46
Esquema 9. Reacción para la obtención de FtTrpDg (48).	47
Esquema 10. Reacción para la obtención de la mezcla de epóxidos α y β de FtaTrpDg.	48
Esquema 11. Obtención de FtTrp (56).	66
Esquema 12. Obtención de FtTrpDg (48).	67
Esquema 13. Obtención de la mezcla de epóxidos de (N-ftaloidimil) triptofanatos de Diosgenina.	68
Esquema 14. Obtención de AcDg (34).	68
Esquema 15. Obtención de Epx α AcDg (35a) y Epx β AcDg (35b).	69
Esquema 16. Obtención de Ac5OHLaxo (36).	70
Esquema 17. Obtención de 5OHLaxo (30).	71
Esquema 18. Obtención de FtTrp5OHLaxo (47).	71
Esquema 19. Obtención de Trp5OHLaxo (50).	72
Esquema 20. Mecanismo de acción propuesto para la formación de ftalamidato de triptófano.	76
Esquema 21. Mecanismo de acción propuesto para la esterificación de 5 α -hidroxilaxogenina y ftalamidato de triptófano.	77
Esquema 22. Mecanismo de acción propuesto para la desprotección del grupo amino del triptófano esterificado.	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de síntomas de SOP.	4
Tabla 2. Selección de proteínas blanco para el estudio de acoplamiento molecular.	18
Tabla 3. Resultados del análisis ADME, Ruta A.	38
Tabla 4. Resultados del análisis ADME, Ruta B.	38
Tabla 5. Resumen de las moléculas principales de interés.	40
Tabla 6. Efecto del FtTrpDg (48) sobre ovarios y útero de rata Wistar con SOP.	57
Tabla 7. Efecto de Trp5OHLaxo (50) sobre ovarios y útero de ratas Wistar con SOP.	58

Tabla 8. <i>Espesor de las capas del útero (μm) de ratas Wistar con SOP y administradas con derivados esteroideos: FtTrpDg (48) o Trp5OHLaxo (50).</i>	60
---	----

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. <i>Energías de acoplamiento molecular vs receptor a estrógenos alfa ($RE\alpha$) (ΔG, kcal/mol).</i>	19
Gráfica 2. <i>Energías de acoplamiento molecular vs receptor a estrógenos beta ($RE\beta$) (ΔG, kcal/mol).</i>	21
Gráfica 3. <i>Energías de acoplamiento vs receptor de andrógenos (RA) (ΔG, kcal/mol).</i>	23
Gráfica 14. <i>Energías de acoplamiento molecular vs receptor a progestágenos (RP) (ΔG, kcal/mol).</i>	25
Gráfica 5. <i>Energías de acoplamiento molecular vs receptor MARRS (ΔG, kcal/mol).</i>	27
Gráfica 6. <i>Energías de acoplamiento molecular vs factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (ΔG, kcal/mol).</i>	29
Gráfica 7. <i>Energías de acoplamiento molecular vs CD95 (ΔG, kcal/mol).</i>	31
Gráfica 8. <i>Energías de acoplamiento molecular vs caspasa 3 (CSP-3) (ΔG, kcal/mol).</i>	33
Gráfica 9. <i>Energías de acoplamiento molecular vs interleucina-6 (IL-6) (ΔG, kcal/mol).</i>	35
Gráfica 10. <i>Resultados de las mediciones de espesor de las capas de útero.</i>	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Tipos de SOP según los criterios de Rotterdam.</i>	1
Figura 2. <i>Micrografías representativas de cortes histológicos de ovario de ratas Wistar</i>	2
Figura 3. <i>Micrografía representativa de cortes histológicos transversales del útero de ratas Wistar</i>	3
Figura 4. <i>Célula endometrial, vías de señalización de diferentes estrógenos involucrados en el desarrollo de cáncer de endometrio</i>	5
Figura 5. <i>Efectos de testosterona y dihidrotestosterona por la unión al receptor de andrógenos (RA)</i>	6
Figura 6. <i>Vías de señalización para la activación de caspasa 3 en apoptosis interviniendo CD95.</i>	7
Figura 7. <i>Diagrama del efecto general de interleucina 6 en los ovarios.</i>	8
Figura 8. <i>Los cuatro humores de Hipócrates.</i>	9
Figura 9. <i>Numeración y clasificación de los anillos del ciclopenta[α]fenantreno.</i>	11
Figura 10. <i>Estructura química de diferentes sapogeninas con importante actividad biológica.</i>	11
Figura 11. <i>Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroideos con el receptor de estrógenos α ($RE\alpha$).</i>	20
Figura 12. <i>Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroideos con el receptor de estrógenos beta ($RE\beta$).</i>	22
Figura 13. <i>Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroideos con el receptor de andrógenos (RA).</i>	24

Figura 14. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con el receptor de progestágenos (RP).	26
Figura 15. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con el receptor MARRS.	28
Figura 16. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).	30
Figura 17. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con el receptor CD95.	32
Figura 18. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con CSP-3.	34
Figura 19. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con IL-6.	36
Figura 20. Radar de biodisponibilidad de 6 parámetros ideales en un fármaco de ambas rutas.	39
Figura 21. Diagrama de permeabilidad para los compuestos de la ruta A calculada por SWISSADME.	41
Figura 22. Diagrama de permeabilidad para los compuestos de la ruta B calculada por SWISSADME.	41
Figura 23. Estructura de Diosgenina, Dg (28) y numeración de sus átomos de carbono.	44
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H de Dg (28) a 500 MHz.	45
Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C de Dg (28) a 125 MHz.	45
Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C de FtTrp (56) a 125 MHz.	46
Figura 27. Ftalamidato de triptófano de diosgenina, FtTrpDg (48).	47
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de Dg (28) y FtTrpDg (48).	48
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H de la mezcla de epóxidos a 500 MHz.	49
Figura 30. Mezcla obtenida de epóxidos de ftalamidato de triptófano de diosgenina.	49
Figura 31. Acetato de diosgenina, AcDg (34).	50
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de Dg (28) y de AcDg (34).	51
Figura 33. Epx α AcDg (35a) y Epx β AcDg (35b).	51
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de AcDg (34) y mezcla de 35a y 35b.	52
Figura 35. Acetato de 5 α -hidroxilaxogenina, Ac5OHLaxo (36).	52
Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de Dg (28) y de Ac5OHLaxo (36).	53
Figura 37. 5 α -hidroxilaxogenina, 5OHLaxo (30).	54
Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de Dg (28) y de 5OHLaxo (30).	54
Figura 39. Ftalamidato de triptófano de 5 α -hidroxilaxogenina, FtTrp5OHLaxo (47).	55
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de FtTrp5OHLaxo (47).	55
Figura 41. Triftofanato de 5 α -hidroxilaxogenina, Trp5OHLaxo (50).	56
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de FtTrp5OHLaxo (50).	56
Figura 43. Cortes histológicos representativos transversales del cuerno uterino de rata Wistar control, ratas con SOP y ratas con SOP administradas con los compuestos 48 o 50.	59
Figura 44. Diosgenina (28).	66
Figura 45. Micrografías de citología vaginal de ratas Wistar teñidas con H&E. Amplificación 4X.	79

ABREVIATURAS

▪ AA.	<i>Aminoácido</i>
▪ ACDG	<i>Acetato de diosgenina</i>
▪ ACOET	<i>Acetato de etilo</i>
▪ AC5OHLAXO	<i>Acetato de 5α-hidroxilaxogenina</i>
▪ BOC₂O	<i>Anhidro tert-butildicarbonato</i>
▪ CC	<i>Columna cromatográfica</i>
▪ CCF	<i>Cromatografía en capa fina</i>
▪ DG	<i>Diosgenina</i>
▪ DHT	<i>Dihidrotestosterona</i>
▪ EPXαACDG	<i>Epóxido α de acetato de diosgenina</i>
▪ EPXβACDG	<i>Epóxido β de acetato de diosgenina</i>
▪ EEM	<i>Error estándar de la media</i>
▪ EAM	<i>Estudios de acoplamiento molecular</i>
▪ FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
▪ FTTRP5OHLAXO	<i>Ftalamidoilriptófano de 5α-hidroxilaxogenina</i>
▪ FTTRPDG	<i>Ftalamidoilriptófano de diosgenina</i>
▪ FTTRPEPXADG	<i>Epóxido α de ftalamidoilriptófano</i>
▪ FTTRPEPXB DG	<i>Epóxido β de ftalamidoilriptófano</i>
▪ FTTRP	<i>Ftalamidoilriptófano</i>
▪ FT	<i>Ftalamidato</i>
▪ H&E	<i>Hematoxilina & eosina</i>
▪ IN	<i>Indol</i>
▪ TRP	<i>L-Triptófano</i>
▪ MARRS	<i>Proteína de unión a esteroides de respuesta rápida asociada a membrana</i>
▪ MHZ	<i>Mega hertz</i>
▪ MOP	<i>Morfología ovárica poliquística</i>
▪ RMN	<i>Resonancia magnética nuclear</i>
▪ SOP	<i>Síndrome de ovario poliquístico</i>
▪ SSI	<i>Solución salina isotónica</i>
▪ TRP5OHLAXO	<i>Triptofanato de 5α-hidroxilaxogenina</i>
▪ VEH	<i>Vehículo</i>
▪ 26OHDG	<i>26-hidroxidiosgenina</i>
▪ 5OHLAXO	<i>5α-hidroxilaxogenina</i>

RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una enfermedad neuroendocrina de alta incidencia a nivel mundial; en México, la prevalencia es del 6 %. Las pacientes con SOP suelen presentar principalmente hiperandrogenismo, desorden menstrual y múltiples quistes en ovarios. Además, el SOP se ha asociado a la obesidad, cáncer endometrial, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2. Hasta ahora no hay fármacos específicos contra el SOP, puesto que se usan medicamentos para tratar algunos de los síntomas; sin embargo, la regulación hormonal es clave del progreso del síndrome. Con el fin de desarrollar fármacos específicos contra el SOP, analizamos el comportamiento de derivados esteroidales esterificados con triptófano. En el caso de los ésteres con la 5α -hidroxilaxogenina (**50**) diseñamos 2 rutas de síntesis (**A** y **B**), usando como criterio de selección estudios de acoplamiento molecular con proteínas relacionadas con la enfermedad. Los compuestos sintetizados fueron evaluados en ratas Wistar con SOP inducido experimentalmente. Realizamos estudios de acoplamiento molecular para el receptor a estradiol α y β ($RE\alpha$ y $RE\beta$), receptor a andrógenos (RA), receptor a progesterona (RP), receptor MAARS de respuesta rápida a esteroides (MARRS), interleucina 6 (IL-6), caspasa 3 (CSP-3), receptor de apoptosis (CD95) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), tanto para el producto final **50** como para los productos intermediarios de las reacciones de síntesis; donde se obtuvo que los derivados de la ruta de síntesis **B**, que fueron los compuestos FtTrpDg (**48**), FtTrpEpx α Dg (**49a**) y FtTrpEpx β Dg (**49b**) los que tuvieron las mejores afinidades de interacción. Sin embargo, la síntesis química se vio comprometida en la ruta **B** debido a la formación no prevista de estereoisómeros, como resultado de la reacción del doble enlace propio del triptófano, razón por la cual la ruta de síntesis **B** no fue viable. Mientras que, siguiendo por la ruta A, se obtuvieron buenos rendimientos (> 80 %) hasta llegar a los derivados finales. Al realizar el análisis combinatorio teórico-experimental, las moléculas **48** y **50** fueron las seleccionadas para la evaluación biológica. Las sustancias fueron probadas en diferentes grupos de ratas Wistar hembras adultas jóvenes con ciclos estrales regulares. Se observó que en ratas con SOP, el compuesto **50** disminuyó el volumen de los ovarios, sin modificar la densidad de ellos, además, el peso del útero disminuyó a valores semejantes al de las ratas control, parámetro indicativo de mejoría de las ratas enfermas. Al administrar el compuesto **48**, el peso de los ovarios no se modificó, mientras el útero restableció su peso a valores similares de las ratas control. Al medir las capas del útero, se obtuvo que tanto el compuesto **48** como el compuesto **50** aumentaron el espesor del endometrio y miometrio, siendo mayor el efecto con el compuesto **48**. Estos resultados coincidieron con las mayores energías de acoplamiento obtenidas del compuesto **48** respecto a los receptores implicados en el SOP. Concluyendo que, en las ratas con SOP, los compuestos **48** y **50** químicamente modificados tuvieron actividad biológica estimuladora, resultado que coincide con la alta energía de acoplamiento molecular que poseen, por lo que inferimos ocurriría activación de múltiples vías celulares de acción, mismas que probaremos en otra etapa del proyecto.

1. ANTECEDENTES

1.1 Síndrome de ovario poliquístico

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una enfermedad neuroendocrina de alta incidencia, con síntomas variables heterogéneos, que compromete seriamente la fertilidad de la población femenina, puesto que es considerado la endocrinopatía más frecuente de las mujeres en edad reproductiva [1][2]. Se caracteriza por su alta prevalencia, variando desde un 4% hasta un 21% según diversos autores y criterios de diagnóstico [3][4]. En el mundo se estima que 1 de cada 15 mujeres lo padecen, mientras que en México se reporta una prevalencia del 6% [1][5].

Para que una mujer sea diagnosticada con SOP, deben exhibir al menos dos de tres características: exceso clínico y/o bioquímico de andrógenos, desorden menstrual o anovulación y morfología ovárica poliquística (MOP) -verificado usualmente por ultrasonido- ; al ser síntomas heterogéneos, se ha buscado establecer acuerdos para su correcto diagnóstico, variando según los convenios, siendo el más utilizado el de los criterios de Rotterdam que establece distintos tipos de SOP según los síntomas principales como se muestra en la figura 1 [6][7].

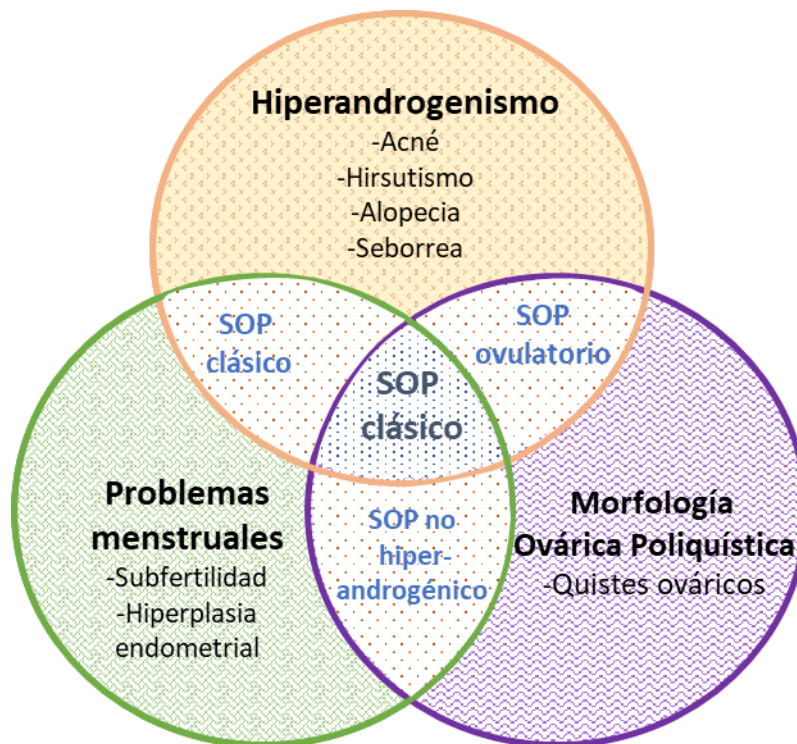


Figura 1. Tipos de SOP según los criterios de Rotterdam. Tomado y modificado de [6].

Las pacientes con SOP se asocian a un riesgo elevado a desarrollar obesidad, síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo II y enfermedades cardiovasculares. El SOP se considera una enfermedad de origen multifactorial, sin embargo, los síntomas y alteraciones metabólicas se deben principalmente al hiperandrogenismo y la hiperinsulinemia característicos del mismo [5][6].

Las concentraciones excesivas de insulina facilitan el hiperandrogenismo que, a su vez, contribuye al arresto folicular de pacientes con SOP; en los ovarios, la insulina estimula directamente a las células de la teca para producir grandes cantidades de andrógenos, mientras que, en el hígado, las altas concentraciones de insulina reducen los niveles de la proteína fijadora de hormonas sexuales (SHBG), incrementando los niveles de testosterona. Por lo tanto, cualquier situación clínica en donde las concentraciones de insulina sean elevadas, puede desencadenar el desarrollo de SOP en mujeres predispuestas [10]. La regulación hormonal es fundamental para el desarrollo de esta enfermedad en el que intervienen diversos receptores hormonales como por ejemplo, el receptor a estrógenos que se ha comprobado interviene en el avance de esta patología debido a su abundancia en órganos del sistema reproductor femenino como los ovarios y útero [6][7][11].

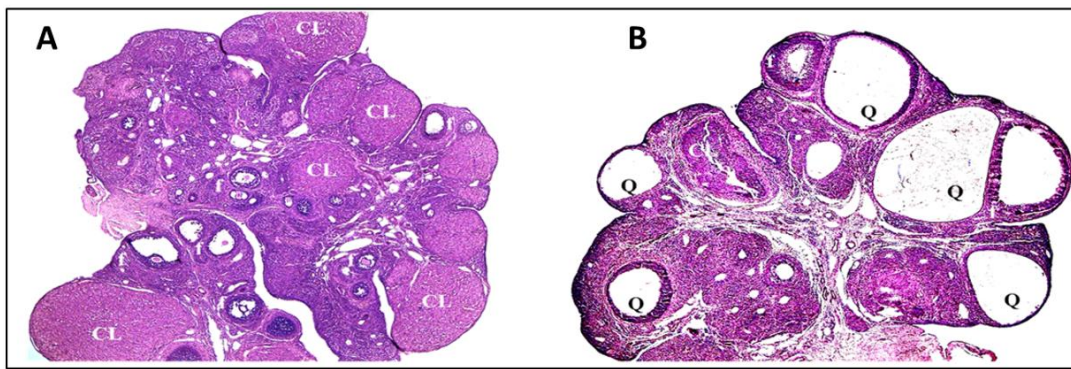


Figura 2. Micrografías representativas de cortes histológicos de ovario de ratas Wistar teñidos con hematoxilina&eosina (H&E). **A)** Ovario de rata sana, **B)** Ovario de rata con SOP. Cuerpo lúteo (CL) y quiste ovárico (Q). Amplificación 4X. Tomado de [11].

Dado que el SOP se caracteriza por una desregulación hormonal principalmente del tipo sexual, se desencadenan problemas de fertilidad, haciendo a este síndrome multiorgánico, pero en particular se torna de interés el estudio de ovarios y útero dada la sensibilidad de ambos a las hormonas, ya que en ovario se da la formación de quistes, como se muestra en la figura 2, provocando alteraciones en la ovulación, además de agrandamiento de ovarios y es común la hipersecreción de andrógenos [12], así mismo, el útero sufre alteraciones como la irregularidad en tamaño y formación anormal de glándulas endometriales, que a su vez, ocasionan la hiperplasia de la región del endometrio debido a las desregulaciones de estrógenos (Figura 3), lo cual puede tornarse en cáncer endometrial [13].

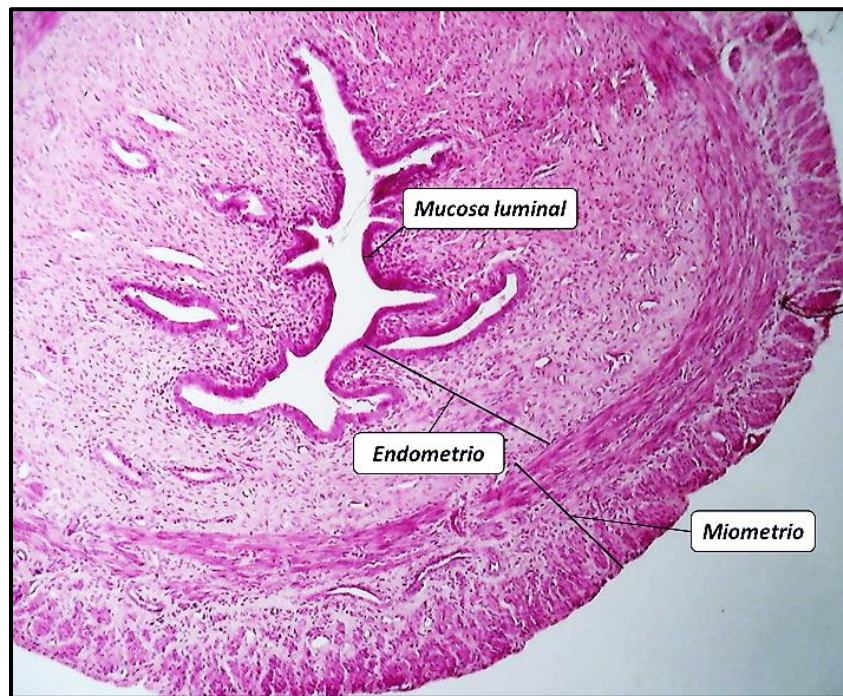
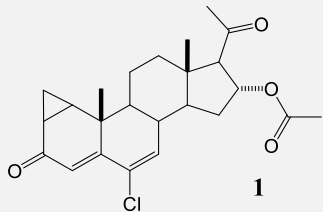
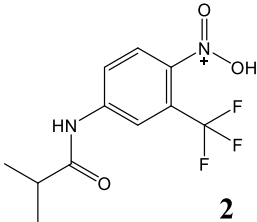
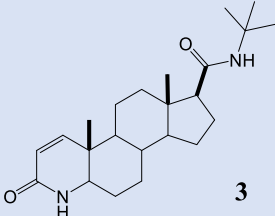
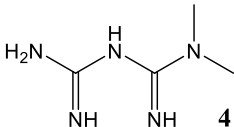
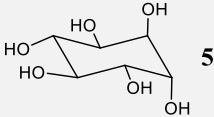
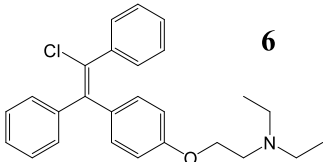
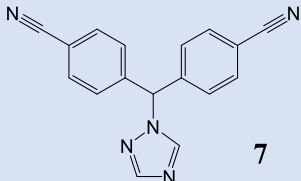


Figura 3. Micrografía representativa de cortes histológicos transversales del útero de ratas Wistar teñidas con H&E, indicando las capas que lo forman. Amplificación 4X.

1.2 Tratamiento del SOP

Los tratamientos farmacológicos para el SOP son limitados, destacando que, debido al origen multifactorial de la enfermedad, el diseño de tratamientos basados en un mecanismo de acción para su cura es difícil, debido a esto no existen medicamentos específicos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) o la *Agencia Europea de Medicamentos*; en consecuencia, los tratamientos se centran en el control de los síntomas [6][14]. Entre los fármacos más usados se encuentran las píldoras anticonceptivas (progestágenos y estrógenos) que actúan como regulador hormonal; la metformina, indicada para tratar el sobrepeso y diabetes mellitus tipo II, el cual induce ovulación y regula la menstruación [15]; el inositol, que se indica como regulador de la insulina que también tiene efecto como inductor de ovulación y aumenta los niveles de testosterona; la espironolactona, indicada para tratar hipertensión e insuficiencias cardíacas, en el SOP disminuye el hirsutismo y el acné [16]. Algunos de los medicamentos ya aprobados por la FDA, registrados ya en la base de datos Drug Bank [17] y enfocados únicamente a tratar síntomas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de síntomas de SOP.

Fármaco	Estructura química	Indicación / Acción	Mecanismo de acción
Acetato de ciproterona	 1	Hirsutismo, acné, seborrea	Bloqueador de receptor de andrógenos (RA)
Flutamida	 2	Hirsutismo, acné, regulación hormonal	Bloqueador de receptor de andrógenos (RA)
Finasterida	 3	Hirsutismo	Inhibidor de 5 α -reductasa
Metformina	 4	Hiperandrogenismo, hiperestimulación ovárica, diabetes <i>mellitus</i> tipo II	Inhibidor de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
D-quiro-Inositol	 5	Sensibilizadores/estabilizadores de insulina	Activador del segundo mensajero de insulina INS2
Clomifeno	 6	Desorden menstrual, inductor de ovulación	Agonista de receptor de estrógenos α
Letrozol	 7	Regulación hormonal (Estrógenos)	Antagonista de citocromo P450

Dado el estrés metabólico ocasionado por el SOP, surgen disregulaciones en la concentración de los aminoácidos (a.a.) en plasma sanguíneo, donde se han encontrado alteraciones en los niveles base de algunos a.a. [18]; además, se ha usado terapia con a.a. esenciales para tratar el hiperandrogenismo de pacientes con SOP obteniendo buenos resultados [19].

1.3 Dianas objetivo

El conocer las múltiples rutas metabólicas involucradas en el desarrollo del SOP hace posible la búsqueda de nuevos fármacos que puedan contrarrestar las disregulaciones de la enfermedad e inclusive prevenir el padecimiento. Dentro de estas rutas, se han encontrado proteínas de membrana y reguladores intracelulares de células, tanto del útero como de los ovarios, como son: RE α , RE β , RA, RP, MARRS, Il-6, CSP-3, CD95 y VEGF.

1.3.1 Receptor de estrógenos α y β (RE α y RE β)

En el útero, el desarrollo y función del endometrio dependen de la secreción cíclica de hormonas sexuales y de la expresión de sus receptores afines. La proliferación y la diferenciación del endometrio está regulada por estrógenos y a su vez, las acciones del estrógeno están mediadas a través de vías del receptor a estrógenos nucleares (RE α y RE β), regulación que de verse afectada puede dar lugar a cáncer endometrial (Figura 4). Los dos RE parecen tener efectos biológicos opuestos en el endometrio. El RE α promueve la actividad mitogénica y por lo tanto, la proliferación, mientras que RE β protege el endometrio de acciones no deseadas de la estimulación de RE α [20]. Las acciones estrogénicas en el endometrio dependen de la co-expresión de ambos receptores por la relación RE α /RE β y las disregulaciones que ocurren en el SOP.

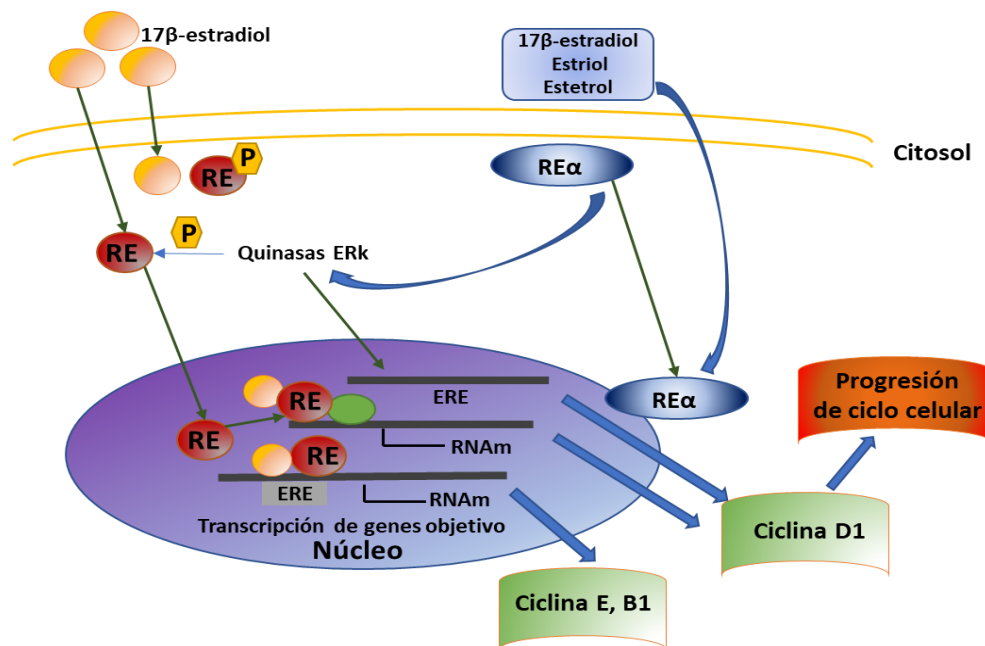


Figura 4. Célula endometrial, vías de señalización de diferentes estrógenos involucrados en el desarrollo de cáncer de endometrio debido a disregulaciones causadas por SOP. RE: Receptor de estrógenos; ERE: Elementos de respuesta a estrógenos. Tomado y modificado de [21].

1.3.2 Receptor de andrógenos (RA)

El receptor de andrógenos es un receptor a hormonas sexuales que implica múltiples efectos en la regulación hormonal. Diversos estudios genéticos demuestran cambios importantes en los niveles de expresión y la presencia de polimorfismos que favorecen el desarrollo del SOP por desregulaciones que conducen a la hiperandrogenemia, directamente relacionada al receptor de andrógenos que clínicamente se manifiesta como acné e hirsutismo, entre otros (Figura 5) [22].

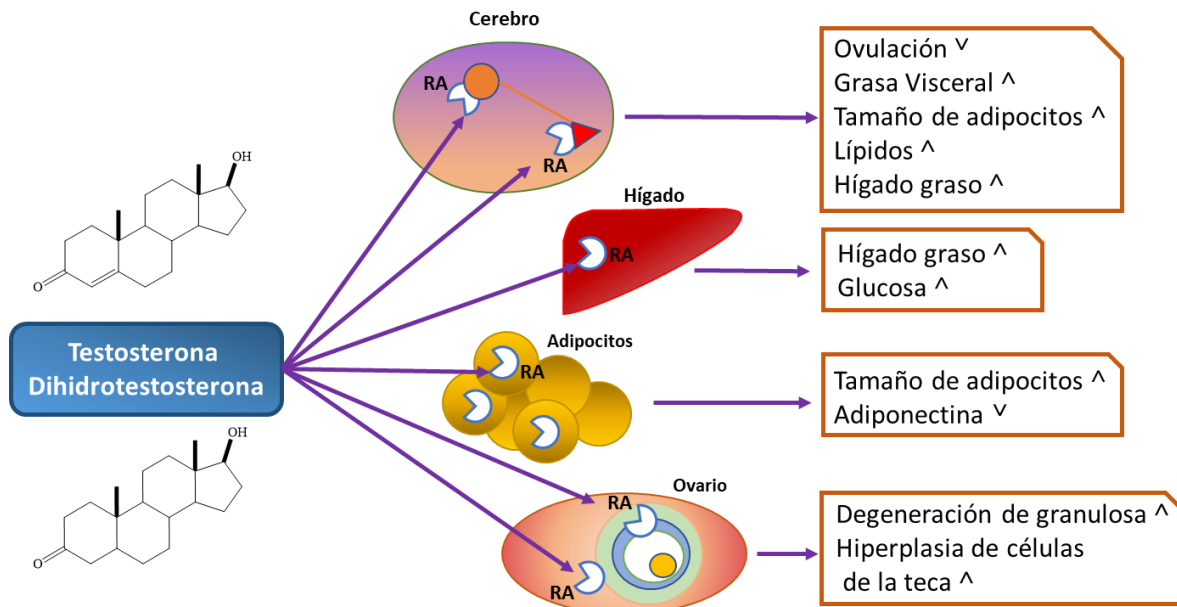


Figura 5. Efectos de testosterona y dihidrotestosterona por la unión al receptor de andrógenos (RA).
^ : Incremento; ↓ : Decremento. Tomado y modificado de [23].

1.3.3. Receptor de progestágenos (RP)

Es un receptor relacionado íntimamente con el desarrollo embriológico, reproducción, crecimiento, diferenciación tisular y homeostasis hormona dependiente. En el endometrio, este receptor regula la integrina que en el embarazo juega un papel importante para que el embrión humano se pueda implantar en el útero, por lo que el SOP ocasiona problemas de fertilidad dadas las desregulaciones [24][25].

1.3.4 Proteína de unión a esteroides de respuesta rápida asociada a membrana (MARRS)

MARRS es una proteína de la membrana de respuesta rápida, cuyo principal activador es la vitamina 1,25-dihydroxy D₃, la cual posee similitud conformacional a diversas moléculas, como la diosgenina y sapogeninas en general. Se ha estudiado la activación de esta proteína mediante diosgenina, mostrando efectos antitumorales y antiinflamatorios causados por factores de necrosis tumoral, que se logra por la activación de MARRS [26]. Además, en estudios de Alzheimer en modelo de ratón, la diosgenina mejoró significativamente la memoria de reconocimiento de objetos, concluyendo que la diosgenina es activador de MARRS [27]. Al ser un receptor de esteroides de la membrana, se torna de interés la búsqueda de esteroides derivados y su relación con el SOP como diana farmacológica importante.

1.3.5 Caspasa 3 (CSP-3)

Las caspasas son proteínas claves en la apoptosis y, por ende, se ha estudiado muy ampliamente en la cascada de señalización que podría actuar contra el cáncer dada la búsqueda de intervenir en los procesos de apoptosis específica de las células cancerosas (Figura 6). En el SOP, hay hiperplasia endometrial mientras que, en ovario, las desregulaciones en la apoptosis favorecen la formación de quistes, por lo que receptores de la señalización a apoptosis son indeseables [28].

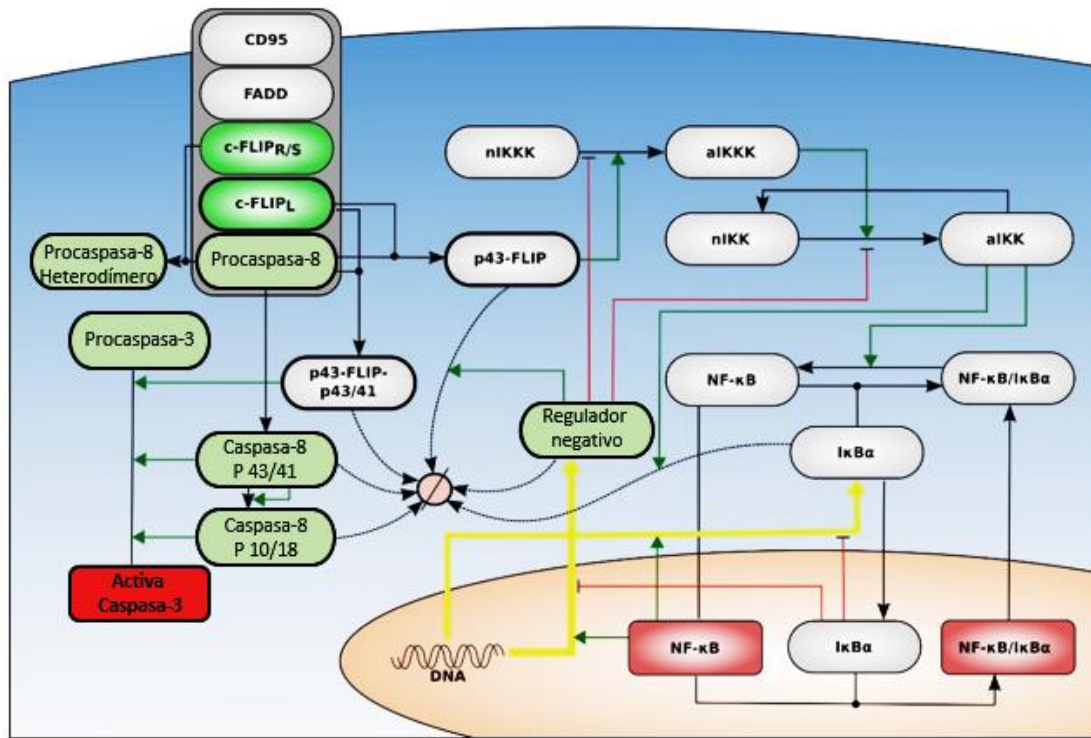


Figura 6. Vías de señalización para la activación de caspasa 3 en apoptosis interviniendo CD95. Tomado y modificado de [29].

1.3.6 Inductor de apoptosis CD95 (CD95)

La proteína de membrana CD95 es un inductor de la apoptosis que, al activarse, produce diversas respuestas de muerte celular por vía de caspasa 3 (Figura 6). También se ha estudiado ampliamente en células cancerígenas [30], sin embargo, esta proteína se asocia a irregularidades en ovarios, específicamente, en las células de la granulosa que tiende a generar apoptosis, por alteraciones en los niveles de CD95, induciendo también apoptosis en los folículos en desarrollo y por lo tanto interfieren en la ovulación [31].

1.3.7 Interleucina-6 (Il-6)

La interleucina 6 regula procesos metabólicos relacionados con la inflamación, como en el SOP que hay inflamación crónica, en un grado bajo pero presente, cuya condición aumenta por patologías relacionadas como la obesidad, diabetes mellitus tipo II y por la resistencia a la insulina (Figura 7), razón por la cual se vuelve objeto de estudio, principalmente con la inhibición de ella al encontrarse niveles elevados en pacientes con el SOP [32].

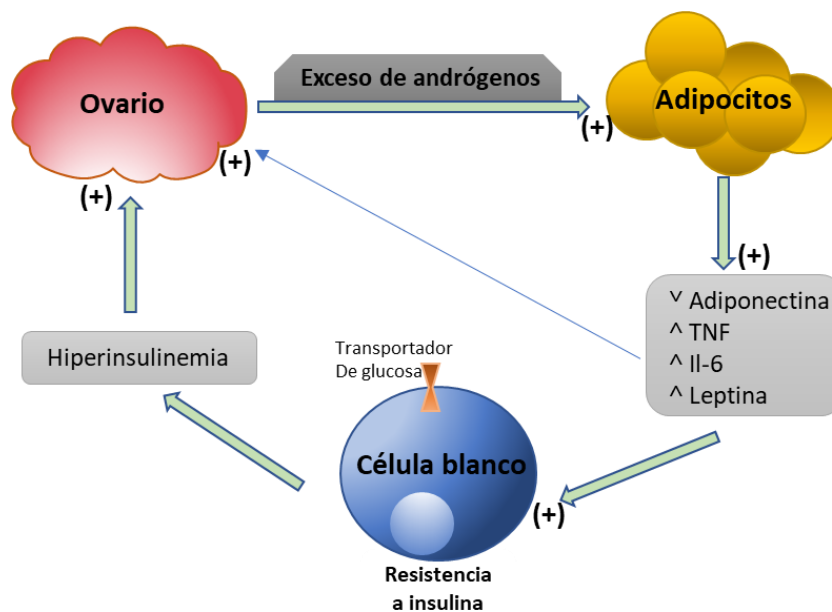


Figura 7. Diagrama del efecto general de interleucina 6 en los ovarios.
 $\wedge$: Incremento; $\vee$: Decremento. Tomado y modificado de [6].

1.3.8 Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

Es un factor pro-angiogénico, es decir, favorece la formación y crecimiento de los vasos sanguíneos; dentro de estos tenemos 5 familias, siendo importantes todas para el desarrollo folicular, desarrollo de endometrio y también del embrión. Cuando existen anomalías en la angiogénesis ovárica se relacionan al desarrollo de la patología del SOP, principalmente a la endometriosis, razón por la cual la regulación de dicho factor es importante para evitar anomalías en el desarrollo del endometrio y el progreso de la enfermedad [33].

1.4 Hormonas y su regulación

En el SOP, las hormonas juegan un papel importante, ya que son mensajeros químicos que regulan funciones de crecimiento, metabolismo y reproducción [34]. Hipócrates propuso que el cuerpo tenía 4 humores o fluidos corporales: la sangre, la flema, la bilis amarilla y la bilis negra (Figura 8), y que cuando había desequilibrio en alguno de ellos surgía enfermedad [35]. En 1902, Bayliss y Starling describieron por primera vez la secretina, denominada como la “primera hormona” y con esto se acuña el término *hormona*, definiéndola en ese entonces como una sustancia química producida por glándulas endocrinas que son liberadas a la circulación sanguínea hasta alcanzar órganos y tejidos diana sobre los que actúan, definición que con el paso del tiempo se ha ido actualizando, y actualmente es aceptado que las hormonas son sintetizadas por diferentes células ajenas a glándulas endocrinas y que no todas son liberadas al torrente sanguíneo si no que poseen diferentes sitios de acción y regulación, sumado a la existencia de otras moléculas como factores de crecimiento o neurotransmisores [36]. Siempre se ha buscado la comprensión del funcionamiento biológico a nivel celular y molecular del cuerpo humano, así como de sus patologías, buscando principalmente formas para contrarrestarlas, siendo a la fecha que se sigue en búsqueda de esto debido a la complejidad y dificultad para estudiarlas y comprenderlas.



Figura 8. Los cuatro humores de Hipócrates.

Las hormonas se pueden clasificar según su estructura, teniendo un primer grupo que abarca las hormonas peptídicas, formadas por una o dos cadenas proteicas de tamaño variable producidas por glándulas como el hipotálamo, la hipófisis, paratiroides y páncreas; y también péptidos pequeños como la hormona hipotalámica liberadora de la tirotropina formada por tres aminoácidos (a.a.). En un segundo grupo se encuentran las hormonas que derivan de a.a. e incluye a las tiroideas y a las catecolaminas secretadas por la médula suprarrenal. Al tercer grupo lo forman moléculas pequeñas lipofílicas como mineralocorticoides y glucocorticoides, así como también los esteroides tales como andrógenos y estrógenos, que son bio-sintetizados a partir del colesterol (Esquema 1) [34].

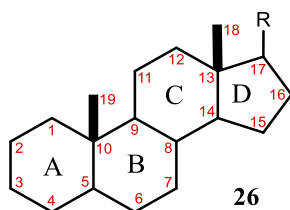


Figura 9. Numeración y clasificación de los anillos del ciclopenta[α]fenantreno.

El colesterol es un buen ejemplo de esteroide, posee una serie de funciones clave en la señalización celular y también en la función estructural en la membrana celular, pero también es utilizado como precursor para la síntesis química de fármacos hormonales y como precursor de algunas sapogeninas, a través de glicosilaciones y oxigenaciones del esqueleto de carbono hacia derivados de furostanol o espirostanol, o los glicoalcaloides que lo utilizan como precursor, incorporando grupos amino y modificaciones en las cadenas, ya sea a nivel biológico o a nivel químico, que da como resultado a diversas familias, destacando a las espirostánicas (Figura 10) por su diversidad de actividades biológicas intrínsecas [39][40].

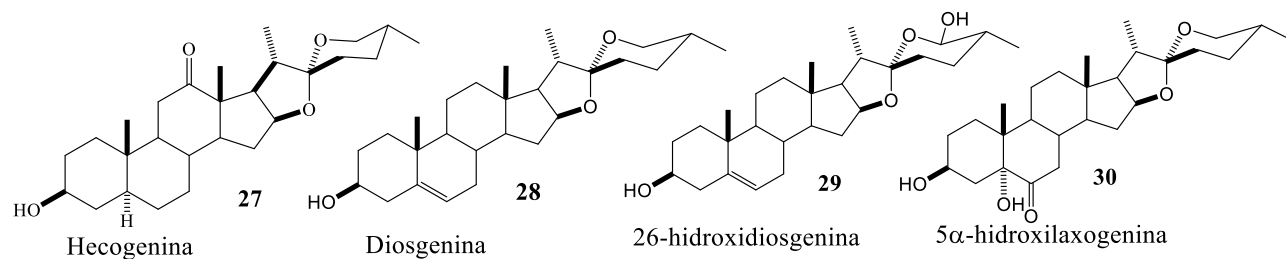
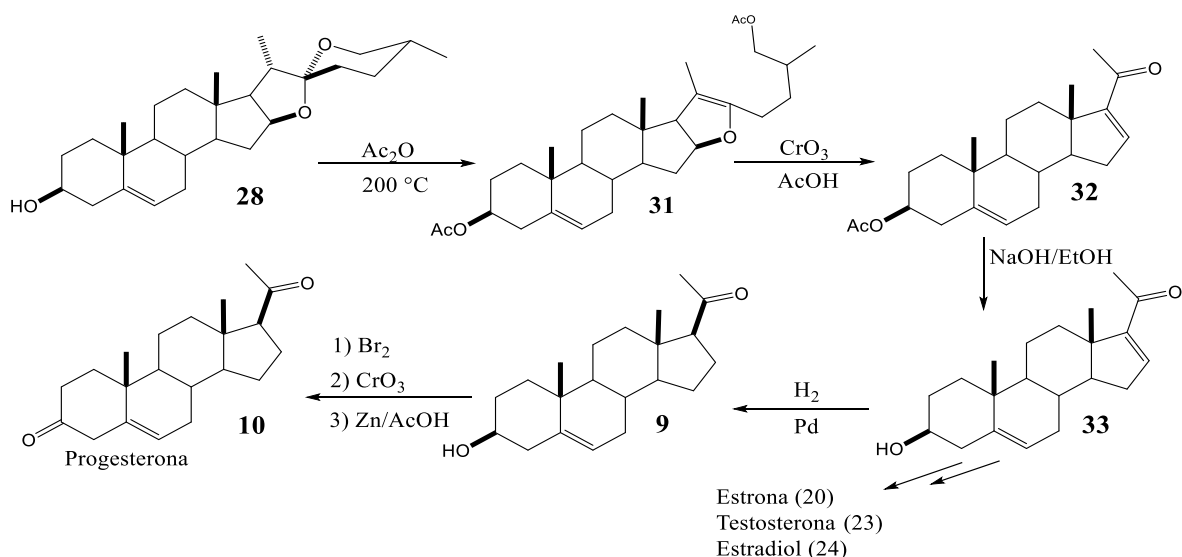


Figura 10. Estructura química de diferentes sapogeninas con importante actividad biológica.

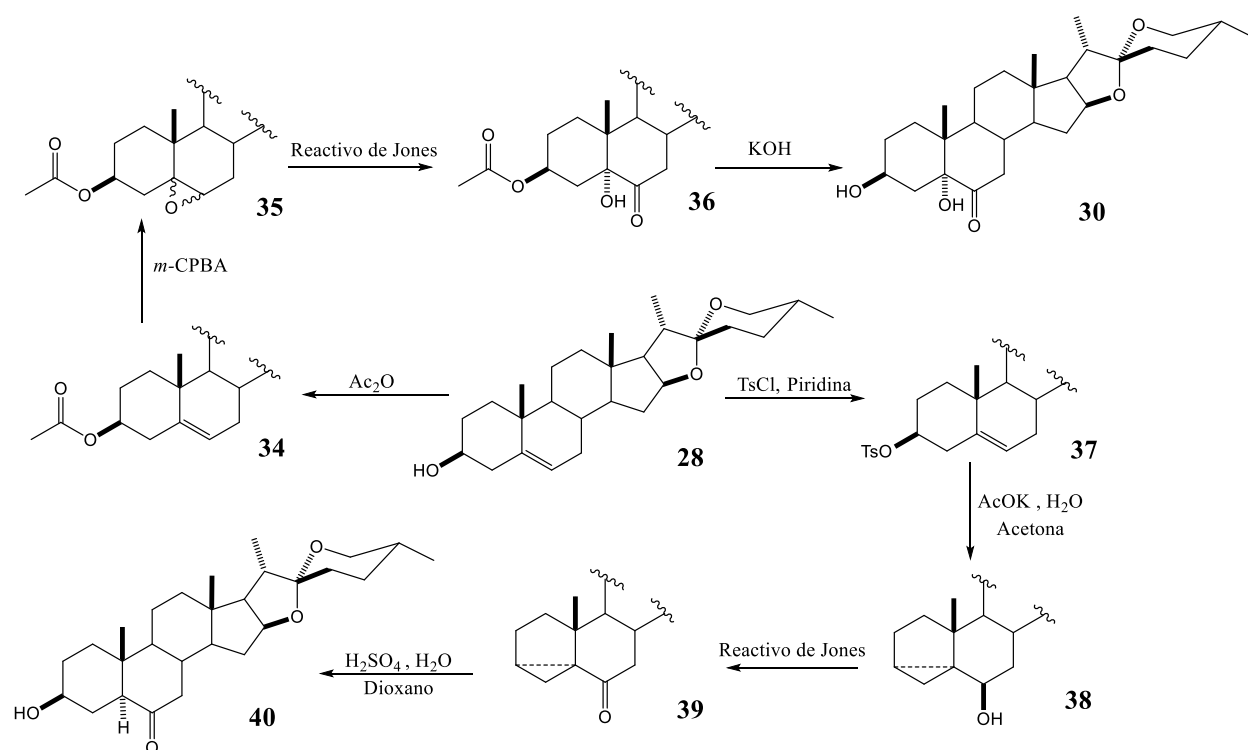
Dentro de las sapogeninas más importantes se encuentra la diosgenina (**Dg**), abundante en especies del género *Dioscorea* como *Dioscorea mexicana* y *Dioscorea composita*, destacando como precursor de hormonas esteroideas comerciales tales como la cortisona, progesterona y pregnanolona, siendo ésta la materia prima utilizada por Russel Marker (Esquema 2) [41][42]. A la fecha sigue siendo objeto de estudio debido a la amplia variedad de aplicaciones que posee junto con derivados modificados de la misma.



Esquema 2. Degradación de Marker. Tomado y modificado de [39][40].

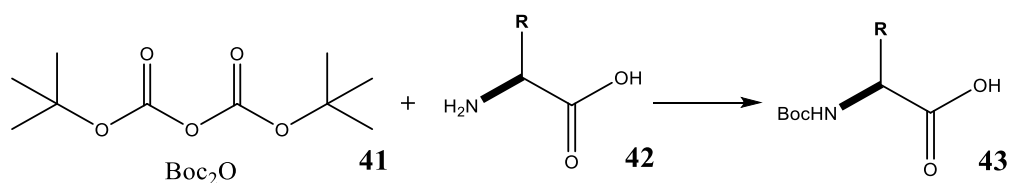
La **Dg** (28) tiene importante valor biológico como promotor de crecimiento vegetal, antiparasitario, antiinflamatorio, en distintos tipos de cáncer hormona y no-hormona dependientes, Alzheimer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y recientemente en SOP [11][45][46][47]. En ratones, la **Dg** aumenta el número de folículos primarios en ovario, y también en los niveles de la hormona antimülleriana, la cual es considerada como indicador de buena función ovárica [48]. También, en ratas, 28 disminuye la concentración de glucosa en la sangre, probando tener efecto como antidiabético, efecto positivo tras la correlación estrecha entre diabetes y SOP [49]. Además, en útero de ratas, se ha encontrado que aumenta los niveles de progesterona, estradiol y metaloproteinasas en el endometrio, un efecto protector de **Dg** al útero de las ratas [50]. Además, en ratas, la administración de 28 y 26OHDg (29) aumenta el número de cuerpos lúteos y folículos sanos en ovarios, y disminuye la presencia de quistes ováricos, mientras que en el útero disminuyó el número de glándulas y la hipertrofia endometrial [11], haciendo de este modo a la **Dg** de interés como posible tratamiento, recalcando que la obtención de nuevos derivados por modificaciones químicas es una buena alternativa para obtener nuevos reguladores del desarrollo celular [47]; esto dado que se pueden realizar modificaciones puntuales teniendo como ejemplo el previo mencionado, que con la adición del hidroxilo en posición 26 a **Dg** presenta efectos positivos contra el SOP [11].

Por otro lado, la laxogenina (40), es una sapogenina esteroideal al igual que la **Dg**, precursora de brasinoesteroides cuyo proceso de extracción original es de *Smilax sieboldii*, presenta alta actividad biológica como promotor de crecimiento vegetal y agente anticancerígeno [16], siendo interesante el grupo cetónico que presenta en la posición C-6 a diferencia de la **Dg** que presenta un doble enlace en la misma posición, siendo el grupo cetónico una especie más reactiva. La desventaja del uso de 40 y derivados como laxogenina hidroxilada en la posición 5 (30), recae en la baja biodisponibilidad en material vegetal, lo que dificulta su obtención, entrando en este campo la semi-síntesis como una alternativa viable, como se observa en el esquema 3, con el que se puede obtener 40 y 30 a partir de la sapogenina **Dg** (28), la cual se extrae en buenos rendimientos de materia vegetal [51].



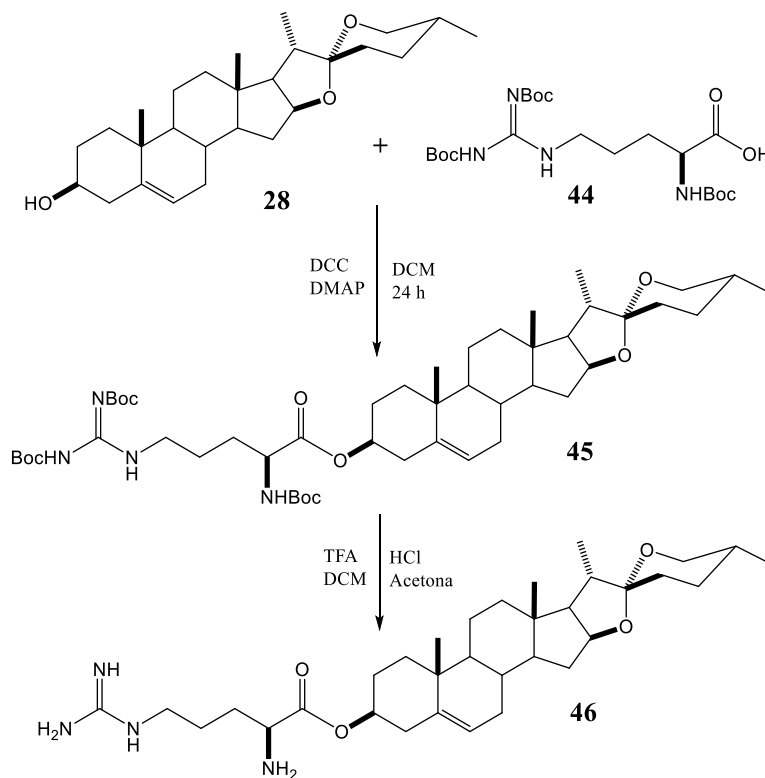
Esquema 3. Semi-síntesis de laxogenina (40) y 5α-hidroxilaxogenina (30). [52] [53].

Una posición recurrente en las moléculas esteroidales es el hidroxilo en C-3 el cual da pauta a un sinnúmero de modificaciones, como puede ser la esterificación, reacciones que implican la formación de un grupo funcional éster, entre un grupo funcional carboxílico y un grupo alcohol, lo cual permite la “unión” de moléculas complejas que poseen dichos grupos funcionales. Los ésteres y procesos de obtención de estos son conocidos desde hace tiempo. La demanda mundial de los ésteres ha crecido enormemente; adicionalmente se empiezan a utilizar ésteres muy específicos de estructura compleja para emplearlos en materiales muy definidos. Constantemente se obtienen ésteres de materias primas antes no utilizadas, superando la dificultad para hacerlas reaccionar bajo las condiciones de esterificación tradicionales [54], por ejemplo, la esterificación de sapogeninas esteroidales o inclusive de aminoácidos (a.a.) para diversas aplicaciones. Los a.a. son una clase importante de compuestos orgánicos, ya que las proteínas están formadas por una secuencia de a.a. unidos covalentemente entre sus grupos amino y carboxilo por un enlace peptídico formando cadenas que se pliegan hasta formar estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, dándole la forma tridimensional específica, a través de la cual podrá funcionar como enzima para catalizar una infinidad de reacciones distintas [44][45]. A nivel sintético se tienen reportes de que en 1987 se sintetizaban ya al menos 18 a.a. protegidos, pero con bajos rendimientos debido a la poca selectividad; debido a esto, con el grupo amino protegido se realizan reacciones específicas y dirigidas, denotando que es necesario la protección de este grupo para dicho propósito, en cuyo reporte se usó *tert*-butildicarbonato reactivo (Boc₂O) (41) con bastante éxito (Esquema 4), siendo este tipo de reacciones químicas enfocadas actual y principalmente a la síntesis de una gran variedad de péptidos [57][58].



Esquema 4. Reacción para la protección de grupos amino en a.a. mediante BOC_2O .

Recientemente se ha desarrollado otra línea de investigación para obtener aminoácidos combinados con esteroides a través de reacciones de esterificación y oxidación. Se tienen reportes de una serie de compuestos con actividad antiinflamatoria y anticancerígena probadas en ratas basados en derivados de diosgenina esterificados con lisina, acetato de lisina, histidina, acetato de lisina-glicina, acetato de arginina-glicina y acetato de histidina-glicina [59]. También se tienen reportes donde se realizó la esterificación en el hidroxilo en posición 3 de la diosgenina (**28**) con arginina (**44**) mediante el uso de BOC_2O , DCC y DMAP obteniendo buenos rendimientos, derivado con potencial en la ingeniería de tejidos de hueso (Esquema 5) [60]. Debido al potencial que tienen los derivados aminoacídicos de diosgenina y las pocas investigaciones realizadas, surge el interés de desarrollar esta rama con distintos aminoácidos y también distintos esteroides y sapogeninas para ser probados en distintas áreas de la medicina como lo es el síndrome de ovario poliquístico.



Esquema 5. Obtención de derivados de diosgenil-arginina. Tomado y modificado de [60].

1.6 Herramientas de diseño *In Silico*

La invención y desarrollo de la informática trajo también mejoras en el ámbito científico, surgiendo nuevas técnicas y dando paso al desarrollo de programas basados en algoritmos procesados por una computadora que permitían el análisis de una gran cantidad de datos en muy poco tiempo, permitiendo predicciones de ciertos fenómenos basados en experimentos reales. Una de estas herramientas bioinformáticas son los estudios de acoplamiento molecular (EAM) o “Docking”, que simulan computacionalmente el proceso de unión o acoplamiento entre una molécula y una proteína, en un sitio específico asignado y acorde a la disposición espacial, generándose una energía de afinidad específica que permite predecir interacciones y por ende, un posible efecto farmacológico [61][62]. Además, es de igual importancia conocer el comportamiento de nuevas moléculas en el organismo, surgiendo así SWISS ADME, programa que realiza predicciones de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (administración, distribución, metabolismo y excreción) de un fármaco tras ser administrado, basándose en una retroalimentación de la relación que guarda una estructura molecular con sus propiedades farmacológicas [63].

Han surgido más de 60 programas de acoplamiento molecular para ámbitos académicos y comerciales, además, el número de investigaciones utilizando herramientas *in silico* va en aumento gracias al gran potencial en el desarrollo de nuevos fármacos [64]. Un ejemplo, es la investigación de derivados de pirazolina buscando efectos contra la malaria combinando EAM y SWISS ADME donde se corrobora, por evaluación biológica, que la predicción de herramientas *in silico* es efectiva. El campo de moléculas esteroidales como hormonas o sapogeninas no ha sido muy estudiado con estas herramientas, además, existen contados reportes de su uso en SOP, teniendo como ejemplo un análisis de estradiol, anfetamina y derivados nuevos contra una globulina de unión a hormonas sexuales, siendo el análisis *in silico* de gran utilidad [65]; en otro reporte se evaluó a la Dg y 26OHDg en ovario y útero de ratas Wistar con SOP mostrando potencial de mejoría, en donde los EAM permitieron reforzar el resultado [11].

A lo largo del tiempo, la obtención y producción de moléculas de interés farmacológico se ha llevado a cabo mediante síntesis química, que ha jugado un papel fundamental en la industria farmacéutica, agrícola, alimentaria, entre muchas otras [39]. Actualmente se busca hacer uso de la medicina tradicional, con fundamentos científicos para aislar e identificar moléculas específicas como principios bioactivos útiles. De esta manera, se da un enfoque de investigaciones hacia los productos naturales obtenidos de seres vivos, especialmente de plantas y la modificación química de los mismos, con la finalidad de obtener nuevos compuestos con aplicaciones concretas, como antimicrobianos, citotóxicos, antitumorales, insecticidas, antiinflamatorios, analgésicos, hemolíticos, antimicóticos, sedantes, entre otras [41][66]. Por esto, surge el interés de una semi-síntesis orgánica dirigida mediante herramientas *in silico* (EAM, SWISSADME) y posteriormente su síntesis y evaluación biológica para corroborar las predicciones, siendo interesante el uso de sapogeninas para la obtención de nuevos derivados con potencial actividad biológica como la 5 α -hidroxilaxogenina (**30**) y además, obtener derivados modificando su estructura al incorporar aminoácidos esenciales como el triptófano, derivados de interés por el historial de actividad biológica descrito previamente, razón por la cual se realizó la presente investigación en búsqueda de moléculas efectivas contra el SOP.

2. OBJETIVOS

Principal

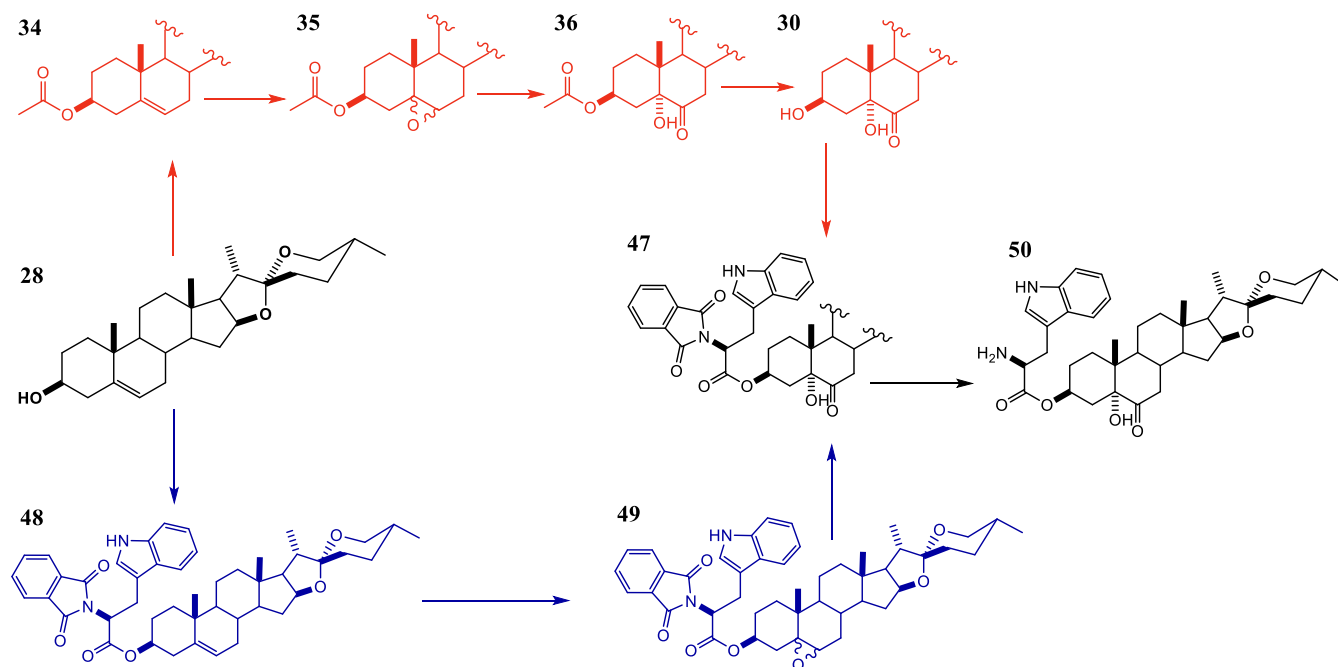
- ❖ Diseñar y sintetizar derivados de la 5 α -hidroxilaxogenina contra el síndrome de ovario poliquístico en modelo de rata Wistar.

Específicos

- ❖ Determinar las energías de afinidad de los derivados propuestos contra blancos moleculares relacionados con el síndrome de ovario poliquístico.
- ❖ Realizar estudios ADME de los derivados sintéticos propuestos.
- ❖ Seleccionar derivados para su síntesis dirigida, con base en los estudios de acoplamiento molecular y ADME.
- ❖ Sinterizar nuevos derivados esteroideos por reacciones de esterificación y oxidación selectiva.
- ❖ Seleccionar candidatos para evaluación biológica contra el síndrome de ovario poliquístico en ratas, con base en los estudios *in silico* y de síntesis.
- ❖ Evaluar los efectos biológicos de los derivados seleccionados en el útero de ratas con síndrome de ovario poliquístico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Considerando que aún no hay tratamientos específicos contra el SOP, hemos estudiado dianas moleculares por técnicas de acoplamiento molecular para diseñar y seleccionar candidatos. A partir de diosgenina (**28**) diseñamos dos rutas de reacción (Esquema 6) y mediante estudios *in silico* de acoplamiento molecular y ADME fueron seleccionados candidatos para su posterior síntesis, y de los mismos, seleccionamos compuestos para evaluación biológica en ratas con SOP inducido.



Esquema 6. Rutas de síntesis propuestas: A (roja) y B (azul).

3.1 Estudio de acoplamiento molecular

El estudio de acoplamiento molecular permitió obtener la afinidad de la molécula a la proteína, ya sea en un sitio activo conocido previamente o en toda la estructura, esto con la finalidad de predecir el comportamiento de dichas moléculas y la posible actividad biológica que tendría. Con esta tecnología y en base a lo reportado en la bibliografía obtenida de la base de datos “*Protein Data Bank*” (PDB) [67], fueron seleccionadas nueve posibles dianas farmacológicas relacionadas con el SOP, concentradas en la tabla 2; posteriormente se prepararon los archivos para los estudios de acoplamiento molecular y así obtener las energías de afinidad específicas para cada proteína debido a las fuerzas intermoleculares formadas, después analizamos y seleccionamos los candidatos para la síntesis y evaluación biológica.

Tabla 2. Selección de proteínas blanco para el estudio de acoplamiento molecular.

Proteína	Código PDB	Ligando de referencia	Referencia
Receptor de Estrógenos α	1A52	Estradiol	[68]
Receptor de Estrógenos β	5TOA	Estradiol	[69]
Receptor de Andrógenos	2AMA	Dihidrotestosterona (DHT)	[70]
Receptor de Progestágenos	1SQN	Progesterona	[71]
MARRS	3F8U	1,25D ₃ / Diosgenina (Dg) / 26-hidroxidiosgenina (26OHDg)	[72]
Caspasa 3	2XYG	LINGR / Dg / 26OHDg	[11] [73]
Inductor de apoptosis CD95	3EZQ	LY294002 / Dg / 26OHDg	[11] [74]
Interleucina 6	1N26	Dg / 26OHDg	[11] [75]
VEGF	4KZN	Dg / 26OHDg	[11] [76]

Cada una de las proteínas fue validada con ligandos endógenos o no endógenos; destacando a las primeras cinco como receptores hormonales y el resto como factores de inflamación, crecimiento vascular endotelial o relacionados con apoptosis; con la finalidad de correlacionarlos como dianas clave del SOP y fungiendo estos como filtros de selección para nuevos derivados, su síntesis y evaluación biológica.

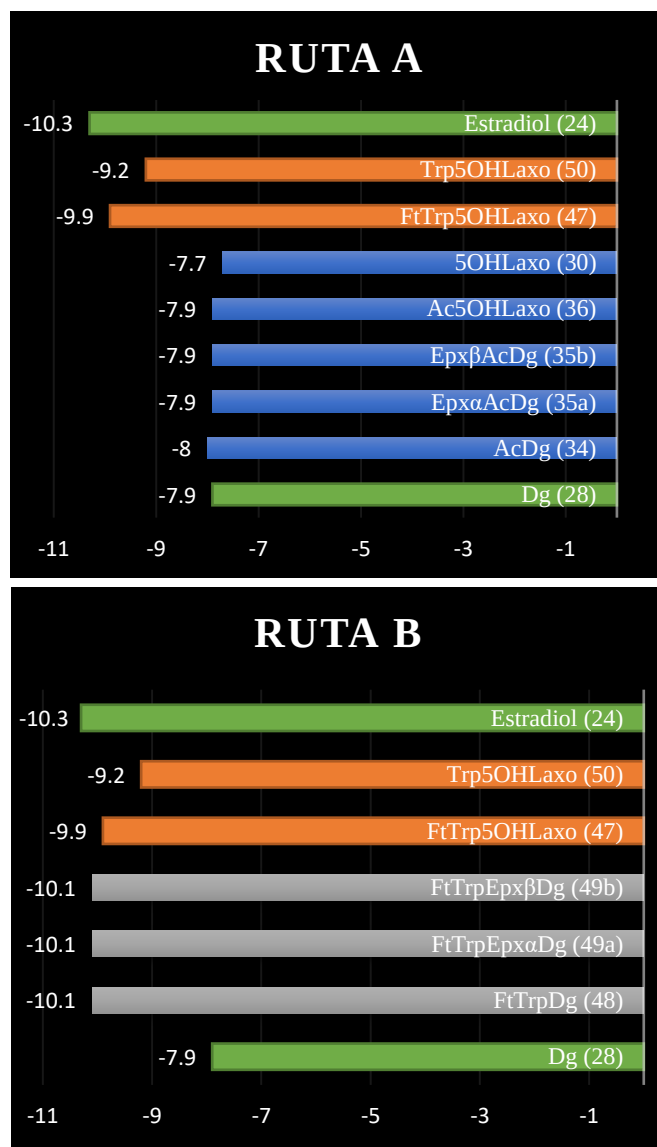
3.1.1 Receptor de estrógenos

El receptor de estrógenos se ha identificado de interés para el SOP dado que regula los efectos en el endotelio vascular, músculo suave y la matriz extracelular, así como también interviene en el desarrollo de folículos ováricos [77]. En pacientes con SOP, el endometrio aumenta su reactividad a esteroides como el estradiol [78], también regula el desarrollo de los folículos, principalmente a través de RE α y β [22] por lo que es importante el estudio simultaneo de ambos receptores.

❖ Receptor de Estrógenos α (RE α)

El acoplamiento molecular (Gráfica 1) sugiere que la ruta **A** no tiene energía óptima de acoplamiento en comparación con el ligando endógeno, mientras que la ruta **B** tiene mejores valores de interacción. La diferencia principal en las rutas es la presencia del aminoácido acoplado, por lo que indica que dicho aminoácido es importante para el acoplamiento molecular, igualmente, al eliminar este grupo protector afectó negativamente a la energía de acoplamiento, siendo indicativo de la necesidad de este grupo químico. En particular para este receptor resultaron de interés los derivados **FtTrpDg (48)**, **FtTrpEpx β Dg (49a)** y **FtTrpEpx α Dg (49b)**, destacando que

no existió diferencia en afinidad entre los epóxidos, por lo que en caso de ser seleccionados sería factible utilizar la mezcla de estos compuestos.



Gráfica 1. Energías de acoplamiento molecular de los derivados esteroidales vs receptor de estrógenos alfa (RE α) (ΔG , kcal/mol).

La mejora en la energía de acoplamiento fue debido a la presencia del grupo ftalamidoil (**Ft**) e indol (**In**), se puede apreciar que estos grupos presentaron mayores fuerzas intermoleculares (Figura 11). En el caso del estradiol, las interacciones fueron con el aminoácido (a.a.) GLU-444 de tipo π -anión, así como interacciones lipofílicas, mientras que los derivados se encontraron en un sitio continuo por la diferencia de aminoácidos. Para el compuesto **FtTrp5OHLaxo (47)**, el grupo **Ft** presentó interacción tipo π -catión con ARG-515, al igual que interacción π - σ con el In y LEU-509. Por otro lado, del triptófano (**Trp**) interactuó con el **In** con enlace π -catión con la ARG-394 de RE α .

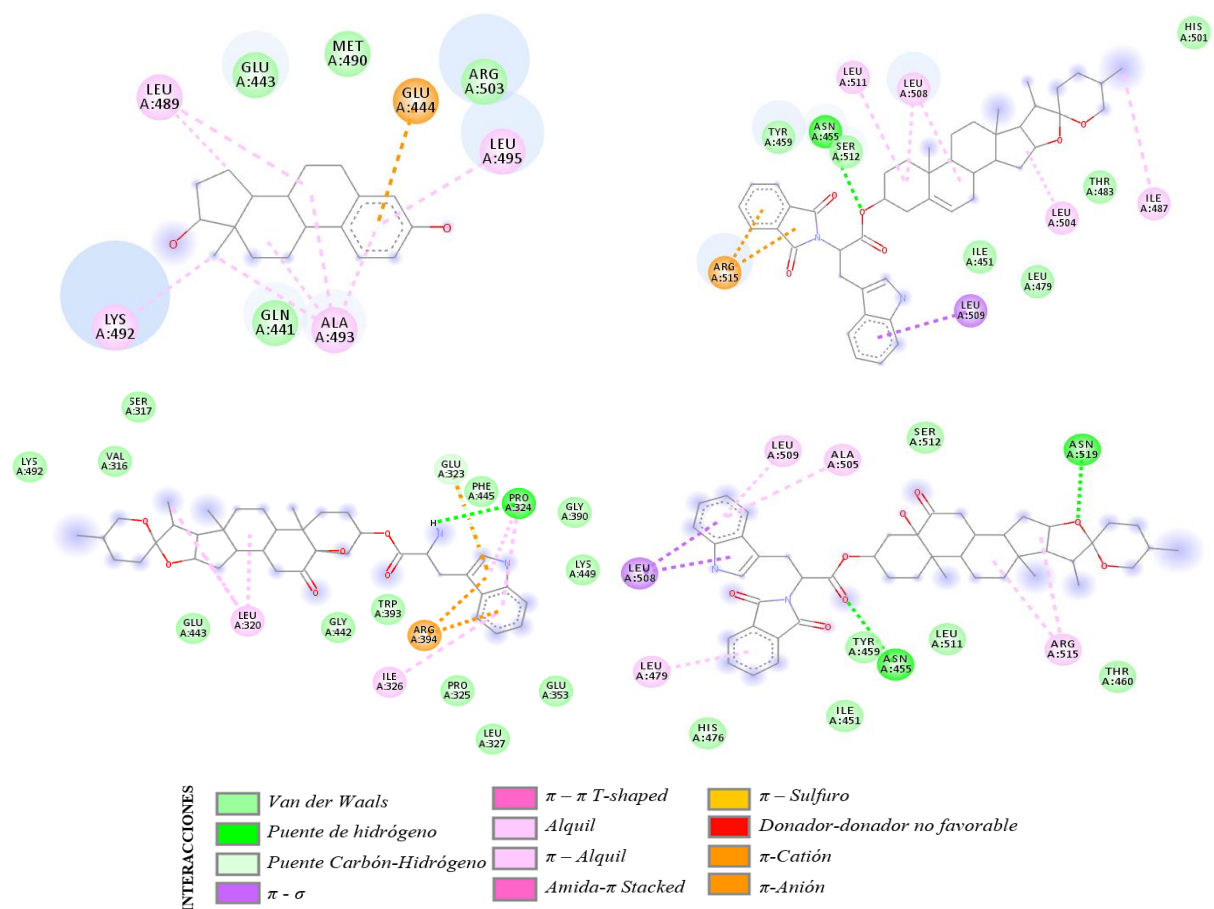
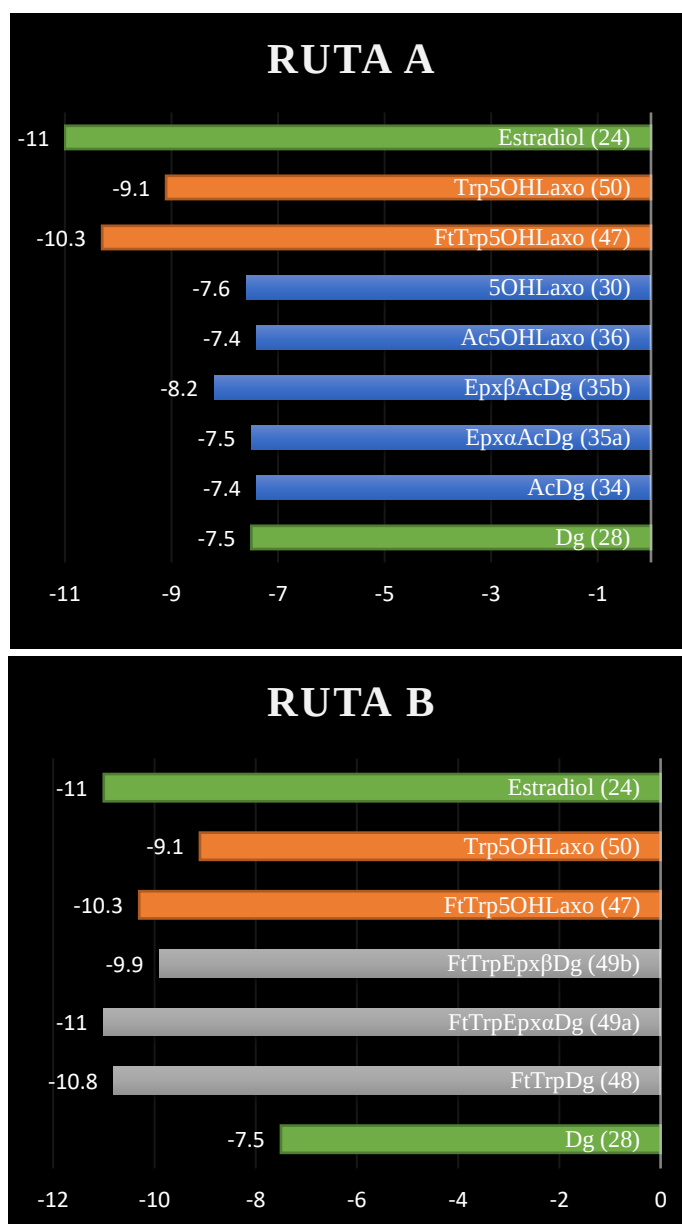


Figura 11. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con el receptor de estrógenos α (RE α).

❖ Receptor de estrógenos β (RE β)

El acoplamiento molecular de ambas rutas para este receptor (Gráfica 2) mostró que los compuestos de la ruta **B** tienen mejor afinidad respecto al ligando endógeno estradiol (**24**), destacando que la presencia del triptófano y el grupo ftalamidato aumentó la afinidad de interacción, puesto que cuando eliminamos el grupo ftalamidato en el paso de **FtTrp5OHLaxo** (**47**) a **Trp5OHLaxo** (**50**) la energía de acoplamiento disminuyó. En la ruta **B**, los derivados **FtTrpDg** (**48**) y **FtTrpEpx α Dg** (**49a**) tuvieron las mayores afinidades; la afinidad del epóxido alfa y beta difiere en este receptor, el efecto observado en ambas rutas, con mayor denotación en la ruta **B**, dado que el epóxido β de **AcDg** y el epóxido α de **FtTrpDg** presentaron mayor afinidad que su estereoisómero opuesto respectivamente, siendo la mayor afinidad reportada para ambas rutas la de **49a**.



Gráfica 2. Energías de acoplamiento molecular de los derivados esteroideos vs receptor de estrógenos beta ($RE\beta$) (ΔG , kcal/mol).

Las moléculas interactuaron con a.a. diferentes al del ligando endógeno estradiol, por lo que difirieron del sitio activo del receptor (Figura 12). La diferencia de las afinidades entre los compuestos con grupos **Ft** e **In** se debió a la presencia de los anillos en sus estructuras y al tamaño de la molécula, dando lugar a la interacción con distintos a.a. del receptor, moviendo el sitio de unión y permitiendo diferentes tipos interacciones. El cambio de posición del epóxido cambió la interacción de ARG-84 en el caso del **FtTrpEpx α Dg (49a)** y TRP-83 para el **FtTrpEpx β Dg (49b)**, dicha interacción particular fue la que cambió el resultado en el valor de la energía de acoplamiento.

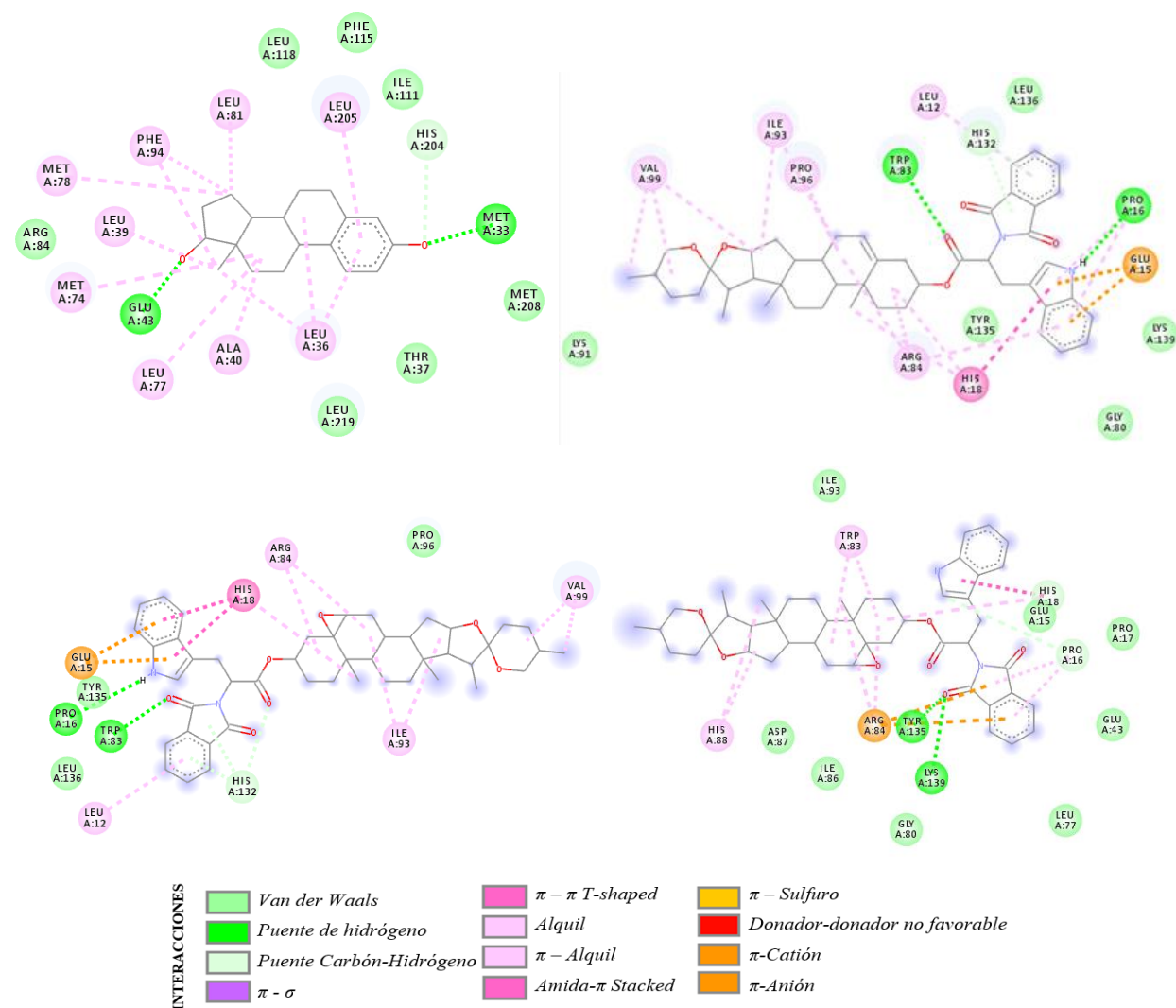
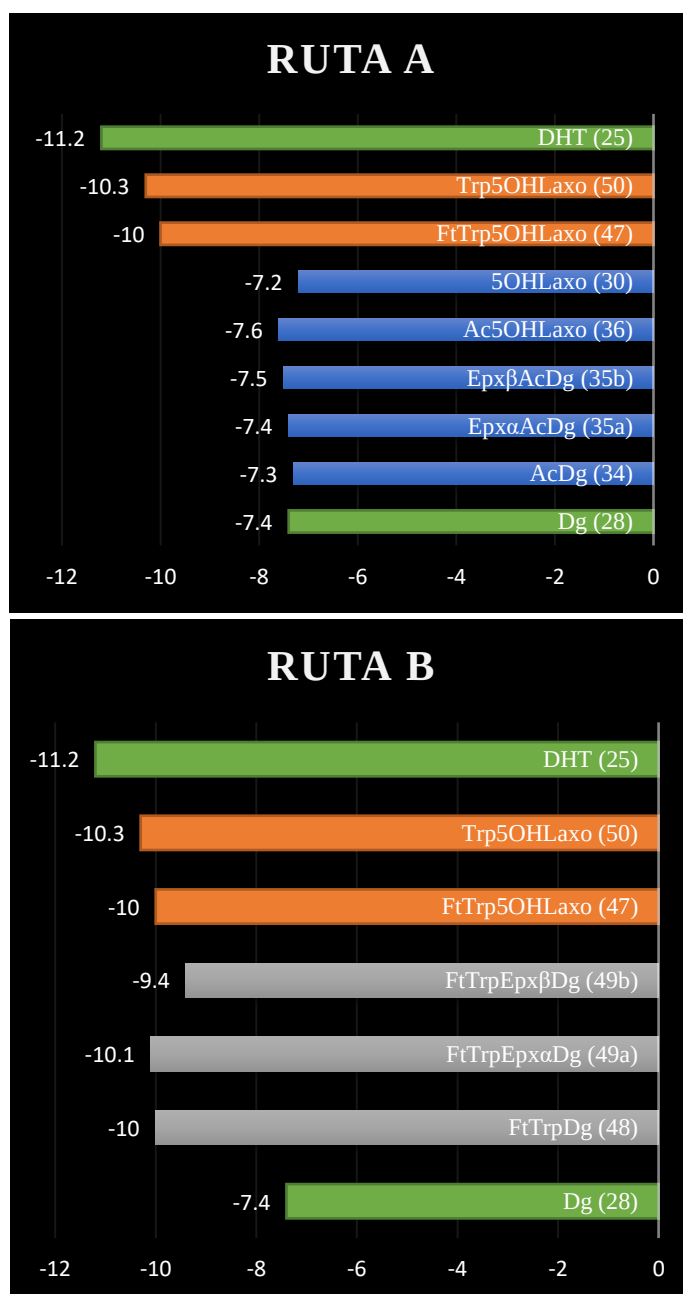


Figura 12. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con el receptor de estrógenos beta ($RE\beta$).

3.1.2 Receptor de andrógenos (RA)

Uno de los criterios para considerar un diagnóstico de SOP es la desregulación hormonal que produce el hiperandrogenismo dado por los altos niveles de androsterona y activación del receptor de andrógenos, haciéndola una proteína clave para la enfermedad [79]. El estudio de acoplamiento molecular (Gráfica 3) mostró la afinidad del ligando natural dihidrotestosterona (DHT) con una afinidad mayor a los compuestos evaluados tanto en ruta **A** como en ruta **B**, siendo la ruta **B** la que presenta mejores afinidades; la **5OHLaxo (30)** presentó la afinidad más baja de los compuestos, seguida por **Dg (28)**. Se observa que para la ruta **A**, la posición en α o β del epóxido de **AcDg** no afectó la afinidad por el receptor al tener resultados muy cercanos, mientras que para el caso de la ruta **B** fue notoria la diferencia en la cual se favoreció la afinidad del epóxido de **FtTrpDg** cuando estuvo en posición alfa.



Gráfica 3. Energías de acoplamiento de los derivados esteroideos vs receptor de andrógenos (RA) (ΔG , kcal/mol).

La modificación del doble enlace para la formación del grupo cetónico en C-4 y el hidroxilo en C-5 permitió la formación de un puente de hidrógeno con TYR-915 para el caso del compuesto **47**, y de este modo aumentó su afinidad. Así mismo, la afinidad aumentó con la presencia del grupo **Ft** para el compuesto **FtTrpDg (48)** al generarse interacciones tipo π -catiónicas y alquílicas con los anillos respectivos, a diferencia de las moléculas que no tuvieron dicho grupo.

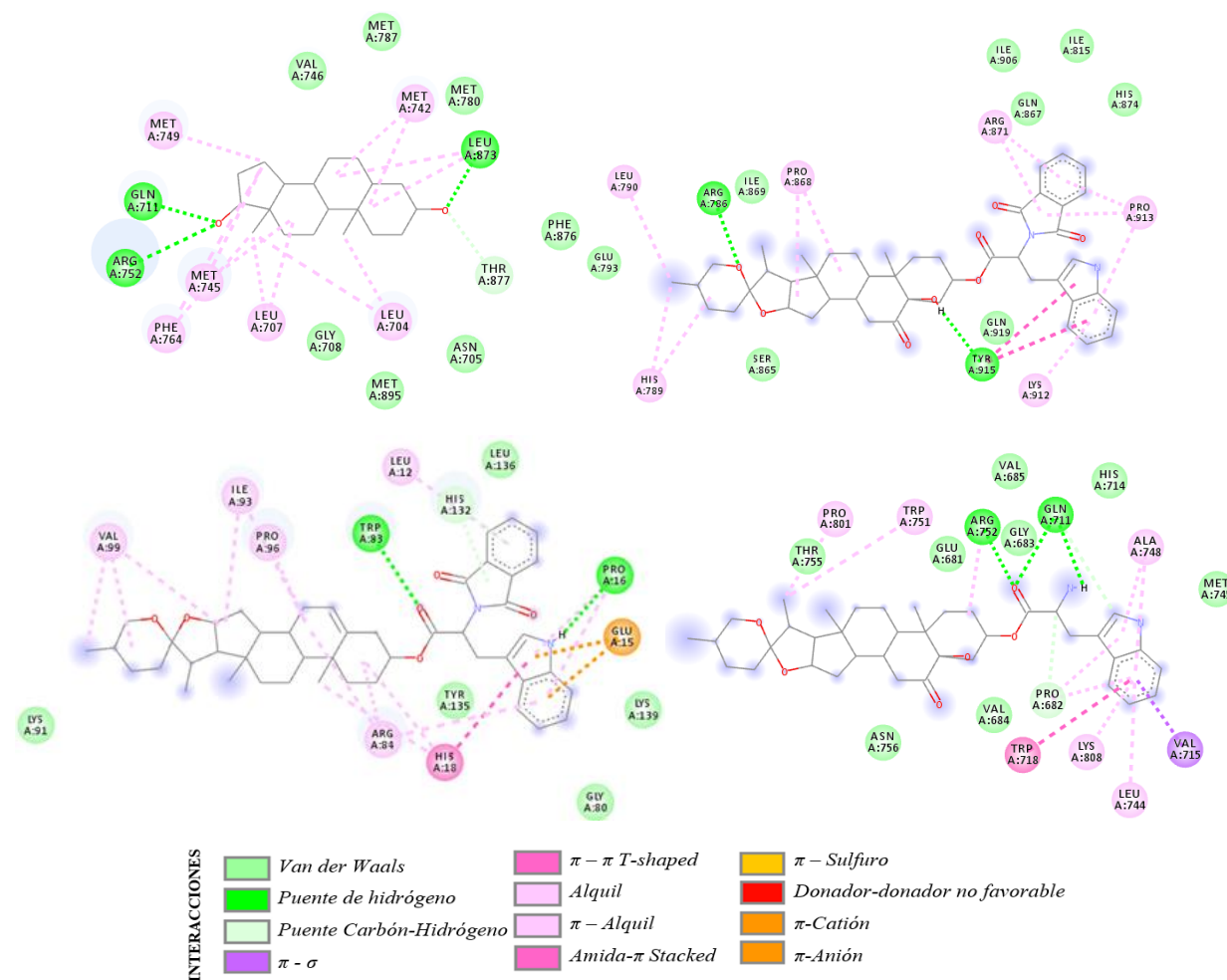
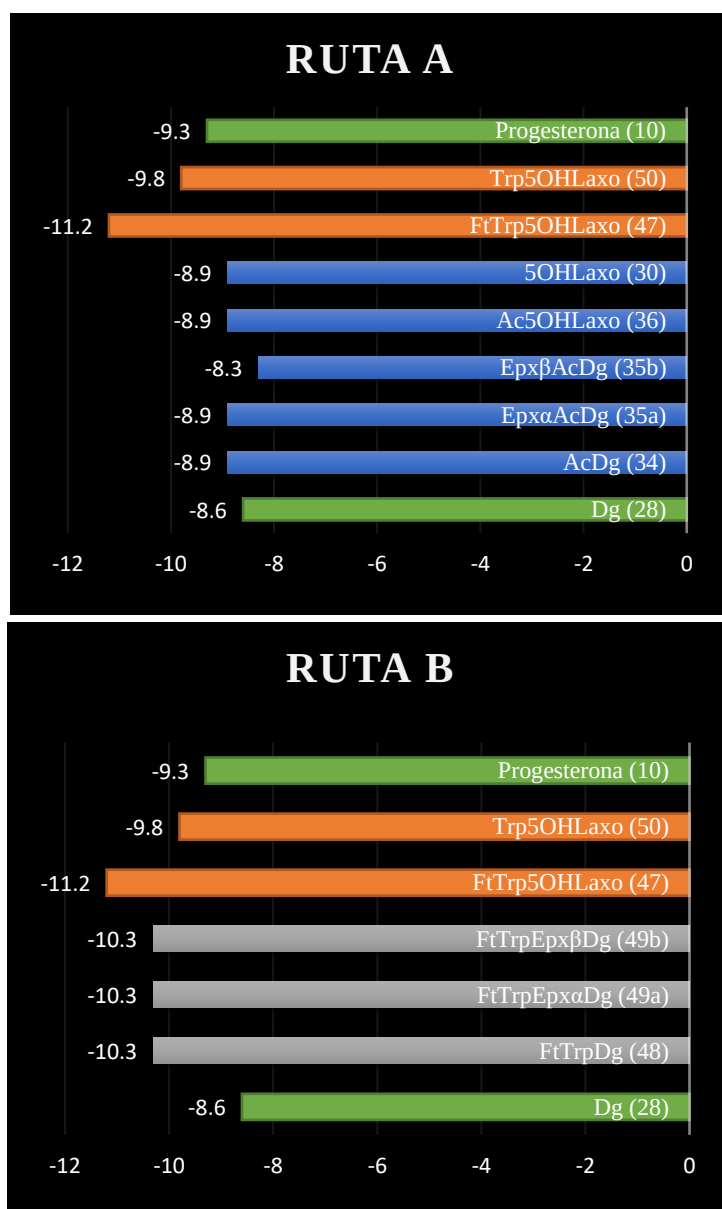


Figura 13. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con el receptor de andrógenos (RA).

3.1.3 Receptor de progestágenos (RP)

El RP es un factor que está íntimamente relacionado al desarrollo del embrión, al crecimiento, diferenciación tisular y homeostasis general hormona dependiente, es un receptor que funciona mediante diversos co-represores y co-reguladores, manteniendo así el nivel de expresión [24]. El ligando natural probado en el estudio de acoplamiento molecular fue la progesterona (**10**) que tuvo energía de afinidad de -9.3 kcal/mol; sin embargo, observamos que los compuestos finales **Trp5OHLaxo** (**50**) y **FtTrp5OHLaxo** (**47**) tuvieron mayor afinidad que el ligando natural, haciéndolos buenos candidatos como posibles inhibidores del RP (Gráfica 4). La afinidad de los compuestos de la ruta **B** tuvieron mayores valores, siendo esta ruta de mayor interés por los compuestos **FtTrpDg** (**48**), **FtTrp5OHLaxo** (**47**) y **Trp5OHLaxo** (**50**). En particular, con los epóxidos de la ruta **A**, el epóxido α presentó mayor afinidad al receptor, mientras que en la ruta **B** los epóxidos presentaron la misma energía de afinidad, lo que indica la facilidad de la molécula a plegarse en esta región e impidiendo interacciones específicas por la presencia del a.a. protegido.



Gráfica 4. Energías de acoplamiento molecular de los derivados esteroideos vs receptor de progestágenos (RP) (ΔG , kcal/mol).

Los aminoácidos (a.a.) de la figura 14 muestran que la modificación para la obtención del grupo cetónico y alcohólico en C-5 y C-6 favorecieron la afinidad al generar puentes de hidrógeno con el receptor a diferencia del doble enlace. La presencia del grupo **Ft** favoreció la formación de puentes de hidrógeno debido a los dos grupos cetónicos del **Ft** como se observa para el compuesto **FtTrpDg (48)**.

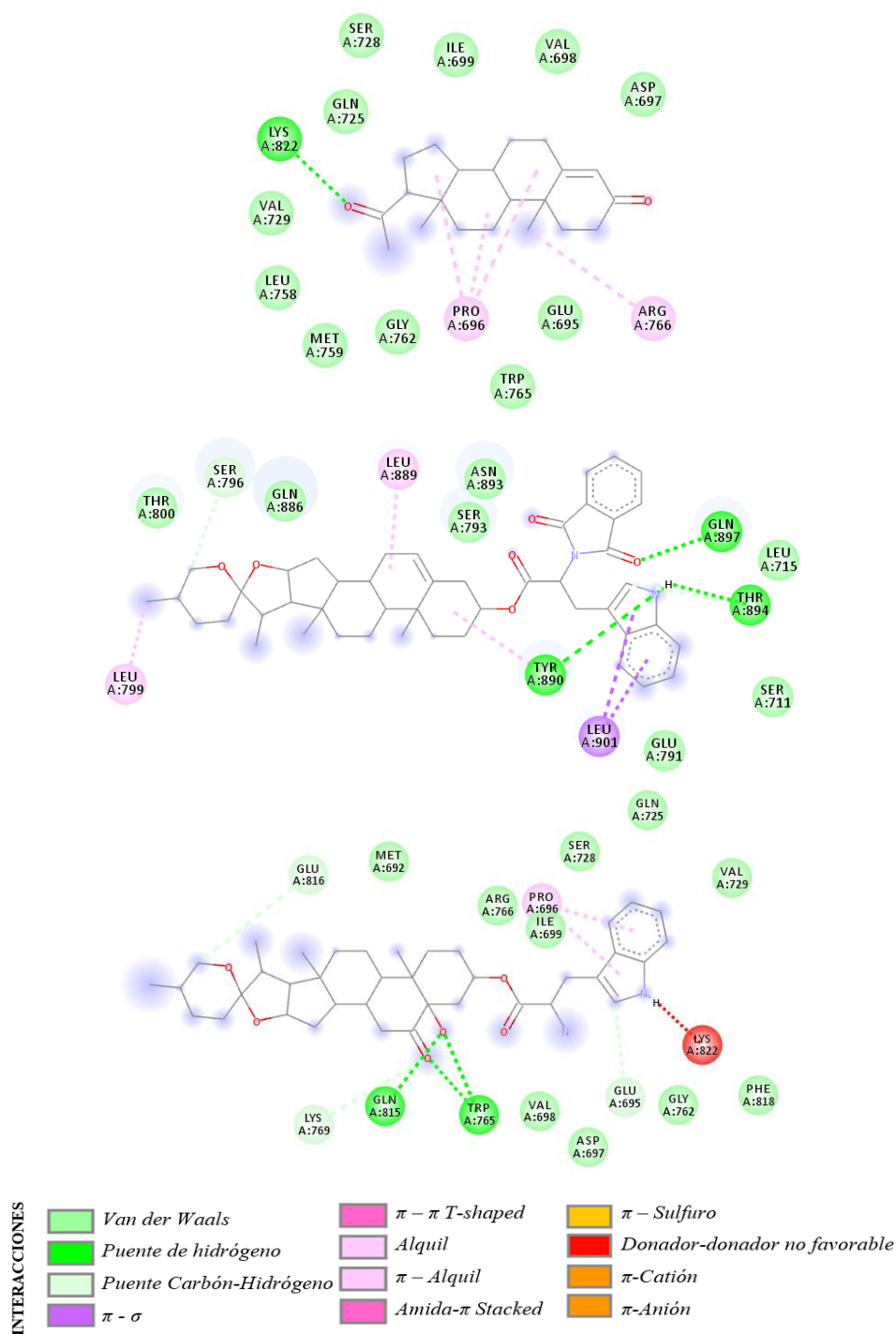
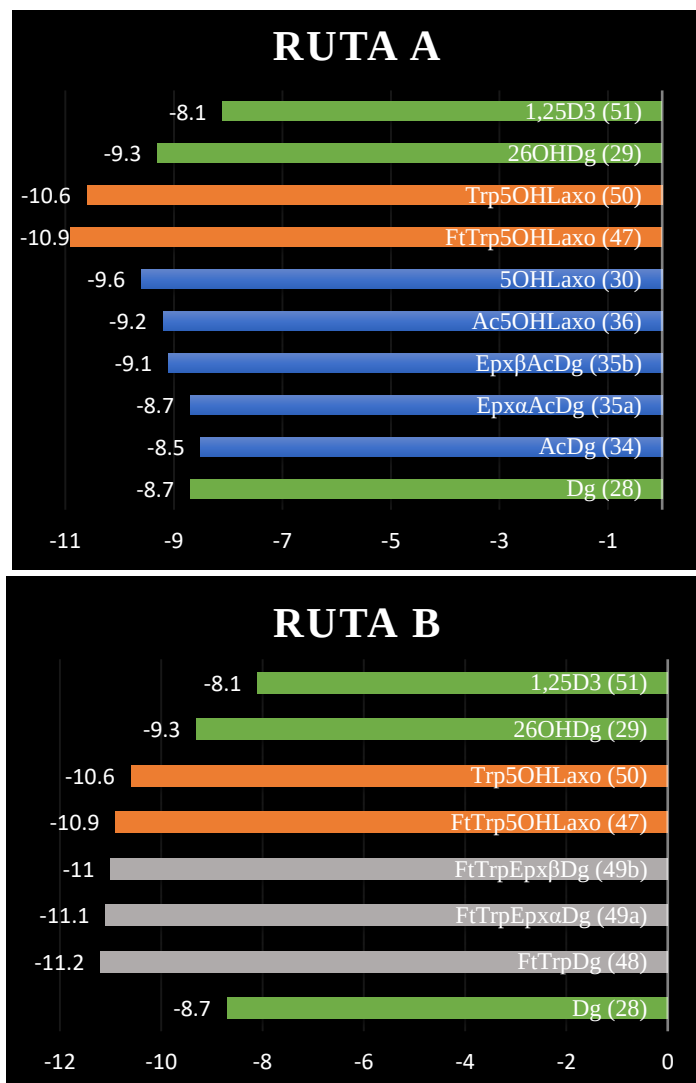


Figura 14. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con el receptor de progestágenos (RP).

3.1.4 Proteína de unión a esteroides de respuesta rápida asociada a membrana (MARRS)

El principal activador del receptor MARRS es la vitamina 1,25-dihydroxyD₃ (**51**), teniendo similitud estructural con las sapogeninas y la diosgenina [26]. El **FtTrpDg** (**48**) tuvo mayor afinidad por MARRS para ambas rutas (Gráfica 5), debido a la presencia del grupo protector **Ft** y del **Trp** que aumentaron las interacciones. Para este caso se comparó con **Dg** (**28**) también como

valor de referencia, con la cual se obtuvo la menor afinidad de todos los compuestos, salvo por el ligando natural, razón por lo cual todos los compuestos, preferentemente de la ruta **B**, fueron buenos candidatos para posteriores estudios.



Gráfica 5. Energías de acoplamiento molecular de los derivados esteroidales vs receptor MARRS (ΔG , kcal/mol).

La ruta **A** sugiere que la modificación del doble enlace en C-5 fue efectiva para aumentar la afinidad, comparando la **Dg (28)** con **5OHLaxo (30)** que con un aumento significativo de 0.9 kcal/mol, destaca dicha diferencia. Pese a esto, fue la esterificación con el grupo **Ft** y el a.a. **Trp** lo que aumentó la afinidad hasta superar los valores de referencia, en este caso comparado con los compuestos (29), (48) y (50), debido a la generación de interacciones tipo π -anión, alquílicas y de puentes de hidrógeno con los anillos de dichos grupos como se muestra en la figura 15.

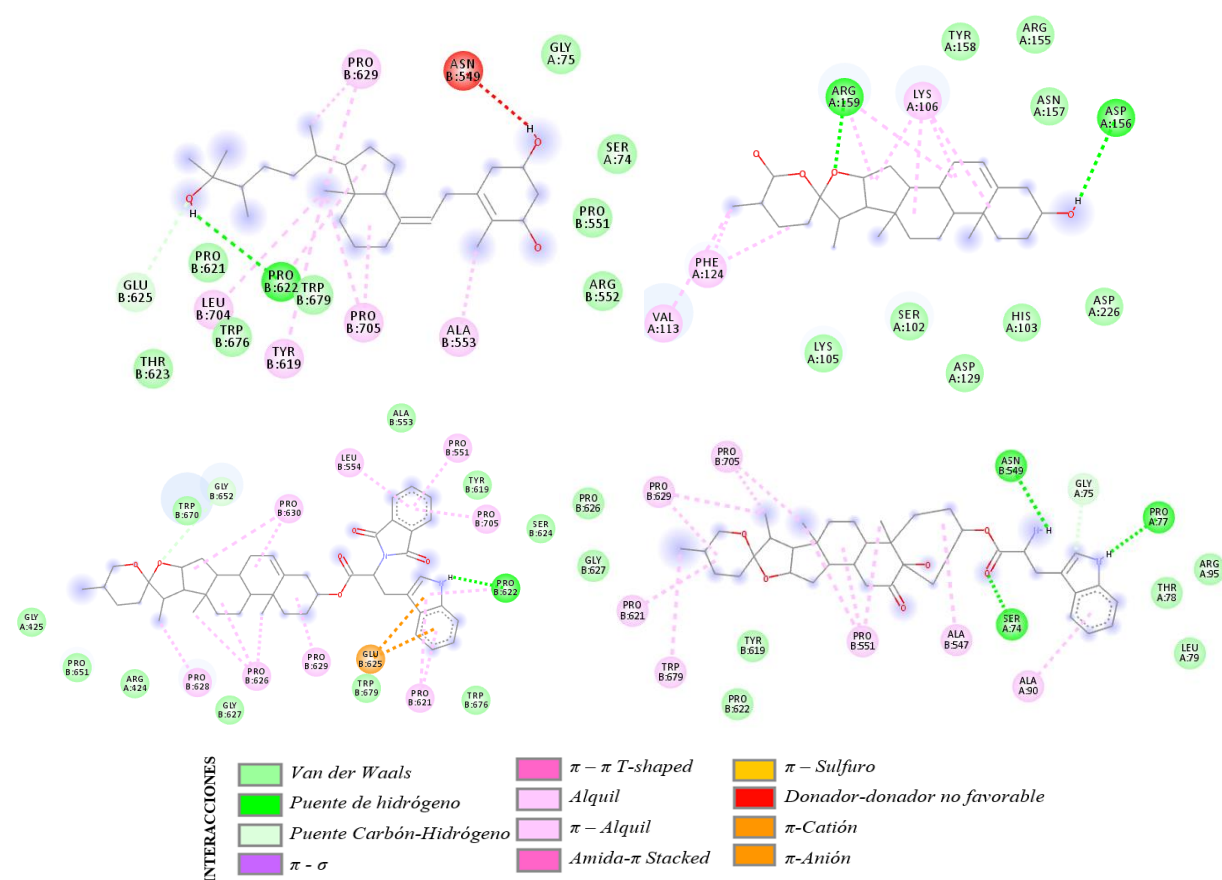
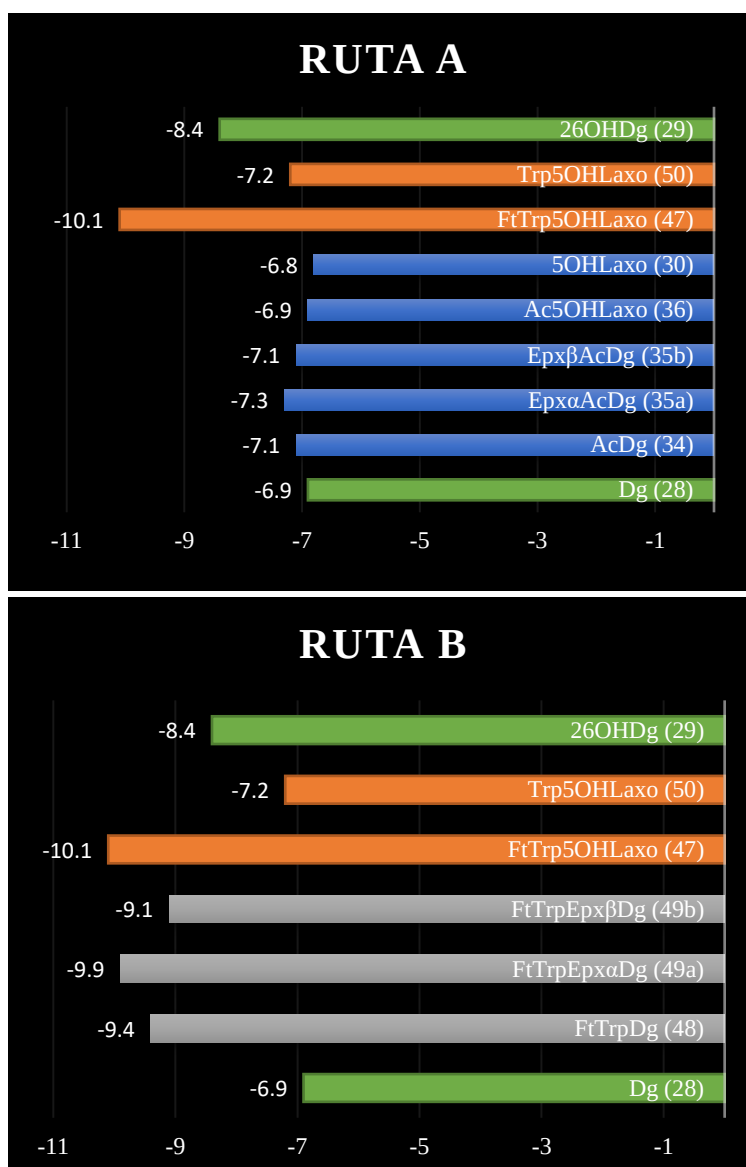


Figura 15. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con el receptor MARRS.

3.1.5 Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

El VEGF se encarga de la regulación de la quimosina, importante para el crecimiento celular endotelial, que está estrechamente relacionada al SOP dadas las disregulaciones de los procesos metabólicos vasculares [28]. El estudio de acoplamiento molecular (Gráfica 6) muestra para la ruta **A** resultados parecidos al de **Dg** (28), mismo que disminuye la activación de este factor [11], indicando que modificaciones en el anillo B no fueron relevantes para este receptor. Por otro lado, no alcanzaron el valor de la 26OHDg (29), que presentó un efecto aún mayor en la inhibición del factor [8], pero la inserción del aminoácido en el anillo A aumentó la energía de afinidad con dicho factor, siendo el compuesto **FtTrp5OHLaxo** (47) el que posee mayor afinidad que el resto en ambas rutas, por lo cual se vuelve un compuesto de interés. En la ruta **B** observamos valores más altos de afinidad, donde todos los compuestos de la ruta fueron más afines que la **Dg** (28), mientras que únicamente el **Trp5OHLaxo** (50) tuvo afinidad menor a **26OHDg** (29). Los epóxidos alfa respectivos para cada ruta tuvieron mejor afinidad que los epóxidos beta, sin embargo, la diferencia no fue significativa para la ruta **A**, caso contrario a la ruta **B**.



Gráfica 6. Energías de acoplamiento molecular de los derivados esteroidales vs factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (ΔG , kcal/mol).

La afinidad se explicó al analizar las interacciones del diagrama 2D (Figura 16), donde hubo escasas interacciones entre **26OHDg (29)** y VEGF, mientras que para el compuesto **FtTrpDg (48)**, que posee **Ft** y **Trp**, hubo interacciones tipo alquílicas con **Ft**, tipo π -anión y puentes de hidrógeno con **Trp**, aumentando las afinidades de los compuestos. Cabe resaltar la interacción de un puente de hidrógeno formado con el hidroxilo en posición 3, destacando su potencial reactivo para la formación de estas uniones con proteínas. Sin embargo, al realizar la esterificación para la obtención de **48**, el hidroxilo se esterificó y por ende, el puente de hidrógeno se eliminó, a pesar de esto, hubo interacciones con el **In** y el **Ft** de **48**, recalcando la importancia de la modificación estructural para la obtención de moléculas más reactivas, y por ende, con mayor potencial biológico, siendo la conformación de **29**, con el hidroxilo en posición 26, que no favorece ninguna interacción respecto a este receptor, sin embargo, tiene potencial para formar interacciones.

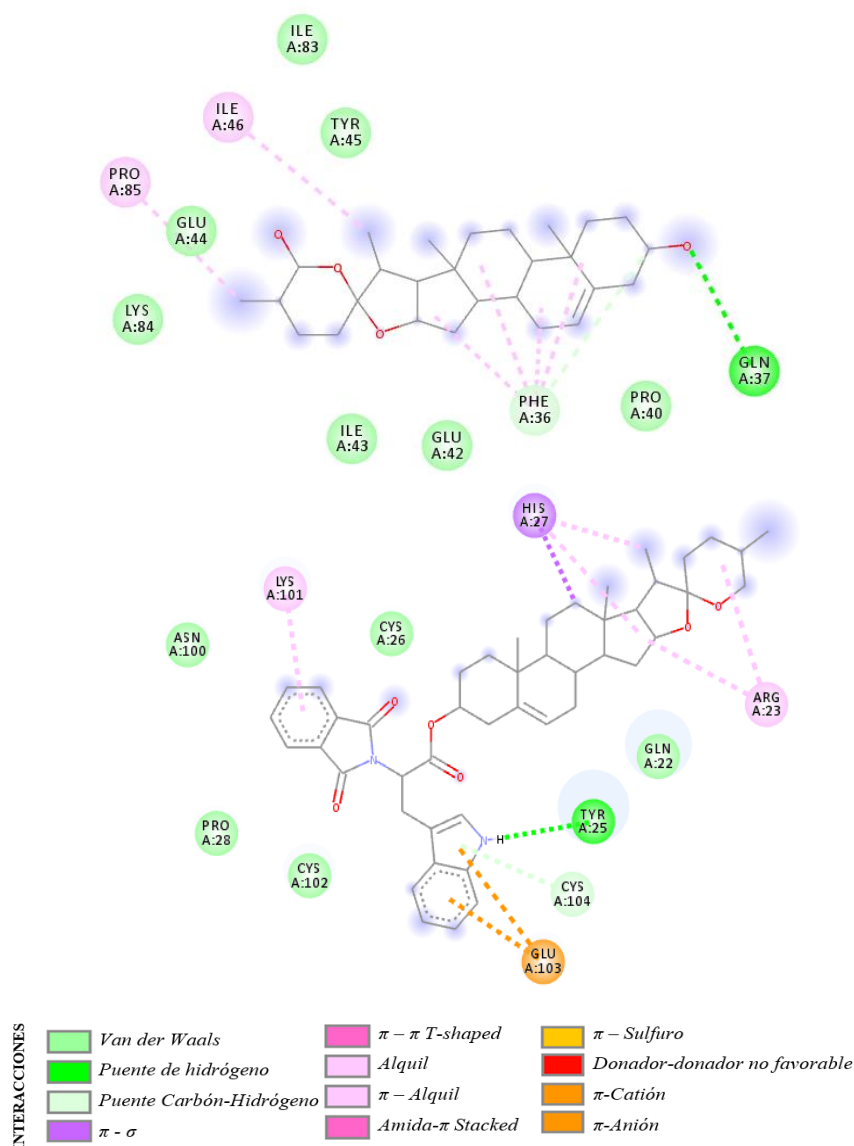
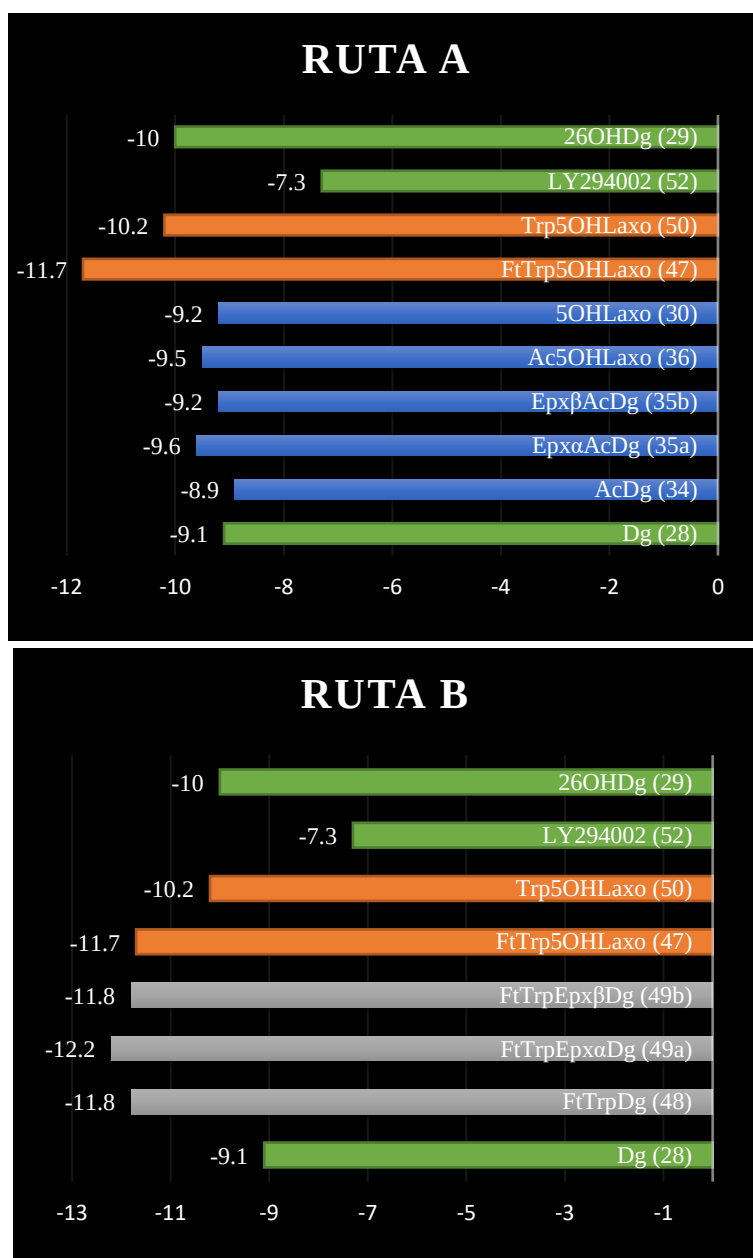


Figura 16. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

3.1.6 Inductor de apoptosis CD95 (CD95)

La proteína CD95 se localiza en la membrana celular y es un inductor de la apoptosis, muy estudiada en células cancerígenas [30], sin embargo, esta proteína se asocia también a irregularidades en ovarios, específicamente en las células de la granulosa, razón por la cual estudiamos su inhibición/activación a través de esteroides [31]. Obtuvimos que las afinidades de todos los compuestos de la ruta **A** y **B** tuvieron mejor afinidad por la proteína en comparación con el ligando de referencia LY294002 (**52**) (Gráfica 7). Este resultado lo ubica como buen candidato a los compuestos que proponemos; se destaca la mayor afinidad que obtienen los compuestos de la ruta **B** que contienen al a.a. **Trp** y el grupo protector **Ft**. Los epóxidos tuvieron mejor afinidad cuando se encontraron en posición α , factor a tomarse en cuenta para la selectividad de compuestos.



Gráfica 7. Energías de acoplamiento molecular de los derivados esteroidales vs receptor CD95 (ΔG , kcal/mol).

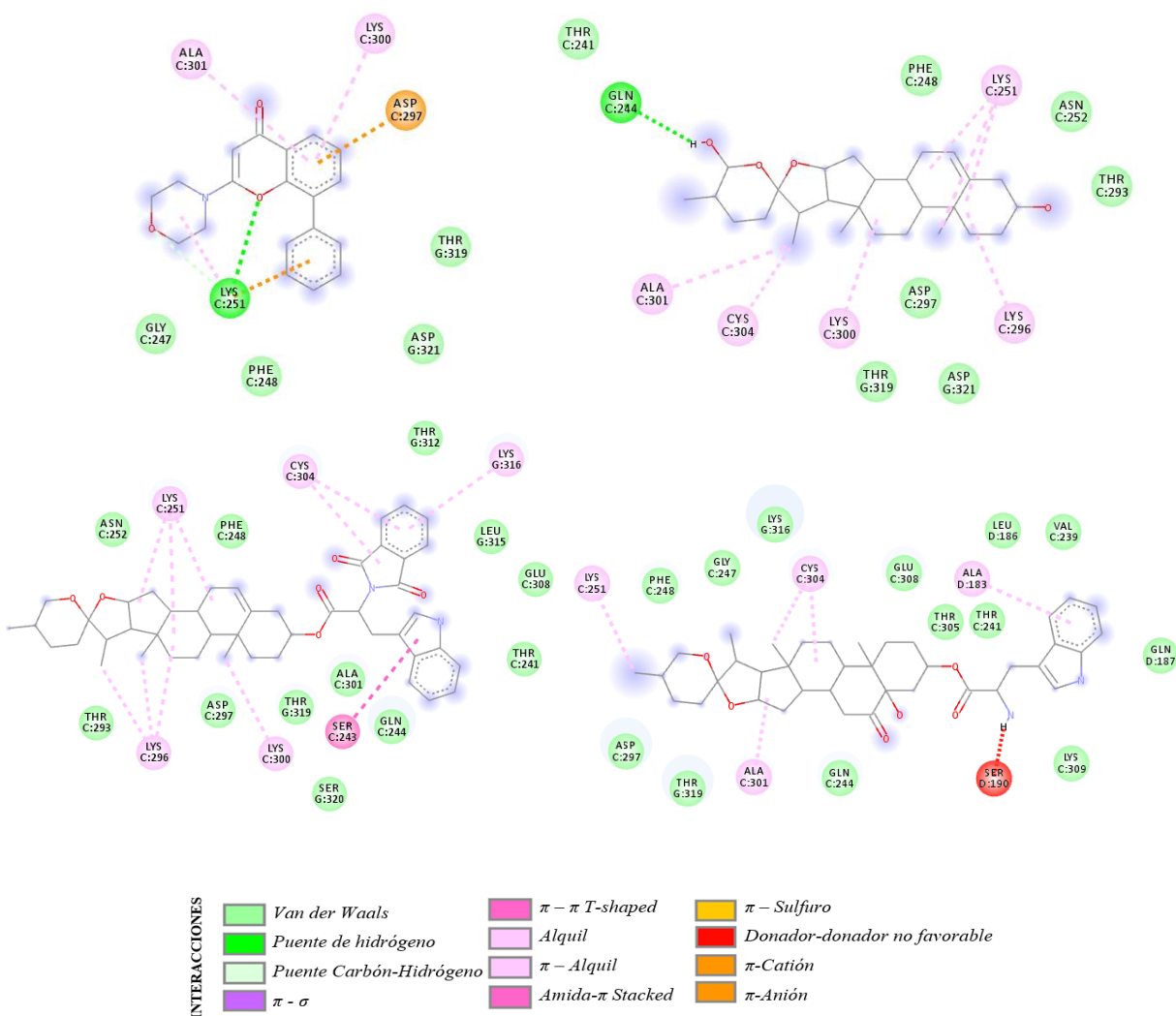


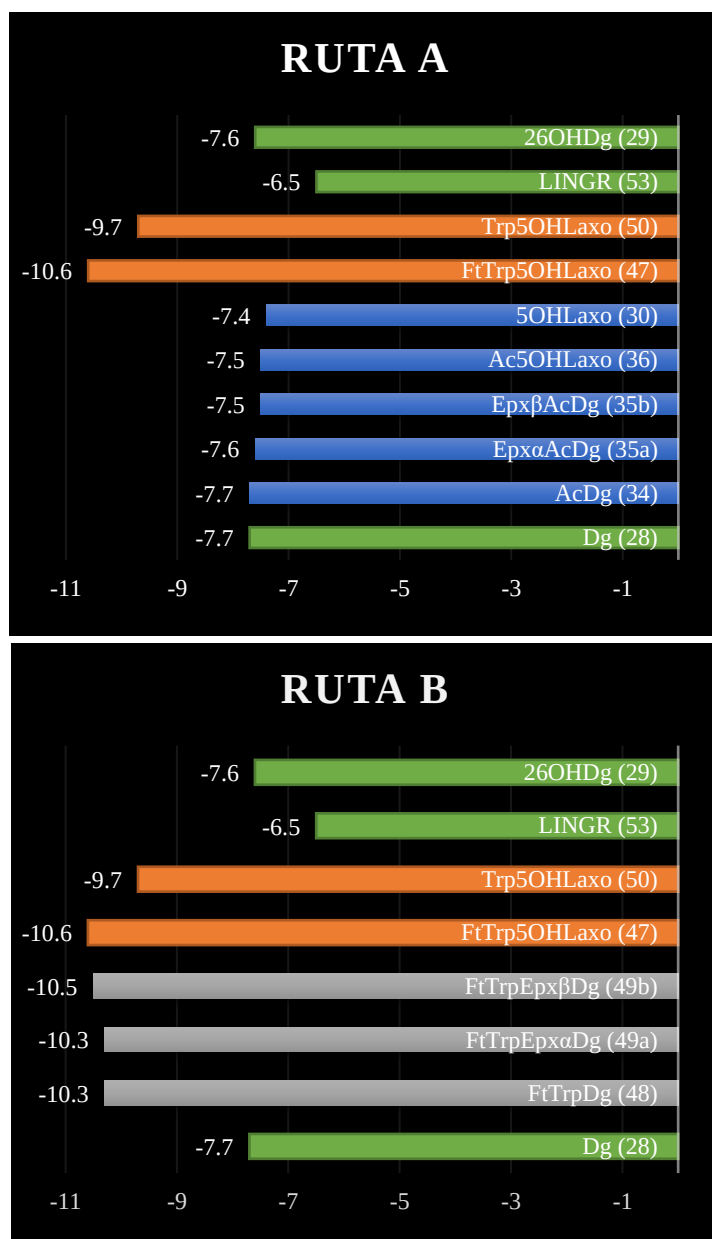
Figura 17. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con el receptor CD95.

El análisis de los aminoácidos (a.a.) en la figura 17 muestra que el ligando sintético **52** tuvo escasas interacciones con la proteína CD95, mientras que, con los compuestos esteroidales, estas interacciones aumentaron. Las cadenas C y G interactuaron con los ligandos. Además, la presencia del hidroxilo en la posición 26 del compuesto **26OHDg (29)** favorece la formación de un puente de hidrógeno, razón por la cual aumenta su afinidad en comparación con la **Dg (28)**. La presencia de interacciones alquílicas aumentó al tener **Ft** y **Trp**, justificando su uso y destacando que el sitio activo de unión del ligando sintético **52** ya probado, es el mismo sitio de unión de los compuestos **47** y **48**, el a.a. interactúa de distinto modo, pero comparte residuos de LYS-300, LYS-251, ASP-297 y ALA-301, haciendo más seguro su uso, recalcando a los derivados **FtTrp5OHLaxo (47)** y **FtTrpDg (48)**.

3.1.7 Caspasa3 (CSP-3)

Las caspasas son proteasas que inducen apoptosis de las células, un proceso importante para el desarrollo folicular y para el desarrollo del endometrio, además, es aceptado como marcador celular de apoptosis [80]. Al comparar las afinidades (Gráfica 8), se encuentra que todas las moléculas

tuvieron mayores afinidades que el ligando de referencia **LINGR (53)**, siendo en la ruta **B** donde hubo mejores resultados que en la ruta **A**. El **FtTrp5OHLaxo (47)** fue el compuesto que presentó mejor afinidad que el resto de los compuestos, tanto en ruta **A** como **B**, seguido de **FtTrpDg (48)** y sus respectivos epóxidos, haciendo los dos primeros buenos candidatos.



Gráfica 8. Energías de acoplamiento molecular de los derivados esteroidales vs caspasa 3 (CSP-3) (ΔG , kcal/mol).

El análisis con los a.a. de la proteína (Figura 18) mostró escasas interacciones con **LINGR (53)**, aumentando significativamente al usar moléculas esteroidales que, aunque aumenta considerablemente su tamaño, también se aumenta su afinidad. Hubo interacciones π - π con el grupo indol del **Trp** e interacciones con el grupo **Ft**, lo que explicaría su mayor afinidad. Además, el residuo PHE-256 formó interacciones de tipo π tanto en **52**, **50** y **48**, siendo ésta la única interacción fuerte que tuvieron, sin embargo, con ARG-207, que si bien estuvo presente cerca del

sitio de unión, no formó interacciones con los derivados a **53**, siendo el resto de aminoácidos diferentes y por ende, sitios y formas de unión distintos, lo cual es deseable para caspasa 3 dado que no es de interés una inhibición ya que es un regulador importante para el desencadenamiento de la apoptosis.

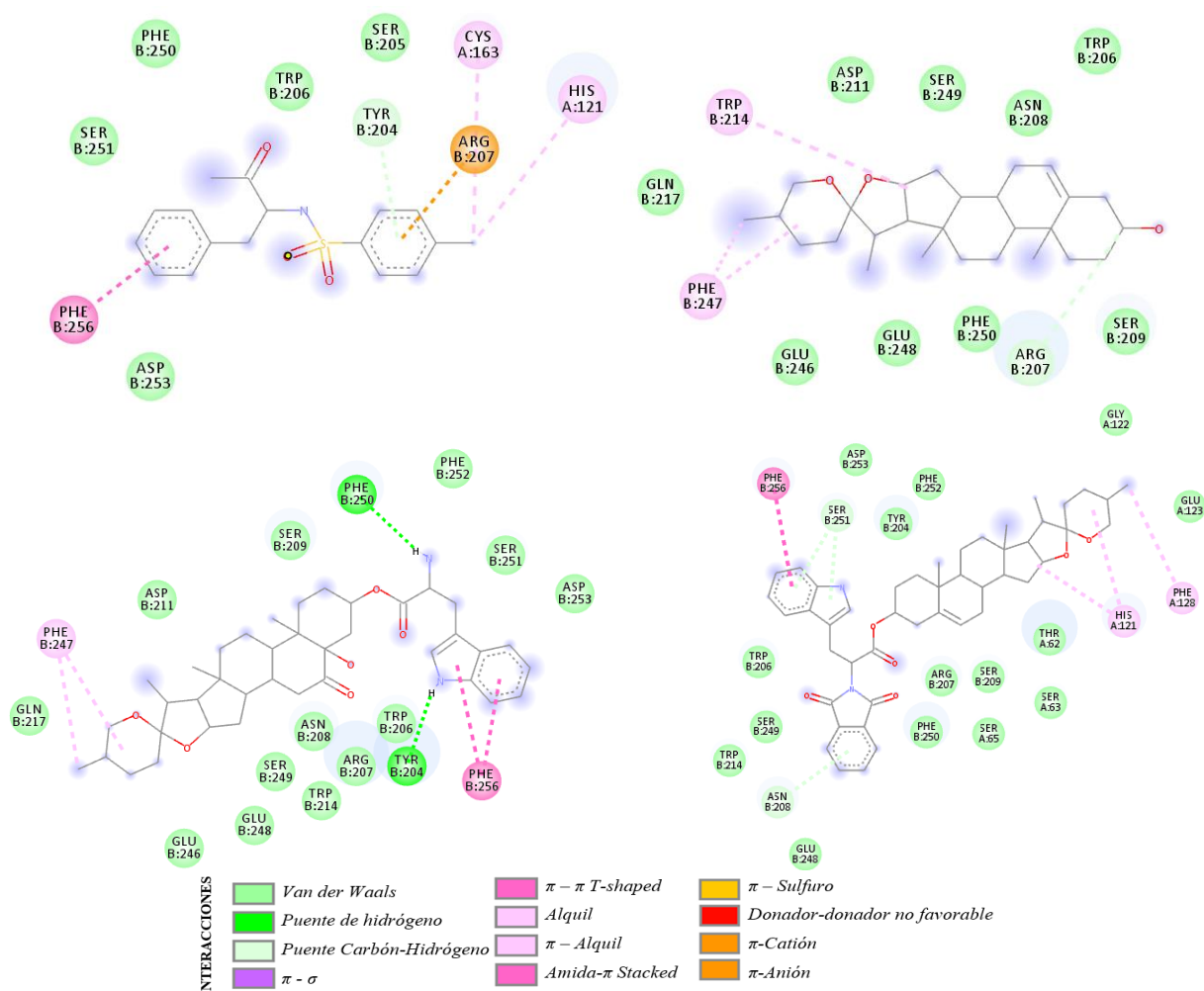
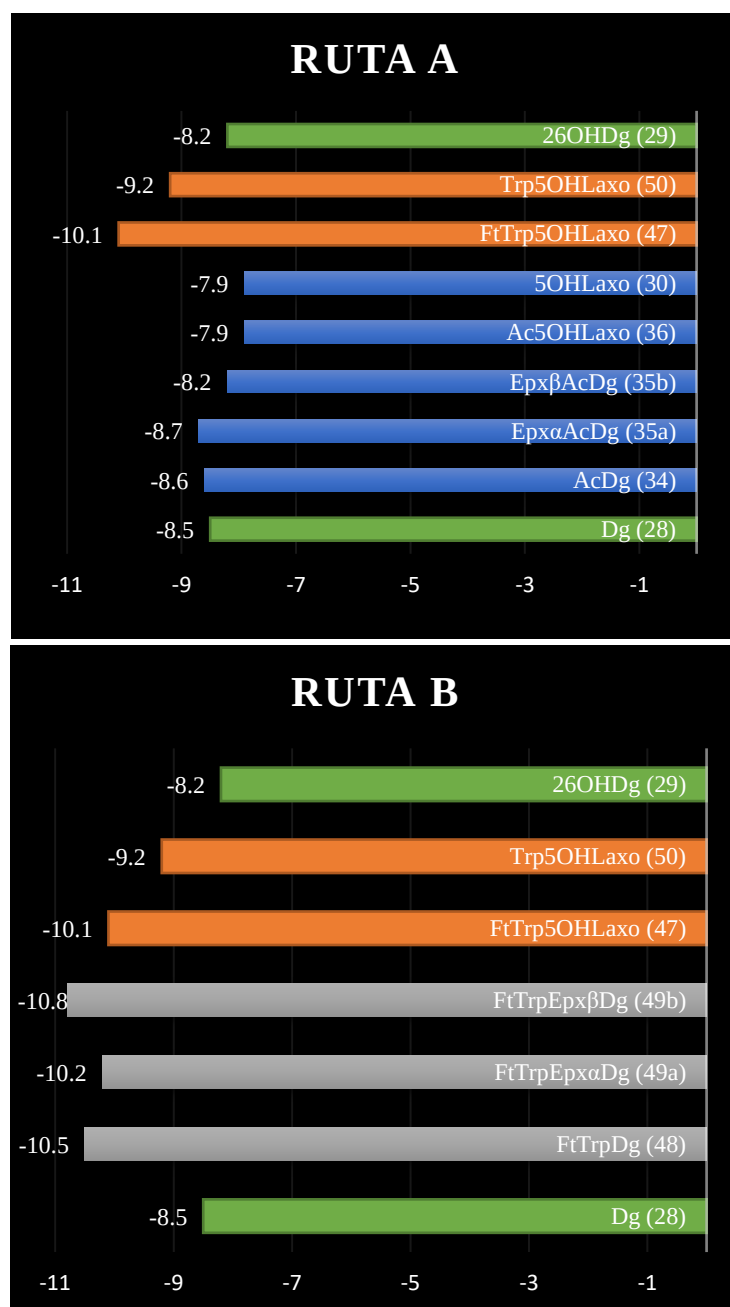


Figura 18. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con CSP-3.

3.1.8 Interleucina-6 (IL-6)

Las interleucinas 6 intervienen en la inflamación, además, es un receptor regulador de procesos metabólicos y regenerativos de las células, además de muy activo en enfermedades que cursan con inflamación crónica, un síntoma presente en pacientes con SOP [32]. Para interleucina 6, los epóxidos de **AcDg (34)** de la ruta **A** tuvieron afinidad mayor, cercanos a la **Dg (28)** y en la ruta **B** todos los compuestos analizados tuvieron afinidad mayor que **Dg (28)**, haciendo de interés estos compuestos, destacando que tanto el epóxido α como β cuentan con afinidades similares, infiriendo que esto no afectaría en la evaluación biológica (Gráfica 9). El compuesto **FtTrpDg (48)** tuvo mejor afinidad que los derivados **FtTrp5OHLaxo (47)** y **Trp5OHLaxo (50)**, y la destaca para la evaluación.



Gráfica 9. Energías de acoplamiento molecular de los derivados esteroidales vs interleucina-6 (IL-6) (ΔG , kcal/mol).

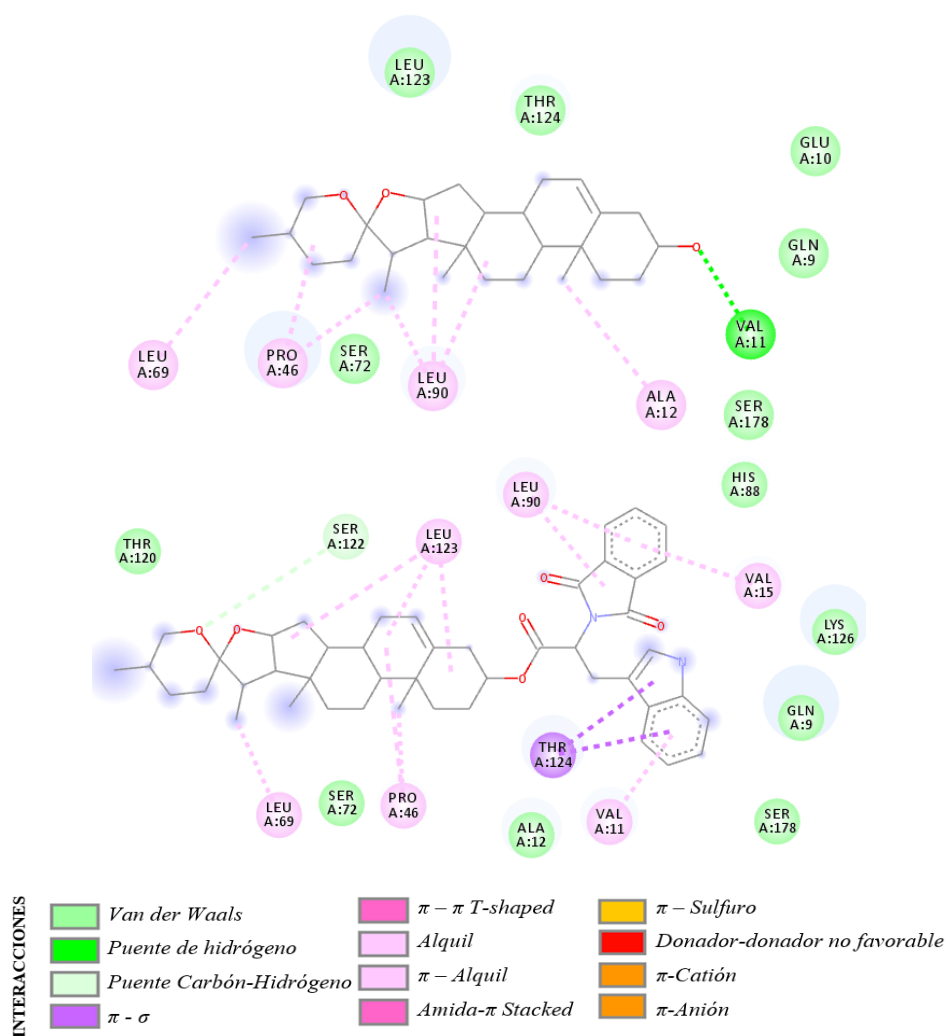


Figura 19. Modelo 2D del acoplamiento molecular de los derivados esteroidales con IL-6.

En la figura 19 vemos que los a.a. tuvieron interacciones por puentes de hidrógeno, fuerzas de vander Waals e interacciones alquílicas con **Dg (28)**, mientras que con el **Ft** y **Trp** hubo enlaces π -sigma. Además, hubo interacciones con las modificaciones hechas al doble enlace al generar puentes de hidrógeno con la proteína, por lo que aumentó la afinidad de los compuestos.

3.2 Administración, Distribución, Metabolismo, Excreción (ADME)

Mientras que los estudios de acoplamiento molecular simulan y predicen una posible interacción con una proteína, y por ende, un posible efecto farmacológico, los estudios ADME de la plataforma SWISS ADME simulan y comparan una serie de parámetros deseados en un fármaco y moléculas de interés desarrolladas, prediciendo propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas importantes; la plataforma calcula algunas propiedades como solubilidad, permeabilidad o biodisponibilidad y establece parámetros ideales para una molécula gracias al trabajo de grandes investigaciones y empresas farmacéuticas como *Bayer* o *Pfizer*, cabe aclarar que dichos parámetros no son una serie de reglas a cumplir, sino un rango de características deseables para un posible fármaco [63].

Se obtuvieron los resultados mostrados en las tablas 3 y 4 para los compuestos de la ruta A y B por separado. Observamos así que los compuestos sin **FtTrp** o **Trp** poseen una alta absorción gastrointestinal, mientras que tras las esterificaciones con Trp disminuyen dicha absorción. En la ruta A, los derivados sin **FtTrp** tuvieron alta probabilidad de absorción por glicoproteínas, excepto para **34**, siendo indicativo que la absorción por glicoproteínas es mediada por el hidroxilo en la posición 3 del esteroide, un efecto similar lo obtuvimos para **36**.

De forma similar, la permeabilidad para la barrera hematoencefálica tuvo la misma tendencia, resultado que se corrobora con los valores de coeficiente de reparto (lipofilicidad) que presentan mayor valor, esto se refleja también en la solubilidad en agua de los compuestos que, tanto en ruta A y B fue baja a excepción de **28**, **36** y **30**, debido probablemente al hidroxilo en la posición 3 del esteroide en el caso de **28**, mientras que para **30** y **36** debido a la generación del hidroxilo en 5 y grupo cetónico en 6.

Por otra parte, el valor de biodisponibilidad se basa en la administración oral en ratas, obteniendo buenos resultados para la ruta A en general, mientras que la ruta B reporta bajas biodisponibilidades del 17% para los compuestos epoxidados **49a** y **b** y para el compuesto **47** con FtTrp, recalcando con mejores biodisponibilidades los derivados **48** y **50** en la ruta B.

La comparación con fármacos se evalúa de diferente manera según el método, cada uno con diferentes criterios establecidos, teniendo así los criterios de: Lipinski, Ghose, Egan y Muegge. La ruta A cumple satisfactoriamente con Lipinski y Egan, mientras que tiene deficiencias con Ghose y Muegge. La ruta B por su parte, para los compuestos **48**, **49** y **47** no cumple con ninguno de los 4 criterios, siendo únicamente **50** el que cumple Lipinski y Egan.

Tabla 3. Resultados del análisis ADME, Ruta A

RUTA A		Dg (28)	AcDg (34)	EpxαAcDg (35a)	EpxβAcDg (35b)	AcSOHLaxo (36)	SOHLaxo (30)	FtTrp5OHLaxo (47)	Trp5OHLaxo (50)
Farmacocinética	Absorción G.I.	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Baja	Baja
	P. barrera hematoencefálica	Si	No	Si	Si	No	Si	No	No
	Glicoproteínas como sustrato	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
	P. piel (cm/s)	-4.8	-4.66	-5.16	-5.16	-5.97	6.11	-5.63	-5.99
Lipofilicidad	Consenso: Log Po/w	5	5.45	4.98	5.03	4.25	3.72	6.04	4.99
	Log S (ESOL)	-5.98	-6.47	-6.2	-6.2	-5.68	-5.19	-9.1	-7.28
Solubilidad en agua	Solubilidad (mg/ml)	4.31E-04	1.55E-04	2.95E-04	2.95E-04	1.02E-03	2.87E-03	6.10E-07	3.30E-05
	Clase	Moderada	Baja	Baja	Baja	Moderada	Moderada	Baja	Baja
Comparación con fármacos	Lipinski (#V)	Si; 1	Si; 1	Si; 1	Si; 1	Si; 0	Si; 0	No; 2	Si; 1
	Ghose (#V)	No; 2	No; 3	No; 2	No; 2	No; 3	No; 1	No; 4	No; 4
	Egan (#V)	Si	No; 1	Si	Si	Si	Si	No; 2	Si
	Muegge (#V)	No; 1	No; 1	No; 1	No; 1	Si	Si	No; 3	No; 3
	Biodisponibilidad	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.17	0.55

G.I. (Gastrointestinal), P. (Permeabilidad en), #V (Número de violaciones al criterio)

Tabla 4. Resultados del análisis ADME, Ruta B

RUTA B		Dg (28)	FtTrpDg (48)	FtTrpEpxαDg (49a)	FtTrpEpxβDg (49a)	FtTrp5OHLaxo (47)	Trp5OHLaxo (50)
Farmacocinética	Absorción G.I.	Alta	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja
	P. barrera hematoencefálica	Si	No	No	No	No	No
	Glicoproteínas como sustrato	No	No	Si	Si	Si	Si
	P. piel (cm/s)	-4.8	-4.32	-4.84	-4.84	-5.63	-5.99
Lipofilicidad	Consenso: Log Po/w	5	7.25	6.78	6.78	6.04	4.99
	Log S (ESOL)	-5.98	-9.9	-9.62	-9.62	-9.1	-7.28
Solubilidad en agua	Solubilidad (mg/ml)	4.31E-04	9.30E-08	1.80E-07	1.80E-07	6.10E-07	3.30E-05
	Clase	Moderada	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja
Comparación con fármacos	Lipinski (#V)	Si; 1	No; 2	No; 2	No; 2	No; 2	Si; 1
	Ghose (#V)	No; 2	No; 4	No; 4	No; 4	No; 4	No; 4
	Egan (#V)	Si	No; 1	No; 1	No; 1	No; 2	Si
	Muegge (#V)	No; 1	No; 3	No; 3	No; 3	No; 3	No; 3
	Biodisponibilidad	0.55	0.55	0.17	0.17	0.17	0.55

G.I. (Gastrointestinal), P. (Permeabilidad en), #V (Número de violaciones al criterio)

En la figura 20, se observan los radares de biodisponibilidad obtenidos de la plataforma SWISS ADME, donde se comparan 6 propiedades de los fármacos, denotando en color rosa el rango ideal para su administración vía oral principalmente, con esto, es posible determinar deficiencias, guiar en la formulación y realizar el diseño dirigido de un fármaco [63].

Se observa que los compuestos de la ruta A, sin **FtTrp** o **Trp**, se encuentran en la zona rosa o muy cercanos a ellos, con un bajo nivel de insaturaciones y flexibilidad, pero recalando que el hidroxilo en posición 5 y el grupo cetónico en 6 mejoran la polaridad y liposolubilidad respecto a **Dg**. Por su parte, la ruta B tras una esterificación con **FtTrp** muestra un aumento en la lipofilicidad y, por ende, también en la insolubilidad, además de un aumento en el tamaño, todas estas propiedades saliendo considerablemente del rango deseado (zona rosa). Además, se observa una mejoría en las insaturaciones y flexibilidad respecto a la ruta A. El compuesto **50** destaca, puesto que la solubilidad y lipofilicidad disminuyen a rangos más cercanos a los deseados respecto a los derivados análogos de la ruta, manteniendo características deseadas en polaridad, insaturaciones y flexibilidad. Pese a esto, la administración vía oral de estos derivados puede presentar complicaciones acordes a las predicciones del programa debido al tamaño de la molécula y su alta liposolubilidad.

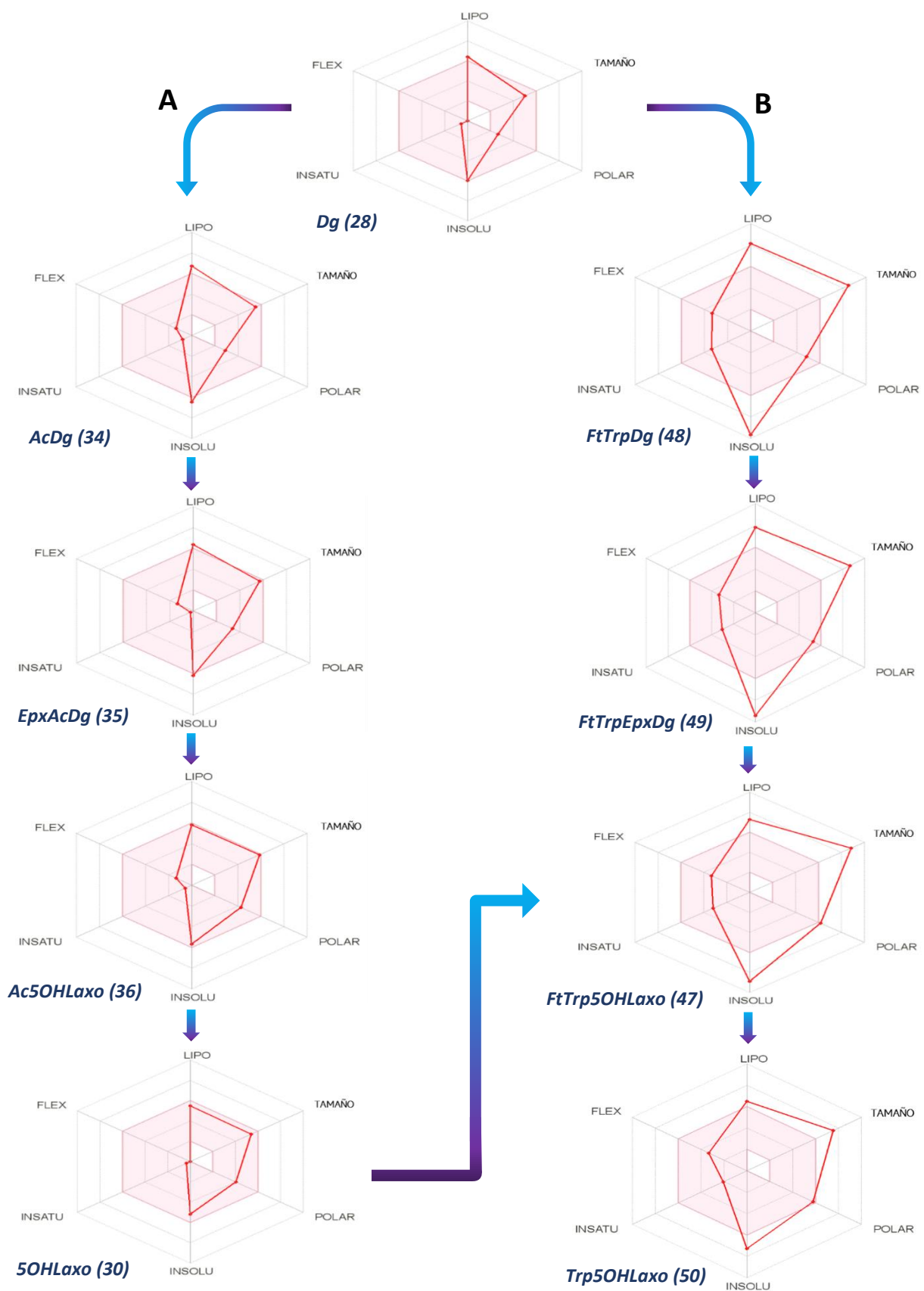


Figura 20. Radar de biodisponibilidad de 6 parámetros ideales en un fármaco de ambas rutas.
 LIPO: lipofilicidad, FLEX: flexibilidad, INSAT: insaturaciones, INSOLU: insolubilidad,
 POLAR: polaridad.

3.3 Análisis teórico de selección de candidatos a síntesis

De los resultados de acoplamiento molecular resumidos en la tabla 5 obtuvimos que la ruta **A** posee afinidades menores, concluyendo que los compuestos exclusivos de dicha ruta no son buenos candidatos para la evaluación biológica, caso contrario a los compuestos de la ruta **B**, en los cuales obtuvimos que el compuesto **FtTrpDg (48)** tiene las mejores afinidades para la mayoría de proteínas evaluadas de interés contra el SOP, seguido del resto de compuestos, ya sean exclusivos de la ruta **B** o los derivados finales que se comparten en ambas rutas. Por lo anterior elegimos la ruta **B** para realizar la síntesis de los compuestos y también para la evaluación biológica en el modelo de SOP en ratas.

Tabla 5. Resumen de las moléculas principales de interés.

Receptor	Derivados con mejor afinidad
Receptor de Estrógenos α	FtTrpDg (48) , FtTrpEpx β Dg (49b), FtTrpEpx α Dg (49a)
Receptor de Estrógenos β	FtTrpDg (48) , FtTrpEpx α Dg (49a)
Receptor de Andrógenos	FtTrpDg (48) , Trp5OHLaxo (50), FtTrp5OHLaxo (47)
Receptor de Progestágenos	FtTrpDg (48) , FtTrp5OHLaxo (47)
Caspasa 3	FtTrpDg (48) , Trp5OHLaxo (50), FtTrp5OHLaxo (47)
CD95	FtTrpDg (48) , FtTrp5OHLaxo (47)
Interleucina 6	FtTrpDg (48) , FtTrpEpx β Dg (49b)
VEGF	FtTrpEpx α Dg (49a), FtTrp5OHLaxo (47)
MARSS	FtTrpDg (48) , FtTrpEpx β Dg (49b), FtTrpEpx α Dg (49a), Trp5OHLaxo (50), FtTrp5OHLaxo (47)

Cabe precisar que el estudio de acoplamiento solo predice la viabilidad de unión de moléculas a proteínas específicas, por lo que el sistema ADME complementa los estudios *in silico*. Las figuras 20 y 21 indican las propiedades de absorción y permeabilidad, representadas en zona blanca los compuestos absorbibles a través del tracto gastrointestinal, mientras que en zona amarilla los compuestos permeables pasivamente por la barrera hematoencefálica [63]. Obtuvimos que los compuestos con **Ft** y **Trp** no cumplieron con ninguno de los dos criterios establecidos. Los compuestos de ruta **A** predicen una buena absorción gastrointestinal, mientras que **28**, **30**, **35a** y **35b** cumplen también con la permeabilidad a la barrera hematoencefálica.

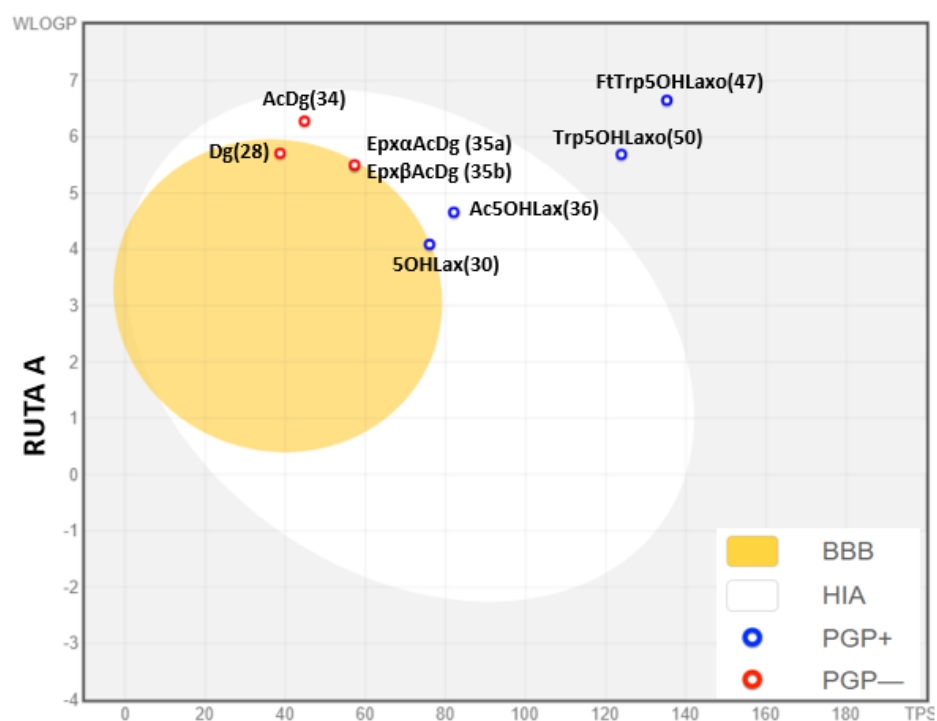


Figura 21. Diagrama de permeabilidad para los compuestos de la ruta A calculada por SWISSADME

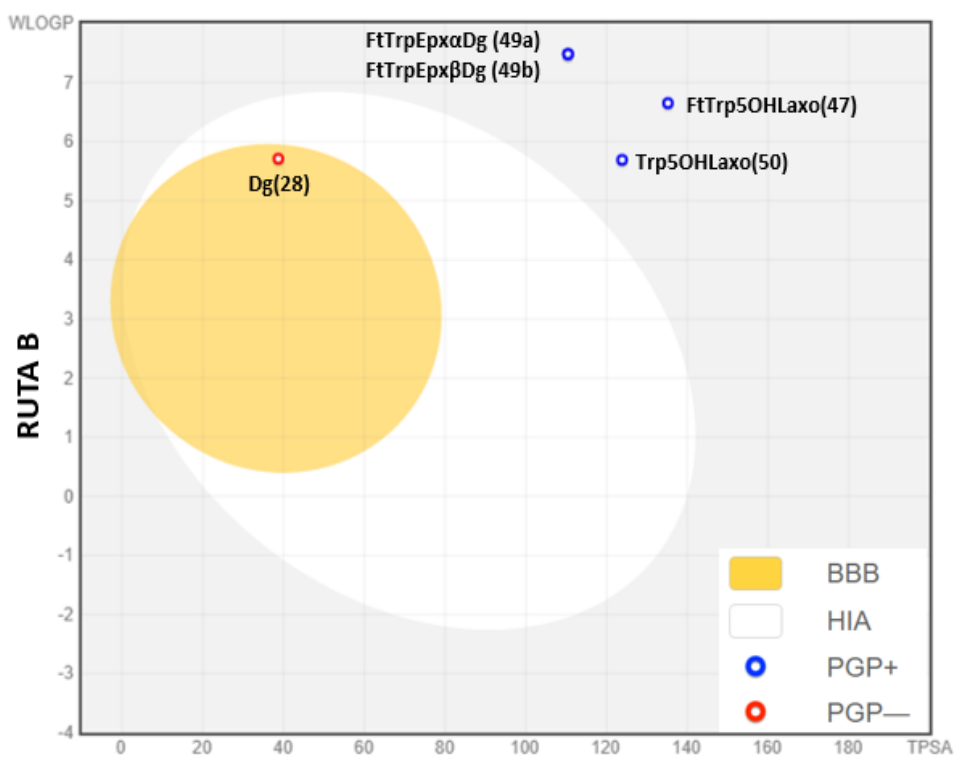


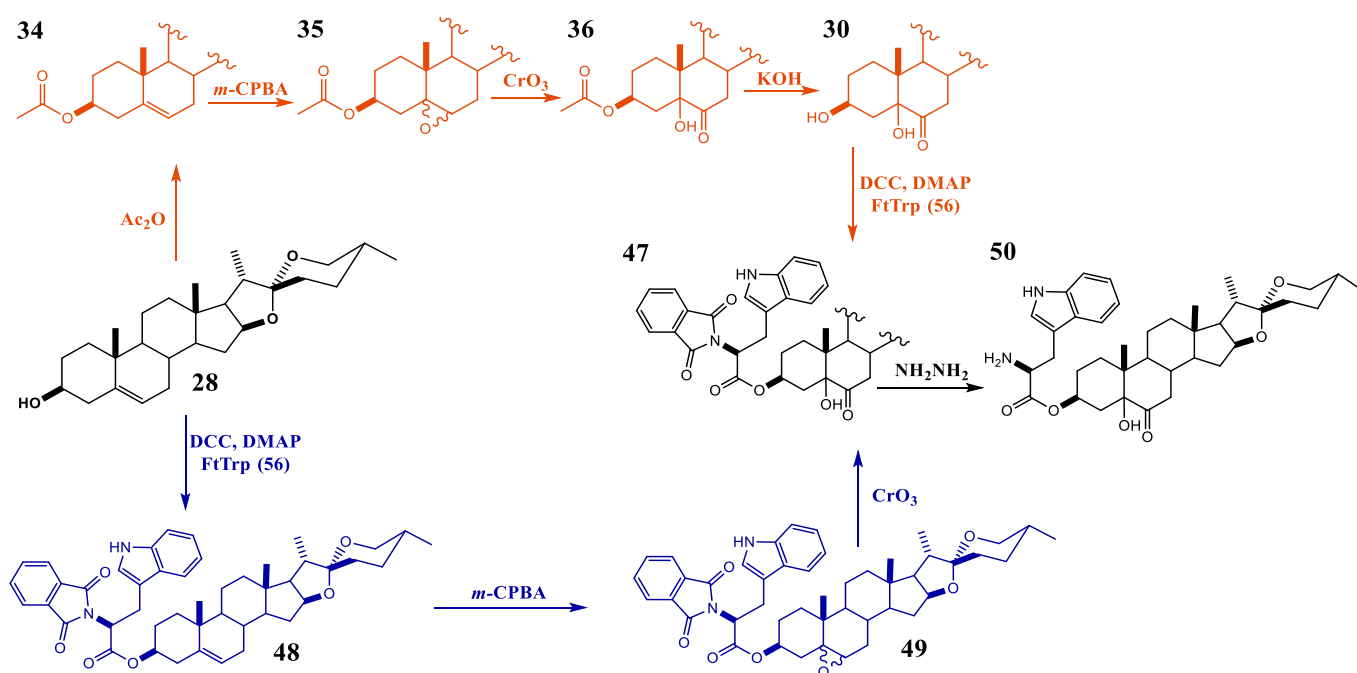
Figura 22. Diagrama de permeabilidad para los compuestos de la ruta B calculada por SWISSADME.

Podemos denotar que los compuestos de la ruta **B** no son viables para una administración oral basados en los resultados de los radares de biodisponibilidad y los diagramas de permeabilidad previamente presentados, lo que sugiere el uso de técnicas alternativas tales como vía muscular o la vía intraperitoneal en el modelo *in vivo* para asegurar la biodisponibilidad de los compuestos. La presente investigación optó por vía intraperitoneal debido a su facilidad técnica, mejor biodisponibilidad sumado a una administración precisa y segura, además, los derivados propuestos muestran ser altamente liposolubles y con buena distribución, que predice buen efecto sistémico.

Al realizar el análisis combinatorio teórico, se determinó que los derivados **FtTrpDg (48)** y **Trp5OHLaxo (50)** fueron de interés, seguidos de los derivados epoxidados **FtTrpEpx β Dg (49b)** y **FtTrpEpx α Dg (49a)**. Sin embargo, en el caso de los epóxidos, hubo diferencias particulares en algunos receptores, lo que los hace inespecíficos, pero a la vez, interesantes al determinar su efecto como una mezcla diastereoisomérica. Se concluye que **50** y **48** fueron de principal interés y, por ende, de prioridad para su síntesis química y para su evaluación biológica, dado que poseen altas afinidades de unión a las proteínas clave del SOP sumado a las predicciones por ADME. Además, el esquema de síntesis **B** es una ruta más corta y cuyos intermediarios también son de interés, recordando además la importancia de establecer procesos más prácticos y accesibles.

3.4 Síntesis orgánica de los candidatos seleccionados

Las sapogeninas esteroidales han demostrado alta actividad biológica, principalmente debido a la similitud estructural con las hormonas y esteroides endógenos involucrados en diversos procesos metabólicos de los seres vivos, siendo la diosgenina, y derivados de ella, de los más usados [46]. El objetivo de la obtención de nuevos derivados esteroidales radica en la obtención y/o mejora de algún efecto farmacológico, por ejemplo, con la mejora de energías de afinidad para la obtención de inhibidores o activadores de proteínas o enzimas claves para una enfermedad. Con los datos de afinidad de nuestros compuestos se destaca la obtención de grupos funcionales como cetonas o hidroxilos que favorecen las interacciones moleculares con sus receptores, principalmente por la formación de puentes de hidrógeno, razón por la cual decidimos proponer las rutas de síntesis **A** y **B** (esquema 7), para obtener compuestos derivados de diosgenina (**28**) y de 5 α -hidroxilaxogenina (**30**) esterificados al aminoácido triptófano, con lo cual se prevé que aumentará la afinidad de los compuestos.



Esquema 7. Rutas de síntesis propuestas: **A** (rojo) y **B** (azul).

Para la obtención del compuesto **Trp5OHLaxo (50)**, planteamos dos rutas sintéticas, concluyendo del estudio de acoplamiento molecular, que la obtención por la ruta **B** tuvo mayor prioridad sintética y biológica. Tanto la ruta **A**, como la **B**, mostradas en el esquema 7, emplean como materia prima la **Dg (28)**, sapogenina esteroideal comúnmente extraída de la planta de barbasco (*Dioscorea composita*) con muy buenos rendimientos a diferencia de otras sapogeninas [44], razón por la cual se utilizó; **28** cuenta con un doble enlace en C-5 con el cual se trabajará para la obtención de un grupo hidroxilo en posición α del C-5 y un carbonilo en C-6. Además, se prepara como materia prima al **FtTrp (56)**, que consiste en un derivado ftalamidato de triptófano que es necesario dada la presencia del grupo amino y carboxílico del a.a., ya que ambos son altamente reactivos, es necesaria la protección del grupo amino para obtener una reacción de esterificación dirigida y correcta con el ácido carboxílico, evitando de este modo la obtención de subproductos no deseados.

La ruta **A** consta de 6 pasos para la obtención de (50) e inicia con la protección del hidroxilo en C-3, una epoxidación del doble enlace para luego una oxidación del mismo, la desprotección del hidroxilo en C-3 obteniendo así **Laxo (30)**, posteriormente se realiza la esterificación en el hidroxilo en C-3 del a.a. triptófano (Trp) con el grupo amino protegido previamente (56), para finalmente desproteger el grupo amino del a.a. para obtener el derivado **50**. La ruta **B**, por su parte, consta de 4 pasos, comenzando con una esterificación directa del hidroxilo en C-3 de **Dg (28)** y Trp con el grupo amino protegido (56), posteriormente la epoxidación del doble enlace, la oxidación del mismo y finalmente una desprotección del grupo amino del Trp para obtener **50**, evitando de este modo la protección por acetilación de la ruta **A** al ser sustituida por la esterificación directa con el aminoácido objetivo, por lo que se realiza en menos pasos tornándola más viable sintéticamente.

3.4.1 Obtención y caracterización de diosgenina, Dg (28) como materia prima

Para ambas rutas, se utilizó como materia prima a la diosgenina, la cual suele extraerse de plantas del género *Dioscorea* con buenos rendimientos, haciendo de este modo que la compra como reactivo sea más accesible que otro tipo de esteroides. Se utilizó **Dg (28)** grado reactivo, la cual suele encontrarse con una pureza superior al 90%, sin embargo, se realiza una purificación a través de columna para cromatografía y sistema de disolvente hexano/acetato de etilo en proporción 9:1, para así evitar la formación de subproductos por las impurezas presentes.

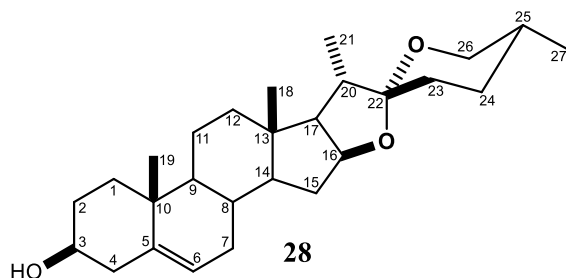


Figura 23. Estructura de Diosgenina, Dg (28) y numeración de sus átomos de carbono.

Una vez obtenida la materia prima pura, se realizaron los estudios de caracterización correspondientes para poder elucidar la estructura química, sirviendo esto de base para monitorear las modificaciones posteriores al comparar los espectros entre materias primas y derivados posteriores, siendo la resonancia magnética nuclear ideal para determinar la estructura a partir de los espectros de ^1H y ^{13}C los cuales se muestran en las figuras 23 y 24, mismos que fueron comparados con reportes bibliográficos [81]. En el espectro de ^1H (Figura 23) observamos señales particulares, en 5.35 ppm podemos observar una señal que corresponde al protón vinílico en H-6 y a menor frecuencia, en la región de 4.42 a 3.60 ppm encontramos señales traslapadas correspondientes a los protones H-3 y H-26_{eq}, siendo la primera muy puntual para modificaciones en las rutas propuestas, igualmente, otras señales características son la que se encuentra en 4.41 ppm correspondiente al H-16, la señal en 3.37 ppm que se asigna al H-26_{ax}, así como las señales de los metilos 18, 19, 21, 27, características de los metilos del núcleo esteroidal.

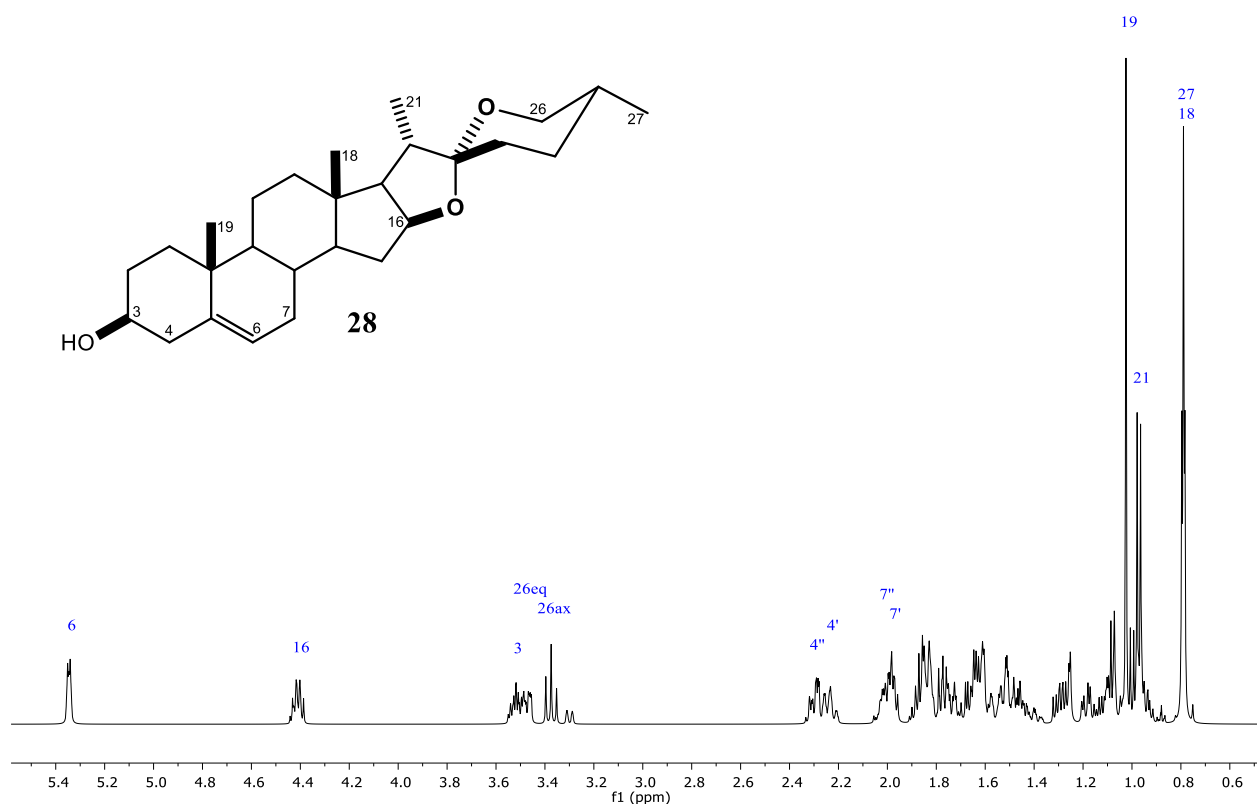


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H de Dg (28) a 500 MHz.

Para el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24) se observa una señal en 141 y 122 ppm correspondientes a los carbonos vinílicos C-5 y C-6, además de la señal del C-3 que se encuentra a 72 ppm, siendo estas 3 señales las más relevantes dado que son estos carbonos en donde se realizarán las modificaciones químicas, mientras que el resto de señales son características para los carbonos de la estructura esteroideal, a 109 ppm la señal del C-22 del espiroacetal, a 81 ppm del C-16 y la señal de C-26 a 67 ppm.

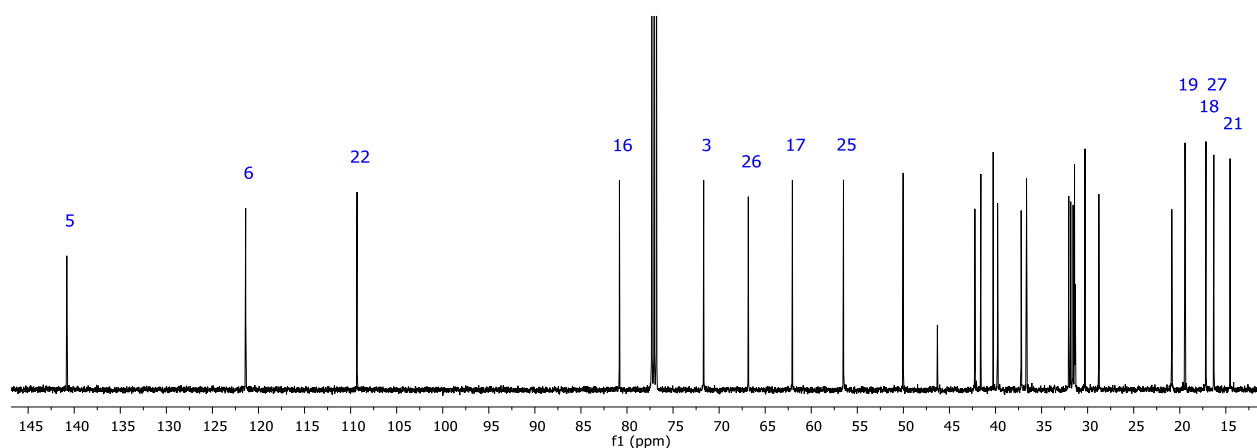
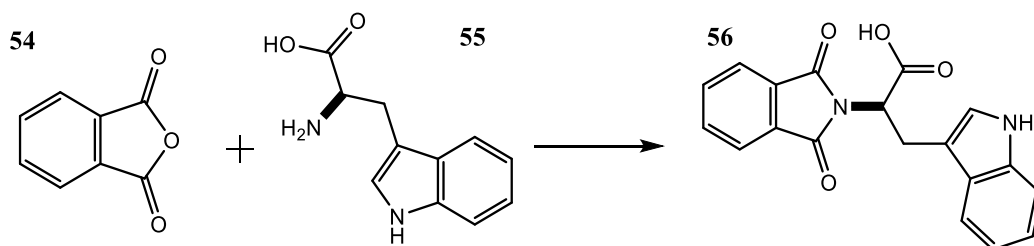


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C de Dg (28) a 125 MHz.

3.4.2 Síntesis y caracterización de FtTrp (**56**) como materia prima.



Esquema 8. Reacción para la obtención de ftalamidato de triptófano, FtTrp (56).

Como primera reacción, se busca la obtención del derivado aminoácido protegido en su grupo amino (**56**), el cual se obtiene de manera *in situ* y prácticamente cuantitativo, obteniendo rendimientos del 99 %. En el espectro de ^{13}C (Figura 26) podemos observar a 170 ppm las tres señales características de los grupos carbonilos del grupo protector y al grupo ácido, a menor frecuencia se encuentran las señales de los dobles enlaces y en particular a 55 ppm la señal del carbono base del grupo amino, constatando la identidad de esta materia prima para futuras esterificaciones.

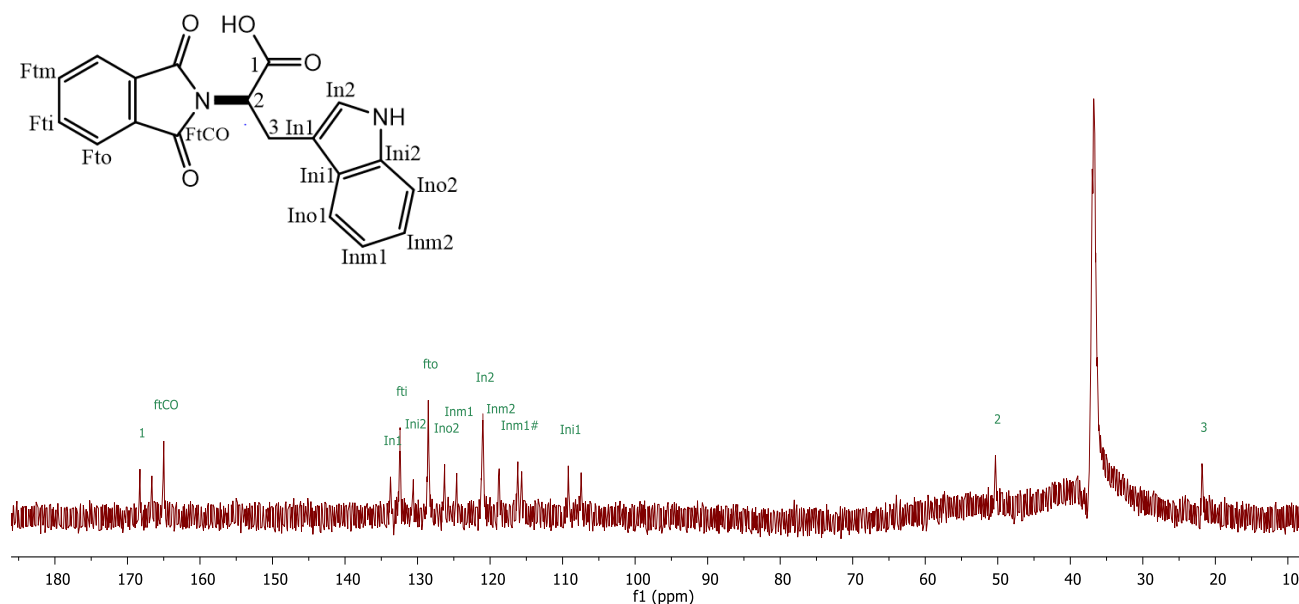


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C de FtTrp (**56**) a 125 MHz.

3.4.3 Síntesis y caracterización de FtTrpDg (48)

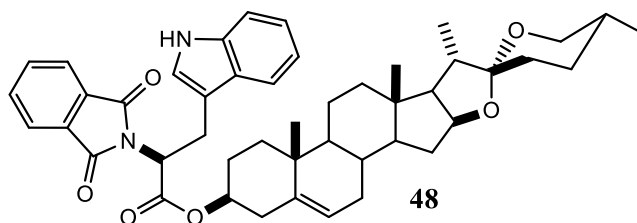
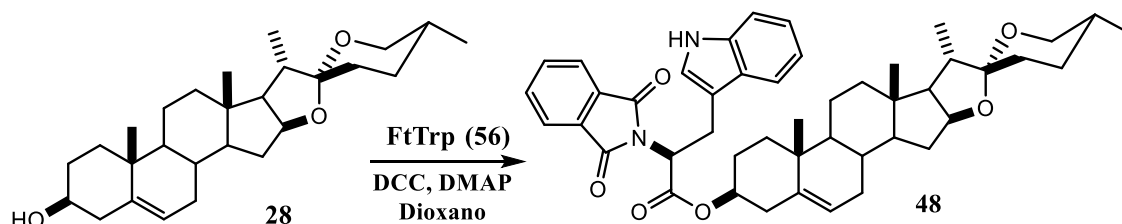


Figura 27. Ftalamidato de triptófano de diosgenina, FtTrpDg (48).

El primer paso por realizar de la ruta de síntesis B es la protección del grupo hidroxilo en C-3, dado que en pasos posteriores el uso de reactivos oxidantes puede dar lugar a derivados diferentes al oxidar dicho grupo, existen diversos grupos protectores para este fin, dentro de los más utilizados están el anhídrido acético o anhídrido trifluoroacético. Los aminoácidos poseen dos grupos funcionales reactivos característicos tanto en esenciales como no esenciales, (un grupo amino y un ácido carboxílico), dada la naturaleza entre a.a. de formar enlaces peptídicos, se debe proteger alguno de los dos grupos funcionales para hacer la reacción selectiva hacia una esterificación con el grupo carboxilo, reacción que requiere de un grupo hidroxilo proporcionado por la sapogenina esteroideal. Como se muestra en el esquema 9, se usa el a.a. con el grupo amino protegido por medio de anhídrido ftálico, es decir, ftalamidato de triptófano **FtTrp (56)** (Esquema 9) que, a su vez, actuará como grupo protector del hidroxilo en C-3 de la diosgenina (**28**), misma reacción que se realizó *in situ* utilizando como activador al DCC y como catalizador al DMAP, debido a la naturaleza sólida de los reactivos, obteniéndose con rendimientos del 87 %.



Esquema 9. Reacción para la obtención de FtTrpDg (48).

Posteriormente, el derivado esterificado esteroideal se purifica y es realizado el análisis estructural por RMN, donde se observa en la figura 28 la comparación de los espectros de RMN de la materia prima **Dg (28)** y el compuesto **FtTrpDg (48)**, conservándose las señales características de **Dg (28)**, mientras que la señal H-3 se desplaza a mayor frecuencia debido al efecto protector del éster formado, así mismo, podemos observar la aparición de una señal en 3.4 correspondiente del protón α al carbonilo del éster y, en la región de mayor frecuencia, se observan las señales del grupo indol a 6.2 ppm en la región del vinilo y aromáticos, destacando dos grupos de señales a mayor frecuencia correspondientes al anillo aromático del grupo indol, y a menor frecuencia las señales del grupo protector, asignando cada uno para confirmar su estructura.

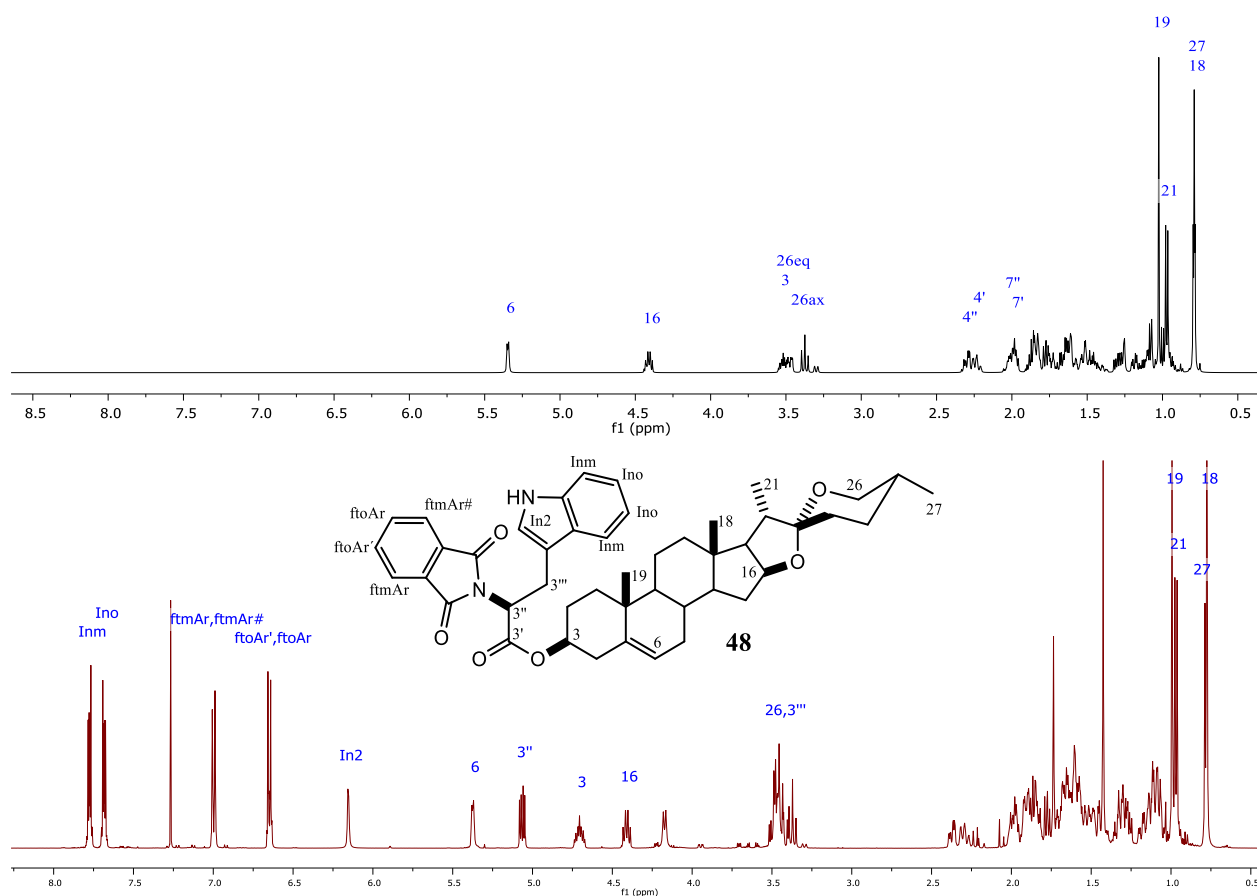
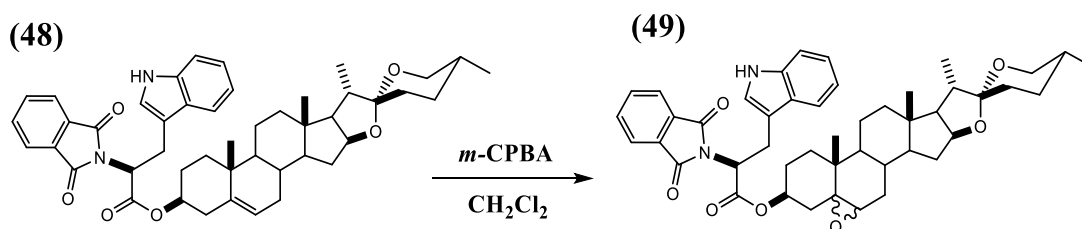


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de Dg (28) [Arriba, negro] y FtTrpDg (48) [Abajo, rojo].

3.4.4 Síntesis y caracterización de FtTrpEpx α Dg (48a) y FtTrpEpx β Dg (48b)



Esquema 10. Reacción para la obtención de la mezcla de epóxidos α y β de FtTrpDg.

La epoxidación es una metodología que permite introducir grupos funcionales reactivos, por ejemplo, hidroxilos y cetonas, siendo ampliamente utilizada y de la cual existen múltiples formas para su obtención dependiendo el objeto de estudio puesto que, en esteroides, se pueden obtener estereoisómeros del epóxido, siendo el uso de ácidos de Lewis como el ion Fe^{3+} y KMnO_4 para obtener una reacción estereoselectiva, o bien, con el uso de peroxiácidos como *m*-CPBA que no resulta estereoselectiva pero sí mayoritaria para la formación de epóxidos α .

Siguiendo con la ruta **B**, una vez protegido el hidroxilo en C-3, se comienza a trabajar con el doble enlace a través de una epoxidación, usando como reactivo un peroxiácido, *m*-CPBA, con lo cual se obtendrá una reacción concertada de epóxidos en mezcla de estereoisómeros en posición α y β , siendo mayoritario el epóxido α dada la disposición espacial. Una vez realizada la reacción, se purifica, obteniendo por cromatografía en capa fina una sola mancha con un factor de retención R_f de 0.8, con sistema de disolventes 5:5 hexano/acetato de etilo, mancha que fue considerada como la mezcla de ambos epóxidos, sin embargo, al realizarse el análisis por RMN (figura 29), se observan señales nuevas e inesperadas traslapadas, no correspondientes al producto, que al tratar de elucidarse el espectro se determina como una mezcla de epóxidos no esperados, debido probablemente a una segunda epoxidación del doble enlace del triptófano que da lugar a una mezcla de 4 epóxidos distintos sumado a una probable formación de los compuestos esperados representados en la figura 30.

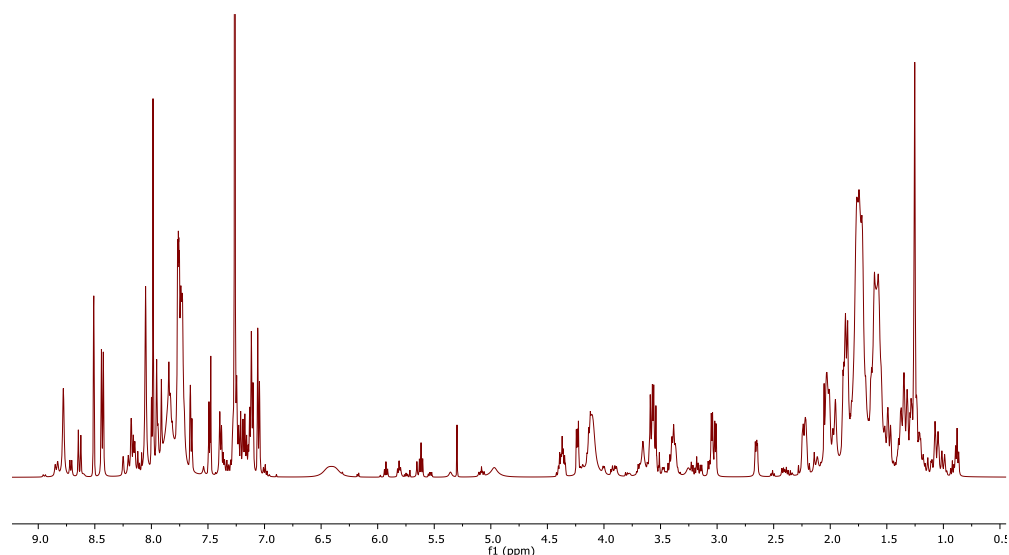


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H de la mezcla de epóxidos a 500 MHz.

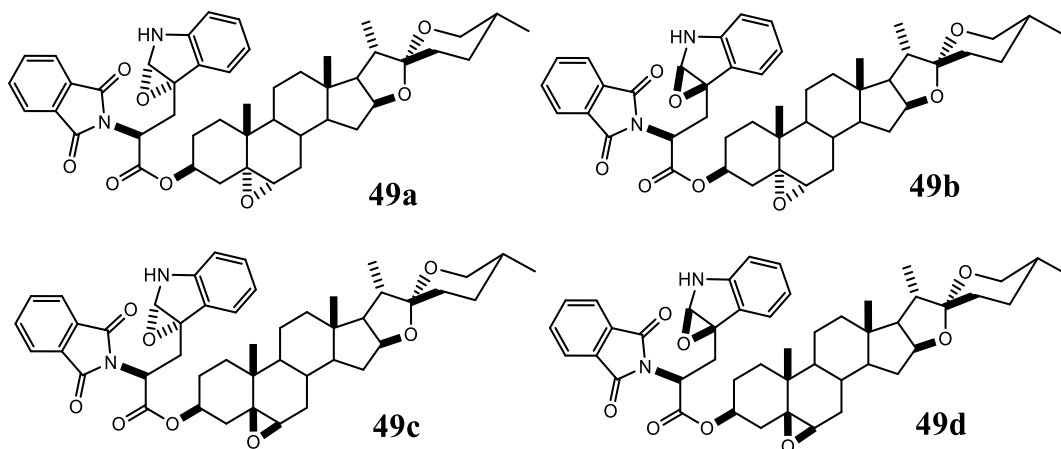


Figura 30. Mezcla obtenida de epóxidos de ftalamidato de triptófano de diosgenina.

Con este resultado se ve afectada la ruta **B**, dado que originalmente se consideraba la obtención de la mezcla de epóxidos α y β a partir del doble enlace de la diosgenina y, con la reacción de oxidación posterior, se obtendría el hidroxilo en C-5 en posición α y el carbonilo en C-6 independientemente del epóxido, sin embargo, no era esperada la reacción de epoxidación del doble enlace del triptófano debido a la aromaticidad que presenta el grupo indol, formándose 4 compuestos con isomería distinta para cada doble enlace epoxidado, dichos compuestos se destacan como de interés para estudios posteriores, sin embargo, la separación y purificación de cada uno de los epóxidos distintos es poco viable debido a los altos costos que conlleva la separación de estereoisómeros, además de que la oxidación posterior también afectaría al aminoácido, alejándonos de la obtención de uno de nuestros compuestos objetivo, razón por la cual se descarta la ruta **B** y el estudio de la mezcla de epóxidos, optando por la ruta **A** para la obtención del compuesto (**50**), sirviendo la ruta **B** con la primer reacción para la obtención de (**48**), candidato probable a evaluación biológica.

3.4.5 Síntesis y caracterización de AcDg (**34**)

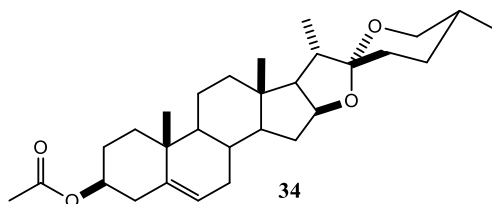


Figura 31. Acetato de diosgenina, AcDg (**34**).

Parte de la ruta **A** ha sido ampliamente estudiada, debido al interés de la obtención de 5 α -hidroxilaxogenina (**30**) partiendo de **Dg** (**28**) ya que se obtienen mejores rendimientos a partir de semi-síntesis orgánica con previa extracción de materia vegetal, por lo que se retoman dichos estudios para la modificación del doble enlace, que al igual que con la ruta **B**, se debe realizar la protección del hidroxilo en C-3 utilizando un grupo protector alternativo cuya estructura no se vea alterada con las posteriores modificaciones del doble enlace con reactivos oxidantes, siendo de los más utilizados ácido acético, anhídrido acético o formación de anhídridos mixtos, sin embargo, la mayoría de metodologías emplean catalizadores y disolventes, mientras que el uso de anhídrido acético reporta buenos rendimientos de reacción del 85% a reflujo sin el uso de solventes ni catalizadores, facilitando la purificación del compuesto. Siguiendo esta metodología, se monitorea la reacción por CCF, se purifica por medio de CC obteniéndose en rendimientos del 85 % y se analiza la estructura del compuesto puro obtenido, acetato de diosgenina, **AcDg** (**34**).

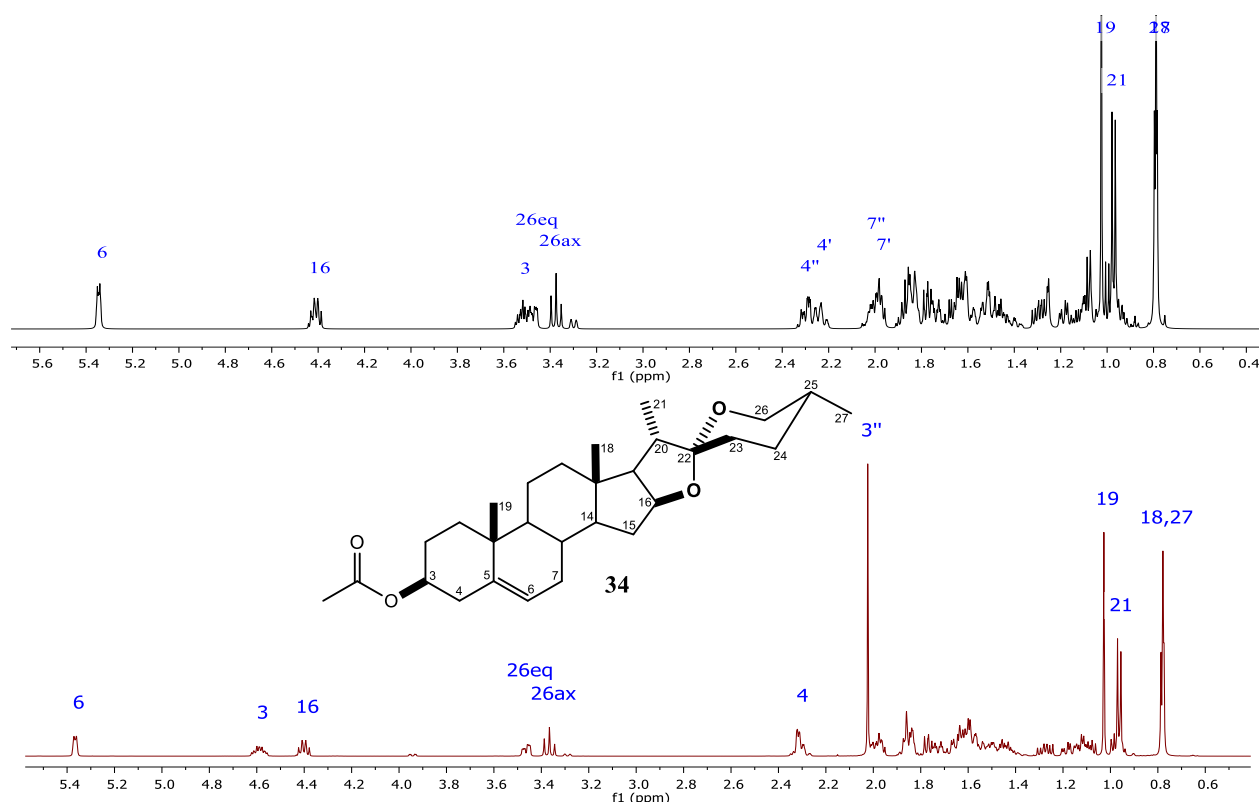


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de Dg (**28**) [Arriba, negro] y de AcDg (**34**) [Abajo, rojo].

Se compararon los espectros de RMN de la materia prima **Dg** (**28**) y el compuesto obtenido, **AcDg** (**34**) en la figura 31, notando la desaparición de la señal en la región de 3.4-3.5 ppm que corresponde al H-3 en el caso de **Dg** (**28**), dicha señal se desplaza a frecuencias mayores en 4.6 ppm debido al cambio de grupo funcional realizado, por otro lado, se observa en 2.04 ppm una señal característica que integra para 3-H correspondientes al metilo del grupo acetilo agregado, siendo el resto de señales características del resto de la estructura esteroidal que ambos comparten, confirmando de este modo la obtención del producto **34**.

3.4.6 Síntesis y caracterización de $\text{Epx}\alpha\text{AcDg}$ (**35a**) y $\text{Epx}\beta\text{AcDg}$ (**35b**)

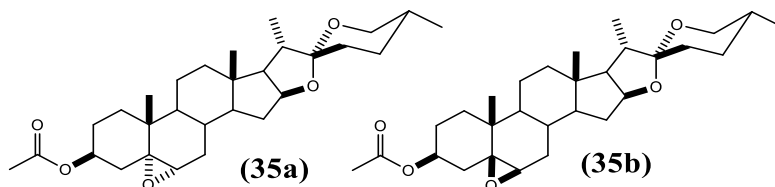


Figura 33. $\text{Epx}\alpha\text{AcDg}$ (**35a**) y $\text{Epx}\beta\text{AcDg}$ (**35b**).

Se opta por utilizar el peroxiácido *m*-CPBA que, si bien, no permitirá una reacción estereoselectiva, no es de interés la purificación de cada estereoisómero para evaluación biológica al mostrar energías de afinidad débiles en el estudio *in silico*, aunado al hecho de que la posterior oxidación dará lugar a un hidroxilo en posición α en C-5 y a un grupo cetónico en C-6, independientemente del estereoisómero.

Se purificó por técnicas cromatográficas obteniendo un rendimiento del 90% de la mezcla de ambos epóxidos para su posterior caracterización, resultando necesario el análisis por RMN dado que técnicas como análisis por infra rojo no distinguen estereoisómeros; se observa en el espectro de resonancia (Figura 34), la pérdida de la señal del protón vinílico correspondiente al doble enlace, además de la aparición de dos señales en 3.00 y 3.08 ppm correspondientes al protón H-6 ahora base de oxígeno, cada una correspondiente al protón en posición pseudo-axial y pseudo-ecuatorial, efecto que se traslada al protón en C-3 ya que cuando el grupo epóxido se encuentra en la cara α tiene un efecto protector con H-3, efecto minimizado cuando se encuentra en cara β , denotando así la presencia de ambos epóxidos. El resto de las señales se conservan en ambos espectros, mostrando que el resto de la estructura sigue intacta.

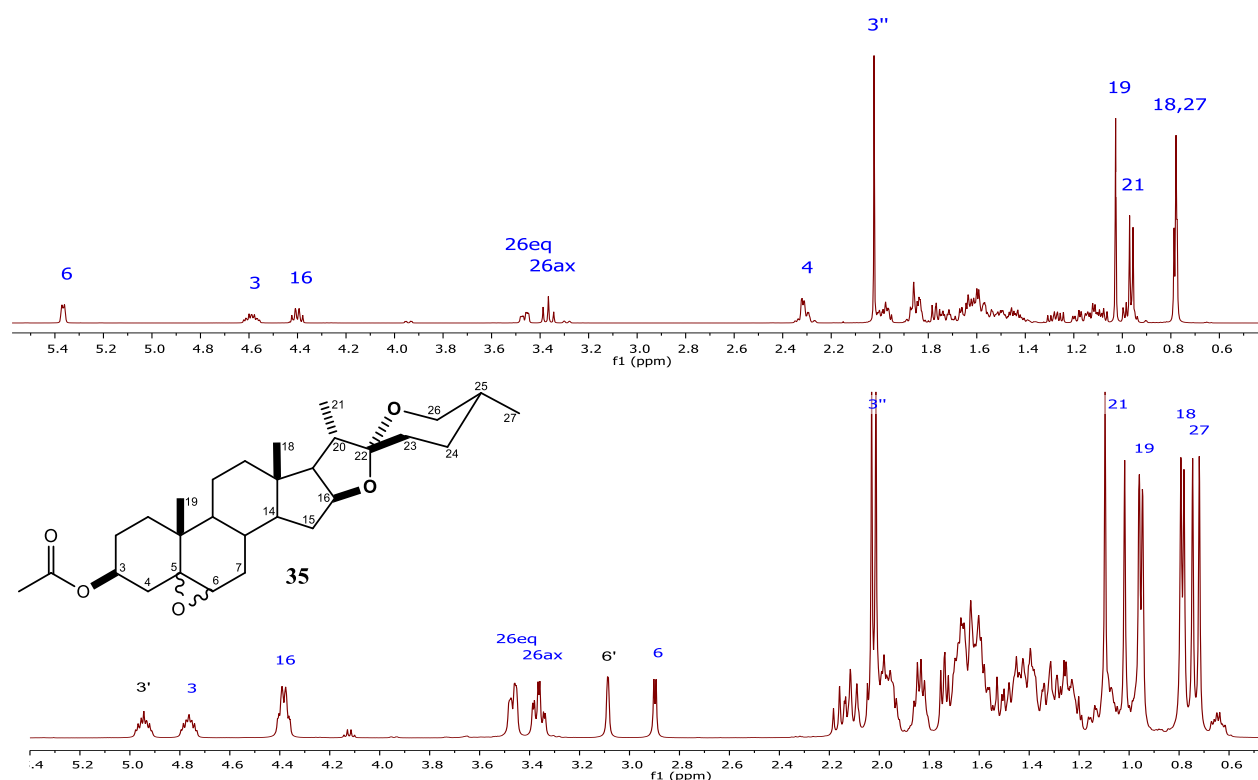


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de AcDg (**34**) [Arriba] y mezcla de **35a** y **35b** [Abajo].

3.4.7 Síntesis y caracterización de Ac5OHLaxo (**36**)

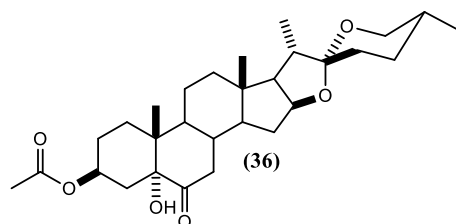


Figura 35. Acetato de 5 α -hidroxilaxogenina, Ac5OHLaxo (**36**).

Una vez obtenido el epóxido del doble enlace, se procede con la oxidación para obtener el compuesto **36**, siendo característico por un grupo hidroxilo en posición α en C-5 y un grupo cetónico en C-6. Esta reacción es posible con un reactivo oxidante tal como reactivo de Jones o trióxido de cromo CrO_3 , en donde se reporta ya el mecanismo de acción que consiste en la protonación del oxígeno del anillo epoxídico, seguida de un ataque nucleofílico por la cara α del esteroide, dando lugar a grupos hidroxilos en C-5 y C-6, sufriendo este último, al ser alcohol secundario, una oxidación inmediata por el oxidante en dilución acuosa, dando lugar al grupo cetónico en C-6 y al grupo hidroxilo en posición α en C-5.

Una vez monitoreada la reacción por CCF, se purificó el compuesto por CC con rendimientos del 89 % y se analizó la estructura del compuesto por medio de RMN (Figura 36), en el cual se puede observar el desplazamiento de la señal de C-5 a frecuencias menores cercanas a 80 ppm, mientras que la señal de C-6 se desplaza a frecuencias mayores de alrededor de 202 ppm, se encuentra también la señal de 3' alrededor de 170 ppm debido a la acetilación, mientras que el resto de las señales se mantiene, por ejemplo, con los metilos 18, 19, 21 y 27 que se mantienen en la región de 13 a 20 ppm.

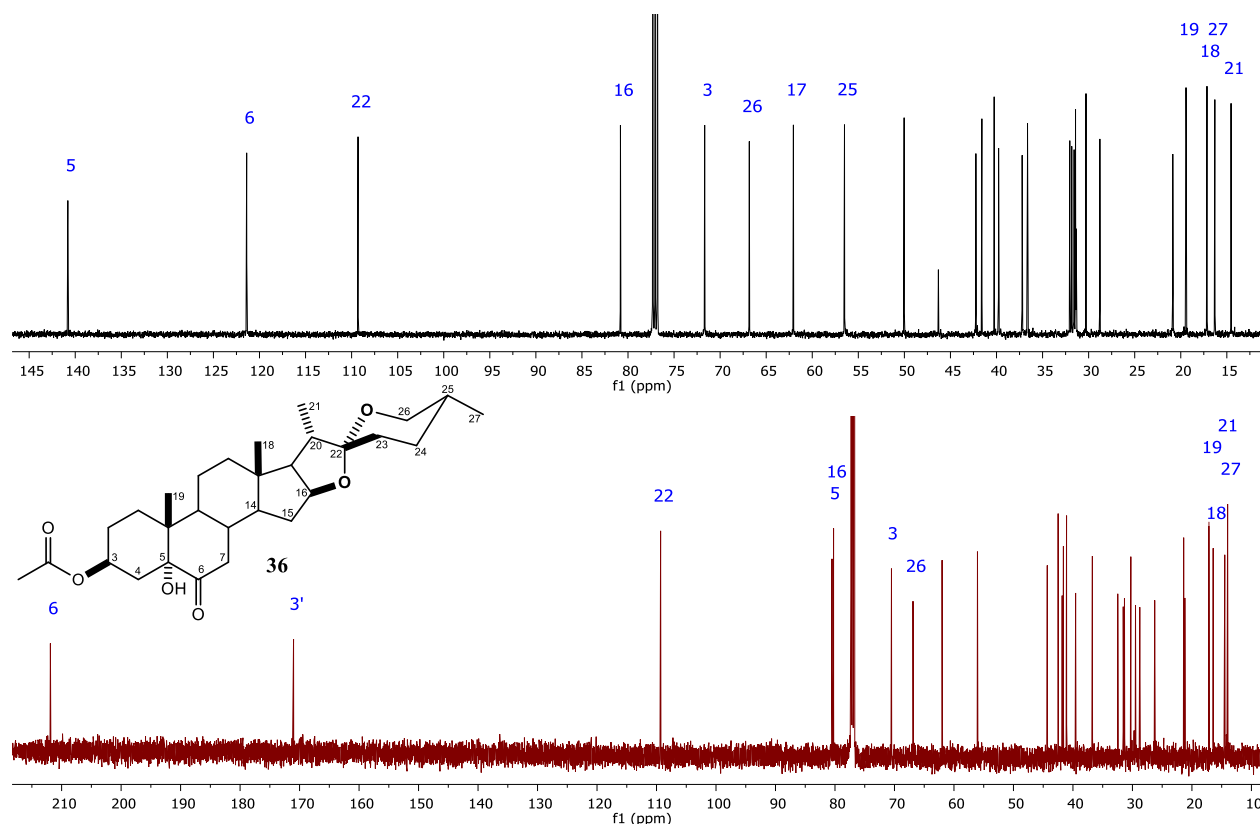


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de Dg (**28**) [Arriba, negro] y de Ac5OHLaxo (**36**) [Abajo, rojo].

3.4.8 Síntesis y caracterización de 5OHLaxo (30)

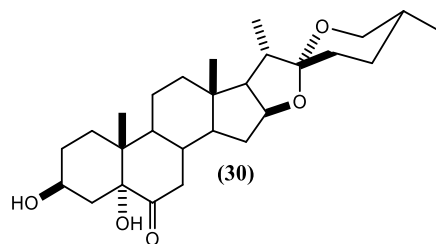


Figura 37. 5 α -hidroxilaxogenina, 5OHLaxo (30).

Para la obtención del compuesto de interés se requirió de una reacción de esterificación en el hidroxilo en posición C-3 por lo que se requirió eliminar la protección previa realizada, es decir, la eliminación de la acetilación de dicho grupo hidroxilo mediante hidrólisis básica con el uso de hidróxido de potasio, reacción que da lugar debido a que el oxígeno realiza un ataque nucleofílico al carbono base de carbonilo éster, siendo buen electrófilo, llevando a cabo una adición del grupo hidroxilo para después, el par electrónico del oxígeno regresar a la formación del doble enlace, rompiendo el enlace de éster, finalmente llevándose a cabo un equilibrio ácido-base con el que la reacción se desplaza a la formación del producto **30**, haciendo esta metodología efectiva. De este modo se obtiene el compuesto **5OHLaxo (30)** con buenos rendimientos del 83 %, siendo este nuestro compuesto a esterificar posteriormente con **FtTrp (56)**.

Una vez purificado, se realizaron los estudios de RMN, mostrándose el espectro en la figura 38 donde se mantiene la señal del grupo cetónico en C-6 cercano a 215 ppm, mientras que se observa la desaparición de la señal de 3' de alrededor de 170 ppm debido a la correcta desacetilación del OH-3, manteniéndose el resto de las señales intactas y constantes denotando que no se ha alterado el resto de la estructura y se ha obtenido correctamente 5 α -hidroxilaxogenina (**30**).

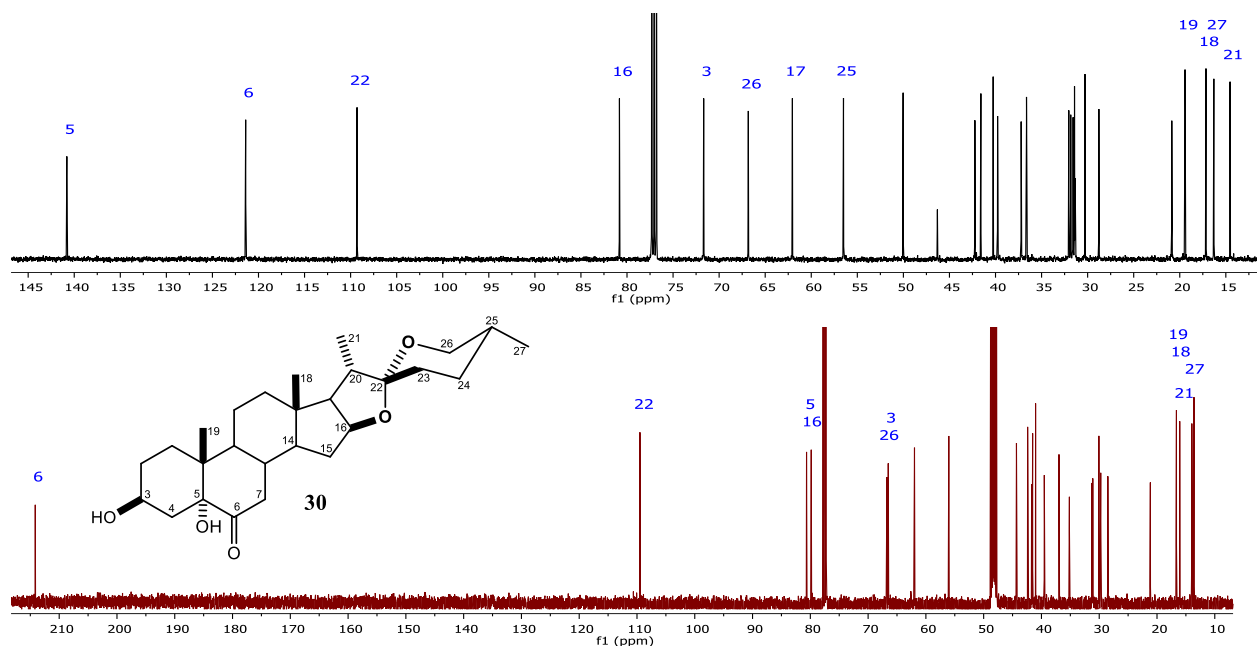


Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz de Dg (28) [Arriba, negro] y de 5OHLaxo (30) [Abajo, rojo].

3.4.9 Síntesis y caracterización de FtTrp5OHLaxo (47)

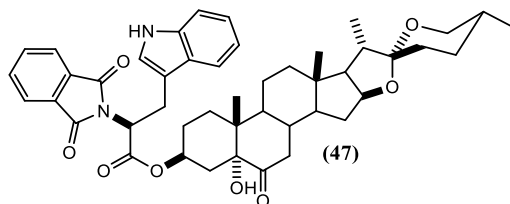


Figura 39. Ftalamidato de triptófano de 5α-hidroxilaxogenina, FtTrp5OHLaxo (47).

Para la obtención del compuesto **47** se requirió de la preparación previa de **FtTrp** (**56**) para asegurar la esterificación con el ácido carboxílico y a su vez, evitar la formación de enlaces peptídicos entre moléculas de triptófano. Primeramente, se realiza la esterificación utilizando DMAP como catalizador y DCC como activador, a reflujo, obteniéndose con rendimientos del 78% análogamente al caso de cuando se obtuvo el derivado **FtTrpDg** (**48**).

En la figura 40 podemos observar el espectro de RMN, donde encontramos las señales de los protones del ftalamidato e indol en regiones de entre 6 y 8 ppm asignadas en la figura; encontramos también el efecto en el desplazamiento a mayor frecuencia de H-3 respecto a Dg (**28**) debido a la esterificación, encontrando además las señales de 3'' y 3''' correspondientes al esqueleto del FtTrp. Se recalca la eliminación de las señales que integraban para el protón vinílico en H-6 debido al grupo cetónico en C-6 propio de la 5α-hidroxilaxogenina, asimismo, se mantienen las señales de los protones de C-16 y C-26 que indica un núcleo esteroidal intacto, aunado a las señales de los protones correspondientes a los grupos metilos 18, 19, 21 y 27, constatando la obtención del derivado **FtTrp5OHLaxo** (**47**).

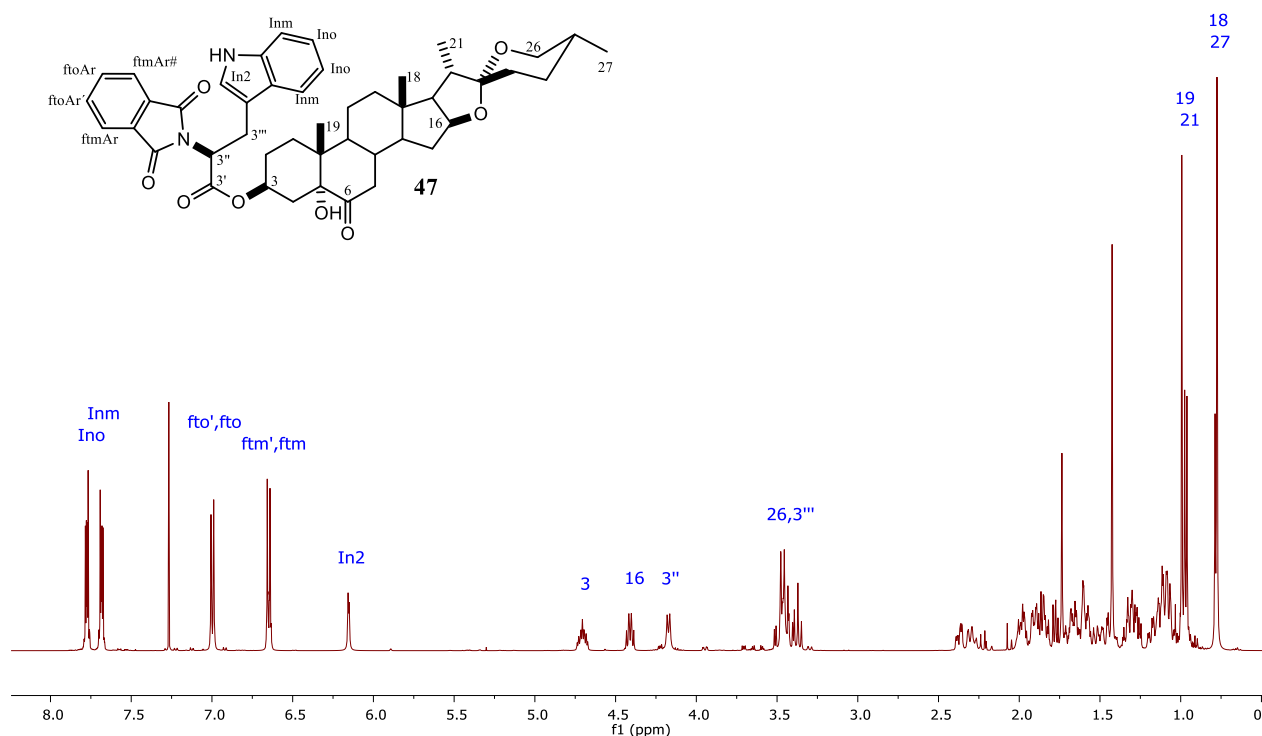


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de FtTrp5OHLaxo (47).

3.4.10 Síntesis y caracterización de Trp5OHLaxo (50)

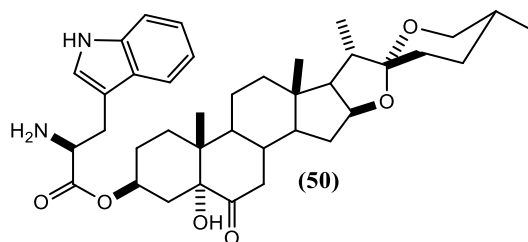


Figura 41. Tryptofanato de 5 α -hidroxilaxogenina, Trp5OHLaxo (50).

Para la obtención del compuesto final (50) realizamos la desprotección del grupo amino del a.a. partiendo del compuesto 47, es decir, la eliminación del anhídrido ftálico con el reactivo hidrazina NH_2NH_2 para de este modo obtener el derivado de triptófano, destacando la precipitación del ftalamidato de hidrazina. Es recuperado el producto cuantitativamente en la fase alcohólica y obteniéndose con rendimientos del 92%.

Se corrobora la estructura en el espectro de RMN de ^1H (Figura 42), donde se observa la desaparición de las señales correspondientes al grupo Ft que aparecían en la región de 6.5 a 7 ppm, conservando las señales del grupo indol, además, las señales caracterizadas para 3, 3'' y 3''' del esqueleto del Trp se mantienen, con lo que se afirma la correcta esterificación y desprotección del Trp; además, se observan nuevamente las señales de los protones de C-16 y C-26 que en conjunto a las señales de los protones que integran para los grupos metilos 18, 19, 21 y 27 indican un núcleo esteroidal intacto, obteniéndose así, con rendimientos del 92%, el derivado **Trp5OHLaxo (50)**.

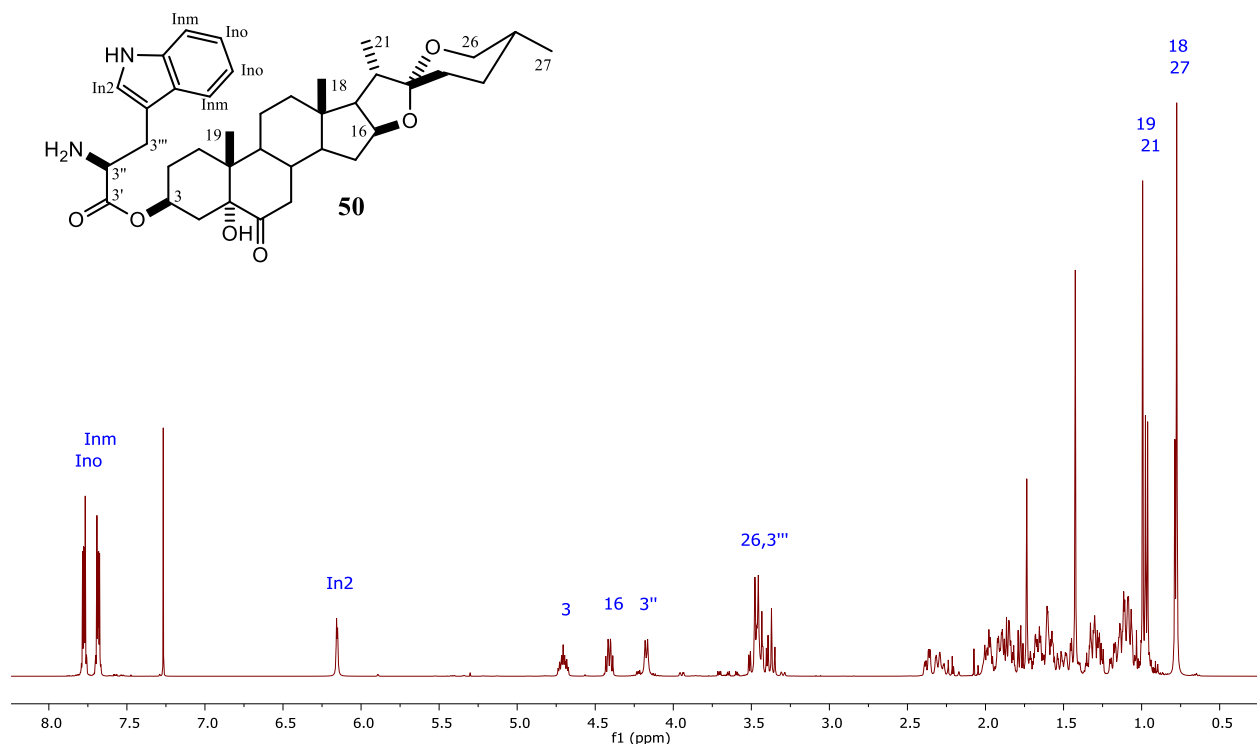


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de FtTrp5OHLaxo (50).

3.5 Evaluación biológica en modelo de rata Wistar

Tras combinar los estudios *in silico* y resultados de síntesis, seleccionamos al **FtTrpDg (48)** y **Trp5OHLaxo (50)** para la evaluación biológica, los cuales fueron administrados a 4 grupos de ratas: ratas control administradas con 6 dosis de SSI/24 horas; ratas con SOP inducido con valerato de estradiol administradas con 6 dosis de SSI/24 horas; ratas con SOP inducido con valerato de estradiol administradas con 6 dosis del compuesto **48**/24 horas y ratas con SOP inducido, administrados con 6 dosis del compuesto **50**/24 horas. 72 horas después de la última dosis se realiza el sacrificio y perfusión intracardiaca de SSI para la obtención de ovarios y útero.

El estudio biológico se resume en dos etapas: la primera fue sobre el estado fisiológico de los animales, en el que su estado general fue bueno, mismo que se reflejó en incremento de su peso corporal, al momento del sacrificio no hubo anormalidades macroscópicas visibles como hemorragia, mientras que el peso, volumen y densidad de los ovarios y útero fue registrado; la segunda etapa consistió en la técnica histológica de órganos extraídos para la evaluación de efectos en tejidos de útero y ovarios, y en particular estudio histológico en el caso de útero.

De la primera etapa se obtienen los resultados mostrados en la tabla 6 tras la administración de **FtTrpDg (48)** a ratas con SOP. Se observó que el peso de las ratas no cambió significativamente con relación a las ratas control no enfermas, mientras que el peso de los ovarios (mg/kg) disminuyó significativamente en las ratas con SOP; al administrar el compuesto **FtTrpDg (48)**, el peso incrementó casi al nivel de las ratas sanas sin alcanzar la diferencia estadística. Por otro lado, el volumen de los ovarios disminuyó significativamente al administrar el compuesto **48** en comparación a las ratas con SOP y ratas control sanas. Además, la densidad de los ovarios disminuyó significativamente en las ratas con SOP en comparación con las ratas del grupo control, mismo que aumentó significativamente con el derivado **48**, incluso a mayor valor que en las ratas control sanas, este resultado sugiere mayor número de células por unidad de volumen. Por otro lado, el peso del útero aumentó en las ratas con SOP y disminuyó al administrar **48** a un valor semejante al de las ratas sanas siendo posible indicador de mejoría.

Tabla 6. Efecto del FtTrpDg (48) (50 µg/Kg, ip) sobre ovarios y útero de rata Wistar con SOP.

Grupos	Peso (g)	Ovarios (mg/100 g)	Vol. Ovarios (µl)	Densidad	Útero (mg/100 g)
Control	216±5	32.5±1.9	125±17	0.26	188±25
SOP	220±13	18.5±2.1*	100±25	0.19*	213±69
SOP+(48)	217±7	19.6±3.3*	63±7*	0.31	188±19

* Disminución -vs-control; ANOVA de una vía; ± EEM.

En la etapa 2, se observan los efectos de **Trp5OHLaxo (50)** (Tabla 7), donde el peso de las ratas no se modificó tras la administración de **50**, sin embargo, el peso útero (mg/100g) disminuyó en las ratas con SOP vs las ratas control, mismo que se restableció tras la administración de **50**, siendo un indicador de mejoría, resultado que fue similar al obtenido con el compuesto **48**. También, el peso de los ovarios tuvo la misma tendencia de **48** dado que disminuyó significativamente vs ratas sanas y ratas con SOP, el peso aumentó al administrar **50**, sin embargo, no presento diferencia significativa. Por otro lado, el volumen de los ovarios disminuyó significativamente en las ratas con SOP y, con mayor efecto tras la administración de **50**, mientras que la densidad de los ovarios disminuyó significativamente en las ratas con SOP y se restableció con el compuesto **50**. Este efecto fue mayor que el obtenido al administrar el compuesto **48**, sugiere que la densidad celular es mayor y podría traducirse como mejoría de la enfermedad.

Tabla 7. Efecto de Trp5OHLaxo (50) (50 µg/Kg, ip) sobre ovarios y útero de ratas Wistar con SOP.

Grupos	Peso (g)	Ovarios (mg/100 g)	Vol. Ovarios (µl)	Densidad	Útero (mg/100 g)
Control	216±5	32.5±1.9	125±17	0.26	188±25
SOP	220±13	18.5±2.1*	100±25	0.19*	213±69
SOP+(50)	211±9	19.5±5.5*	50±12*	0.39	193±29

* Disminución -vs- control; ANOVA de una vía; ± EEM.

En la segunda etapa se realizó la medición de las capas celulares del útero, previamente fue necesario aplicar las técnicas histológicas de rutina para su análisis con microscopio, captura de micrografías y mediciones de las capas de la mucosa luminal, endometrio y miometrio con el software *Motic 2.0*. Fueron estudiados 4 grupos de ratas: ratas sanas control, ratas con SOP, ratas con SOP+**50** y ratas con SOP+**48**. Se analizaron las desregulaciones ocasionadas por SOP en el útero (Figura 43), siendo el endometrio de prioridad dado que regula su crecimiento a través de moléculas de tipo esteroidal y diversos receptores hormonales que usualmente se ven afectados por el SOP. Complicaciones con el endometrio tales como exceso de estrógenos y falta de progesterona ocasiona crecimiento anormal de esta capa de útero en ratas enfermas con SOP.

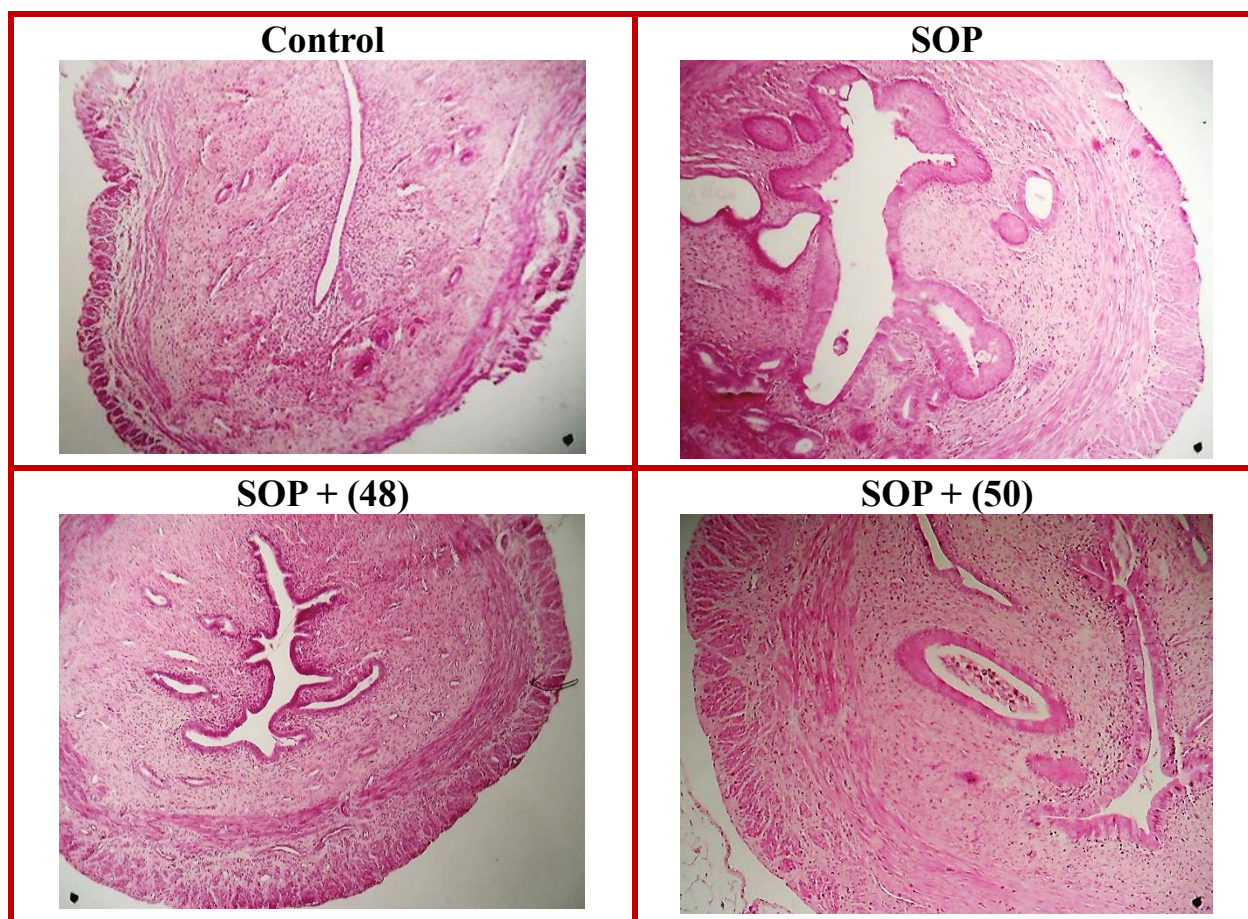


Figura 43. Cortes histológicos representativos transversales del cuerno uterino de rata Wistar control, ratas con SOP y ratas con SOP administradas con los compuestos **48** o **50**. Tinción con Hematoxilina-eosina (H&E). Amplificación 4X.

Las mediciones de cada capa de útero fueron evaluadas y comparadas para cada grupo, enfocándose en las diferencias reportadas para el útero como la hiperplasia de endometrio en ratas con SOP o anomalías tejidos anormales deslocalizados. Las mediciones se condensaron en la tabla 8 y se aplicaron las pruebas estadísticas ANOVA y Tukey para afirmar las variaciones, encontrando en el análisis ANOVA de una vía que existían diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos de ratas para todas las capas de útero; gracias a este resultado se aplica la prueba Tukey para determinar en qué condiciones hubo diferencias. Obteniendo así la gráfica 10, donde los datos corresponden al promedio y al error estándar de la media (EEM).

El espesor de la mucosa luminal tuvo un aumento estadísticamente significativo con **Trp5OHLaxo (50)** en comparación con las ratas control y con SOP, mientras que con **FtaTrpDg (48)** no hubo cambios. En endometrio, la zona más estimulada por esteroides, el espesor aumentó con **48** respecto a las ratas con SOP, restableciéndolo a valores del grupo control sano mientras que **50** no demostró diferencias. El espesor del miometrio, la capa más externa formada de células musculares, presenta una ligera tendencia de disminución al contraer SOP respecto a ratas control sanas, en esta capa fue donde se observó mayor efecto, puesto que con el compuesto **48** existe un aumento del grosor respecto al grupo con SOP e incluso respecto al grupo control sano, por lo que se considera un efecto anabólico al sobreestimar dicha capa al aumentar su espesor a valores

mayores del grupo control sano; mientras que con **50** muestra un aumento respecto al grupo con SOP únicamente, restableciéndolo a valores del grupo control sano.

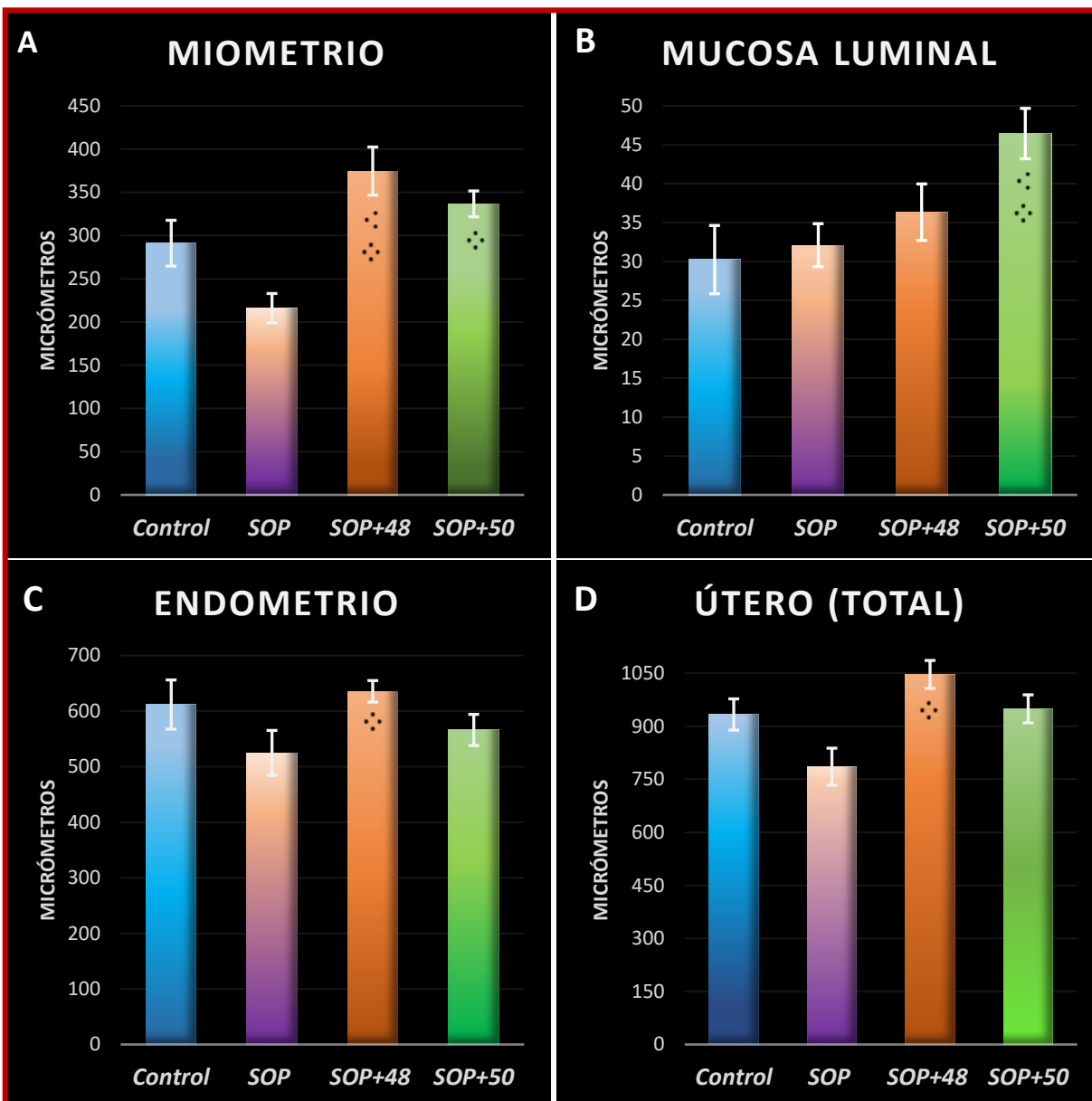
Tabla 8. *Espesor de las capas del útero (μm) de ratas Wistar con SOP y administradas con derivados esteroidales: FtTrpDg (**48**) o Trp5OHLaxo (**50**).*

Grupos	Mucosa luminal	Endometrio	Miometrio	Espesor total
Control	30 $\pm$ 4	612 $\pm$ 44	291 $\pm$ 27	933 $\pm$ 44
SOP	29 $\pm$ 3	572 $\pm$ 40	273 $\pm$ 17	874 $\pm$ 52
SOP+(48)	36 $\pm$ 4	636 $\pm$ 19 $\cdot\cdot$	375 $\pm$ 28 $\cdot\cdot$ $\cdot\cdot$	1047 $\pm$ 39 $\cdot\cdot$
SOP+(50)	46 $\pm$ 3 $\cdot\cdot$ $\cdot\cdot$	566 $\pm$ 28	337 $\pm$ 15 $\cdot\cdot$	949 $\pm$ 40

$\cdot\cdot$: Aumento -vs- control; $\cdot\cdot$: Aumento -vs- SOP; ANOVA de una vía post Tukey; $\pm$ EEM.

Un aspecto importante a considerar es la dosis administrada, para este experimento se usaron 50 $\mu\text{g/Kg}$ en dosis diarias por 6 días, la dosis fue calculada con base en los estudios previos de nuestro grupo de trabajo en los que moléculas relacionadas como **Dg (28)** y **26OHDg (29)** tuvieron efectos inhibitorios [11] existiendo la posibilidad de mostrar mejores. Sin embargo, es necesario realizar más estudios sobre dosis-respuesta para tener la respuesta farmacológica mejor caracterizada.

Respecto al espesor total del útero, que abarca las 3 capas, denota una diferencia al administrar **48** y únicamente respecto al grupo con SOP, lo que indica un efecto estimulador que restablece el útero a valores del grupo control sano, siendo éste un indicador de mejoría, cambio principalmente dado por la sobreestimulación de las células musculares del miometrio probablemente por división celular, sin embargo, no afecta a la mucosa luminal y reestablece el endometrio. Por su parte, el espesor total de útero con **50** no denota diferencias significativas respecto al resto de grupos, sin embargo, se observa entre cada capa que sí tiene un efecto estimulador en la mucosa luminal, sin embargo, no tiene efectos en endometrio aun siendo la zona más susceptible a hormonas, mientras que en miometrio no presenta un efecto sobreestimulante como lo hace **48**, pero sí un efecto estimulador respecto al grupo con SOP, característica que podría ser deseable.



Gráfica 10. Espesor de las capas de útero (μm): A) Miometrio, B) Mucosa luminal, C) Endometrio y D) Espesor total de útero. $\cdot$: Aumento -vs- control; $\cdot\cdot$: Aumento -vs- SOP; ANOVA de una vía post Tukey; $\pm$ EEM.

Se estudiaron 9 proteínas como moléculas blanco probadas por los estudios de acoplamiento molecular. La alta actividad biológica del derivado **FtTrpDg (48)** estimuló el desarrollo del útero, efecto que puede obtenerse por la activación de múltiples receptores en las células del órgano blanco y la activación de varias cascadas de señalización intracelular principalmente localizadas en endometrio y miometrio; además, el peso húmedo de útero sugiere restablecimiento tras la administración del compuesto y complementario a esto, **48** tuvo altas energías de afinidad para las 9 proteínas analizadas, es probable entonces que dicha estimulación se deba a un acoplamiento notorio con múltiples receptores tales como el receptor de estrógenos α y β , interleucina-6, receptor

de andrógenos, receptor de progestágenos y MARRS, además, es probable un acoplamiento con los receptores CD95 y CSP-3, ocasionando posibles alteraciones en apoptosis, desencadenando un aumento del espesor, sugiriendo una baja especificidad por los receptores.

Por su parte, los estudios de acoplamiento molecular para el derivado **Trp5OHLaxo (50)** mostraron buenas afinidades por los 9 receptores probados, siendo destacables con el receptor de andrógenos y el receptor MARRS principalmente, a diferencia de **48**, denotándolo probablemente como más específico de estas vías. Complementariamente, las mediciones del útero muestrearon también efectos estimulatorios, pero menores que con **48**, sugiriendo menor actividad biológica pero mayor especificidad y afinidad para ciertas dianas de ciertas células activando vías de señalización más específicas, puesto que endometrio, siendo más susceptible a hormonas, no se vio alterado, mientras que la mucosa y el endometrio sí aumentaron su espesor.

4. CONCLUSIONES

- ❖ Con base en la literatura fueron propuestas dos rutas de síntesis **A** y **B** con 9 proteínas blanco, que intervienen en la enfermedad del SOP. Además, los estudios *in silico* de acoplamiento molecular aportaron las energías de afinidad para todos los compuestos de la ruta **A**, siendo la ruta **B** la de mejores resultados, que incluye a los compuestos **FtTrpDg 48**, **FtTrpEpxDg 49**, **FtTrp5OHLaxo 47** y **Trp5OHLaxo 50** vs los ligandos de referencia; estableciendo con mayor importancia los compuestos **48** y **50**.
- ❖ Con base en ADME complementamos los criterios para el estudio de acoplamiento molecular y seleccionamos las moléculas para la síntesis química, lo que dió paso a establecer la ruta de síntesis prioritaria, teniendo en cuenta el potencial biológico teórico. La ruta principal de síntesis fue la ruta **B**, de donde **50** obtuvo los resultados más cercanos a los rangos requeridos para una administración oral. Además, permitió descartar la vía de administración oral de los derivados debido al tamaño e insolubilidad de los compuestos.
- ❖ La ruta de síntesis **B** constó de 4 pasos, mientras que la ruta **A** constó de 6 pasos. En ambas se buscó la obtención de los derivados **47** y **50**, sin embargo, la ruta **B** permitía la obtención de los derivados **48** y **49**. Exitosamente se realizó la obtención del compuesto **48**, sin embargo, la ruta **B** resultó inespecífica al generarse subproductos de la reacción para la obtención del compuesto **49** como se observó en los espectros de RMN, esto debido a que el reactivo oxidante utilizado para la epoxidación del doble enlace en C-5 también ocasionó la epoxidación del doble enlace en la cadena lateral del aminoácido triptófano de **48**, y favoreciendo la obtención de una mezcla de epóxidos que dificultó la obtención del compuesto **49** puro, y por ende, el resto de la ruta de síntesis, comprometiendo la viabilidad de la misma, obteniendo **48** por dicha ruta y **50** por la ruta **A**.
- ❖ Se seleccionaron los derivados para evaluación biológica en SOP partiendo de los dos criterios previamente establecidos, estudios *in silico* y ADME, sumando los resultados de síntesis química, con lo cual, se permitió elegir al compuesto **48**, debido a la viabilidad de la reacción de un solo paso, buenos rendimientos y buen potencial biológico teórico; y al compuesto **50**, debido al potencial biológico teórico y la obtención de este con una ruta de síntesis **A** de buenos rendimientos.
- ❖ La evaluación biológica en modelo de rata Wistar mostró que la administración del compuesto **48** tuvo un efecto estimulatorio en el desarrollo del útero, principalmente en la capa del miometrio seguido del endometrio, cuyo resultado se correlaciona con las buenas afinidades por los 9 receptores del estudio de acoplamiento molecular, denotándolo con una buena actividad biológica, pero con una baja especificidad por receptores.

- ❖ La evaluación biológica en modelo de rata Wistar mostró que la administración del compuesto **50** tuvo un efecto estimulador en el desarrollo del útero, principalmente en la capa del miometrio y la mucosa, sin alterar al endometrio, probablemente debido a la activación de rutas celulares específicas, cuyo resultado se correlaciona con las buenas afinidades por los receptores estudiados pero sobresaliendo para el receptor RA y MARRS, destacándolo con una buena actividad biológica, menor a **48**, pero con una mayor especificidad a receptores, característica deseable en un fármaco.
- ❖ El estudio complementario de diversos factores permitió la selección de nuevos derivados de interés con posibles aplicaciones biológicas, siendo una semi-síntesis orgánica importante, sin embargo, se vuelve fundamental dar un enfoque a los derivados a obtener, donde entra el importante rol de la bioinformática y los estudios de acoplamiento molecular, que en fases finales del desarrollo del proyecto permitió el análisis total, complementario y combinatorio que da lugar a mayor comprensión de los resultados.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Estudios de acoplamiento molecular

Se prepararon proteínas blanco, obteniendo la estructura de *Protein Data Bank* o PDB, las cuales se reportaron cristalizadas a diferentes ligandos, posteriormente se usó el programa *Chimera*, limpiando a la proteína para dejar únicamente la zona de interés a trabajar, en nuestro caso usando solo una de las múltiples y variables cadenas que poseen, además de minimizar las energías y añadir cargas de Geister, una vez esto, se usó la herramienta *DockPrep* para minimizar sus energías y, finalmente, usando *Autodock Tools 1.5.4* se generaron los formatos *pdqt* para su uso en el programa *Vina*.

Los ligandos fueron modelados en el programa *ChemDraw Professional 15.1* y posteriormente analizados en *Chem3D 15.1*, en donde se optimizó por método MM2 para encontrar la posición más estable para cada uno de los derivados de la ruta A y B.

En el programa *AutodockTools*, se generan cajas de búsqueda (Grids) que se posicionan en el interfaz del programa hasta que abarque al ligando en su totalidad, usando cajas de 70*70*70 y con coordenadas variables para cada enzima.

El programa *Vina* examina las mejores posiciones y conformaciones de los ligandos por las cajas de búsqueda de la proteína preparada, nosotros seleccionando la mejor de las conformaciones con base en su energía de afinidad, validándose para cada una de las proteínas con modelos de acoplamiento molecular 2D y 3D con los diferentes ligandos naturales de cada proteína.

5.2 Síntesis química

5.2.1 Metodología de purificación y caracterización

❖ Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas cromatográficas de gel de sílice comercial grado 60 de 0.2 mm de espesor *Allugram Xtra SIL F254*, mientras que, como fase móvil, una mezcla de solventes para formar sistemas de elución de hexano y acetato de etilo. El revelado se realizó por tratamiento de ácido sulfúrico al 50% y posterior calcinación de las placas.

❖ Cromatografía en columna

Fue empleado, como fase sólida fija, gel de sílice de 230-400 mallas *MN Kieselgel 60* de *Macherey-Nagel* mientras que la fase móvil se constituyó por sistemas de eluyentes en diferentes proporciones de hexano y acetato de etilo, desde 95:5 hasta 5:5, buscando una polaridad creciente.

❖ Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H a 500 megahertz (MHz) y de ^{13}C a 125 MHz se obtuvieron en un equipo *Bruker*, utilizando cloroformo, metanol deuterado y trimetilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresaron en partes por millón (ppm), las constantes de acoplamiento se expresaron en hertz.

5.2.2 Síntesis de compuestos

❖ Diosgenina / **Dg** (**28**)

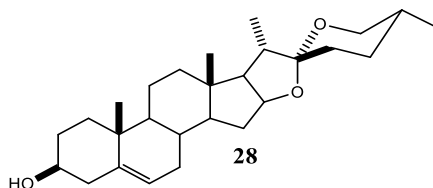


Figura 44. Diosgenina (**28**).

Diosgenina (**Dg**) comercial obtenida de *Química Meyer* con una pureza de $\pm 92\%$, posterior purificación por cromatografía en columna (CC) utilizando como fase móvil un sistema de disolventes en proporción 9:1 formada por hexano/acetato de etilo, obteniendo **28** pura con rendimiento del 88%.

Caracterización

Fórmula molecular condensada: $C_{27}H_{42}O_3$. Peso molecular: 414.63 g/mol.

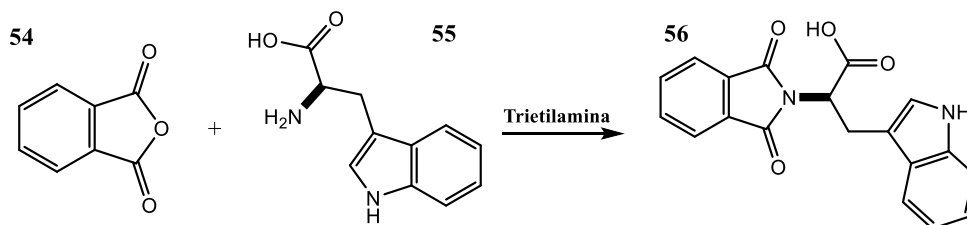
1H

δ (ppm): 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, $J_{16-15b} = 6.4$ Hz, $J_{16-17} = 8.7$, H-16), 3.52 (1H, *m*, H-3), 3.48 (1H, *m*, H-26e), 3.37 (1H, *dd*, $J_{gem} = J_{26a-25a} = 10.8$ Hz, H-26a), 1.02 (3H, *s*, CH_3 -19), 0.97 (3H, *d*, $J_{21-20} = 7.2$ Hz, CH_3 -21), 0.79 (3H, *d*, $J_{27-26} = 6.4$ Hz, CH_3 -27), 0.79 (3H, *s*, CH_3 -18).

^{13}C

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

❖ N-ftaloidimidato de triptófano / **FtTrp** (**56**)



Esquema 11. Obtención de *FtTrp* (**56**).

Se colocaron 722 mg (4.88 mmol) de anhídrido ftálico (**54**) con 500 mg (2.44 mmol) de L-triptófano (**55**) en un matraz de bola provisto con agitación y calentamiento por 4 horas, usando como disolvente tolueno y trietilamina como catalizador. Se preparó el sistema para reflujo con trampa adaptada de Dean Stark para poder eliminar el agua liberada de la esterificación.

Para el tratamiento de la reacción, se evapora el tolueno en rotavapor y se adiciona solución 5% de ácido clorhídrico, formándose un precipitado a filtrarse, obteniéndose el compuesto **56** con un 99% de rendimiento.

Caracterización

Fórmula molecular condensada: C₁₉H₁₄N₂O₄. Peso molecular: 334.13 g/mol.

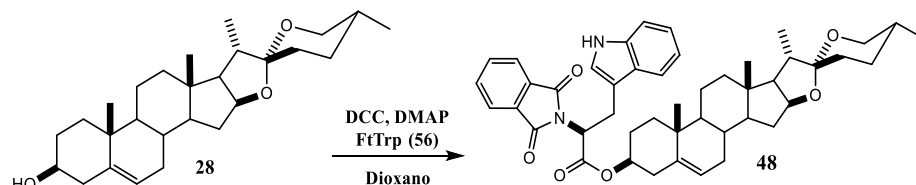
¹H

δ (ppm): 7.78 (*m*, 2H, H-fto), 7.68 (*m*, 2H, H-ftm), 7.0 (*m*, 2H, H-ftm), 6.65(*m*, 2H, H-fto), 6.22 (1H, *s*, H-In2), 3.27 (2H, *m*, H-2), 4.17 (1H, *m*, H-3).

¹³C

δ (ppm): 168.5 (C-1), 167.7 (C-ftCO), 156.9(C-Ini2), 154.9(C-fti), 131.3 (C-fto), 130.0 (C-ftm), 128.3 (C-Inm), 123.5 (C-In2), 115.5 (C-Ini1), 50.6 (C-2), 21.9 (C-3).

❖ (N-ftaloidimil) triptofanato de diosgenina / FtTrpDg (**48**)



Esquema 12. Obtención de FtTrpDg (**48**).

En un matraz de bola se añadieron 500 mg (1.2 mmol) de **Dg** (**28**) disolviéndose en 15 ml de dioxano, posteriormente se añadió 802 mg (2.4 mmol) de FtTrp, 495.19 mg (2.4 mmol) de DCC y 100 mg (0.8 mmol) de DMAP con agitación, a reflujo por una hora. Posteriormente se filtra al alto vacío para eliminar residuos sólidos utilizando como co-disolvente acetato de etilo (AcOEt), se eliminan los solventes en rotavapor y se disuelve en AcOEt para posteriores lavados con agua y finalmente secar la fase orgánica con Na₂SO₄. Posteriormente se realiza la purificación con CC utilizando un sistema de solventes 8:2 hexano/acetato de etilo, obteniendo un rendimiento del 87%.

Caracterización

Fórmula molecular condensada: C₄₆H₅₄N₂O₆. Peso molecular: 730.95 g/mol.

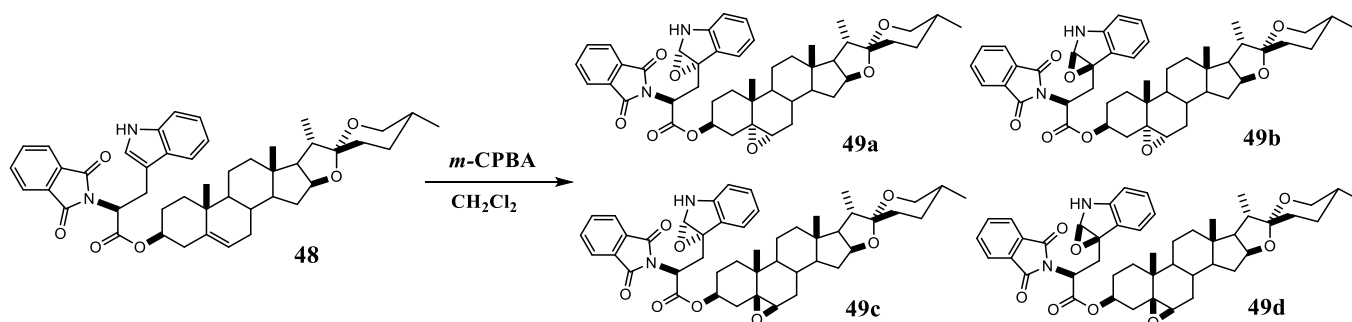
¹H

δ (ppm): 7.78 (*m*, 2H, H-fto), 7.68 (*m*, 2H, H-ftm), 7.0 (*m*, 2H, H-ftm), 6.65(*m*, 2H, H-fto), 6.22 (1H, *s*, H-In2), 5.37 (1H, *d*, J₆₋₇ = 5.2 Hz, H-6), 4.17 (1H, *m*, H-3''), 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, H-26eq), 3.42 (2H, *m*, H-3'''), 3.37 (1H, *dd*, J_{gem} = J_{26a-25a} = 10.8 Hz, H-26ax), 1.02 (3H, *s*, CH₃-19), 0.97 (3H, *d*, J₂₁₋₂₀ = 7.2 Hz, CH₃-21), 0.79 (3H, *d*, J₂₇₋₂₅ = 6.4 Hz, CH₃-27), 0.79 (3H, *s*, CH₃-18).

¹³C

δ (ppm): 168.5 (C-3'), 167.7 (C-ftCO), 156.9(C-Ini2), 154.9(C-fti), 140.8 (C-5), 131.3 (C-fto), 130.0 (C-ftm), 128.3 (C-Inm), 123.5 (C-In2), 121.4 (C-6), 115.5 (C-Ini1), 109.3 (C-22), 80.8 (C-16), 73.8 (C-3), 66.8 (C-25), 62.0 (C-17), 50.6 (C-3''), 56.5 (C-14), 50.0 (C-9), 42.2 (C-4), 41.6 (C-20), 40.2 (C-13), 39.7 (C-12), 37.2 (C-1), 36.6 (C-10), 32.0 (C-7), 31.8 (C-15), 31.6 (C-8), 31.4 (C-2), 31.3 (C-23), 30.3 (C-24), 21.9 (C-3'''), 28.8 (C-24), 20.8 (C-11), 19.4 (C-19), 16.3 (C-18), 14.5 (C-21), 17.1 (C-26).

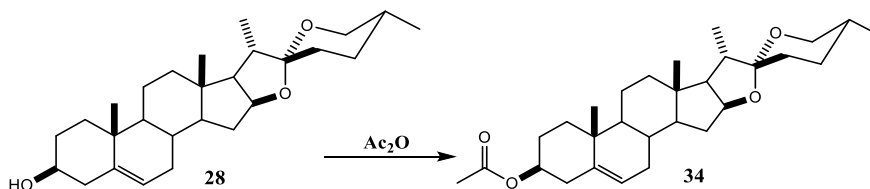
❖ Mezcla de Epóxidos de (N-ftaloidimil) triptofanatos de diosgenina (**49**)



Esquema 13. Obtención de la mezcla de epóxidos de (N-ftaloidimil) triptofanatos de Diosgenina.

Se preparó una solución de 500 mg (0.684 mmol) de **FtTrpDg (48)**, se disolvieron en 5ml de CH₂Cl₂ y se adicionaron posteriormente 300 mg (1.73 mmol) de *m*-CPBA, se mezcla a temperatura ambiente con agitación y se monitorea por CCF hasta la desaparición de la materia prima (aproximadamente 2 horas). Se extrae con 25 ml de AcOEt y se realiza una serie de lavados con salmuera, solución saturada de NaHCO₃ y agua; finalmente, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó el disolvente. El crudo de reacción se purificó por CC utilizando un sistema 8:2 hexano/acetato de etilo, mostrando una conversión del 85 % de la materia prima a la mezcla de productos observada.

❖ Acetato de diosgenina / **AcDg (34)**



Esquema 14. Obtención de AcDg (**34**).

En un matraz redondo se disolvió 1 g de Dg (**28**) (2.5 mmol) en 20 ml de anhídrido acético y se colocó a reflujo por 1 hora. Posteriormente se adiciona agua fría a manera de choque térmico para formar un precipitado blanco, se realizan lavados con una solución saturada de NaHCO₃ y luego con agua destilada. Tras la purificación, se obtiene un sólido blanco con un rendimiento del 85%.

Caracterización

Fórmula molecular condensada: C₂₉H₄₄O₄. Peso molecular: 456.67 g/mol.

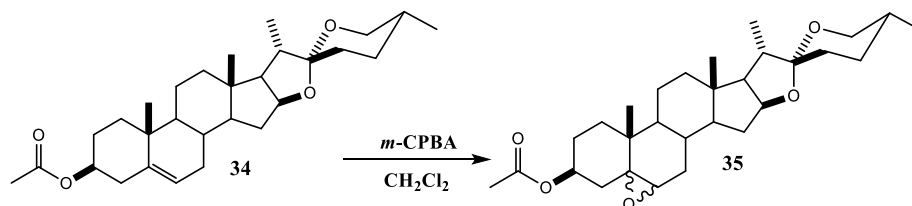
¹H

δ (ppm): 5.37 (1H, *d*, J₆₋₇ = 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, H-26_{eq}), 3.37 (1H, *dd*, J_{gem} = J_{26a-25a} = 10.8 Hz, H-26_{ax}), 2.03 (3H, *s*, CH₃COO-3), 1.02 (3H, *s*, CH₃-19), 0.97 (3H, *d*, J₂₁₋₂₀ = 7.2 Hz, CH₃-21), 0.79 (3H, *d*, J₂₇₋₂₅ = 6.4 Hz, CH₃-27), 0.79 (3H, *s*, CH₃-18).

¹³C

δ (ppm): 170.4 (CH₃COO-3), 40.8 (C-5), 121.4 (C-6), 109.3 (C-22), 80.8 (C-16), 73.8 (C-3), 66.8 (C-25), 62.0 (C-17), 56.5 (C-14), 50.0 (C-9), 42.2 (C-4), 41.6 (C-20), 40.2 (C-13), 39.7 (C-12), 37.2 (C-1), 36.6 (C-10), 32.0 (C-7), 31.8 (C-15), 31.6 (C-8), 31.4 (C-2), 31.3 (C-23), 30.3 (C-24), 28.8 (C-24), 21.4 (CH₃COO-3), 20.8 (C-11), 19.4 (C-19), 16.3 (C-18), 14.5 (C-21), 17.1 (C-26), 21.4 (CH₃COO-3)

- ❖ Mezcla de 5α, 6α y 5β, 6β de epóxido de acetato de diosgenina / **EpxαAcDg (35a)** y **EpxβAcDg (35b)**



Esquema 15. Obtención de **EpxαAcDg (35a)** y **EpxβAcDg (35b)**.

Se preparó una solución de 500 mg (1.09 mmol) de **AcDg**, se disolvieron en 5 ml de CH₂Cl₂ y se adicionaron posteriormente 300 mg (1.73 mmol) de *m*-CPBA, se mezcla a temperatura ambiente con agitación y se monitorea por CCF hasta la desaparición de la materia prima (aproximadamente 1.5 horas). Se extrae con 25 ml de AcOEt y se realiza una serie de lavados con salmuera, solución saturada de NaHCO₃ y agua. Finalmente, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó el disolvente. El crudo de reacción se purificó por CC utilizando un sistema 8:2 hexano/acetato de etilo obteniendo un sólido blanco con un 90% de rendimiento.

Caracterización

Fórmula molecular condensada: C₂₉H₄₄O₅. Peso molecular: 472.67 g/mol.

¹H

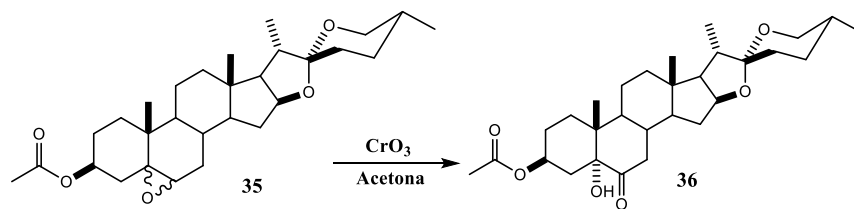
δ (ppm): 4.76 (1H, *m*, H-3), 4.32 (1H, *m*, H-16), 3.49 (1H, *dd*, J_{26e-26a} = 10.9 Hz, J_{26e-25} = 5.6 Hz, H-26_e), 3.35 (1H, *dd*, J_{26a-26e} = 10.9 Hz, J_{26a-25} = 6.5 Hz, H-26_a), 3.09 (1H, *m*, H-6), 2.04 (3H, *s*, CH₃CO₂-3), 1.08 (3H, *d*, J₂₁₋₂₀ = 7.1 Hz, CH₃-21), 0.97 (3H, *d*, J₂₇₋₂₅ = 6.8 Hz, CH₃-27), 0.88 (3H, *s*, CH₃-18), 0.82 (3H, *s*, CH₃-19).

¹³C

δ (ppm): 170.4 (CH₃COO-3), 109.3 (C-22), 80.8 (C-16), 73.8 (C-3), 66.8 (C-25), 62.0 (C-17), 61.5 (C-5), 60.0 (C-6), 56.5 (C-14), 50.0 (C-9), 42.2 (C-4), 41.6 (C-20), 40.2 (C-13), 39.7 (C-12), 37.2

(C-1), 36.6 (C-10), 32.0 (C-7), 31.8 (C-15), 31.6 (C-8), 31.4 (C-2), 31.3 (C-23), 30.3 (C-24), 28.7 (C-24), 21.4 (CH₃COO-3), 20.8 (C-11), 19.4 (C-19), 17.1 (C-26), 16.3 (C-18), 14.5 (C-21).

❖ Acetato de 5α-hidroxilaxogenina / **Ac5OHLaxo (36)**



Esquema 16. Obtención de Ac5OHLaxo (36).

En un matraz de bola se colocaron 500 mg (1.05 mmol) de la mezcla de epóxidos de acetato de Dg (**35a y b**), se disolvieron en 2 ml de acetona con agitación, posteriormente se añadieron 210 mg (2.10 mmol) de CrO₃ disueltos en 0.25 ml de agua con lo que el matraz se calentó ligeramente cuidando de no pasar los 55°C, se mantiene en agitación por 45 minutos monitoreándose la reacción por CCF hasta la desaparición de la materia prima. El crudo de reacción es vertido en un matraz Erlenmeyer con agua fría a manera de choque térmico, el sólido precipita, se filtra y se evapora el solvente. El crudo de reacción se purifica en CC utilizando como fase móvil un sistema 6:4 hexano/acetato de etilo, obteniendo rendimientos del 89 %.

Caracterización

Fórmula molecular condensada: C₂₉H₄₄O₆. Peso molecular: 488.67 g/mol.

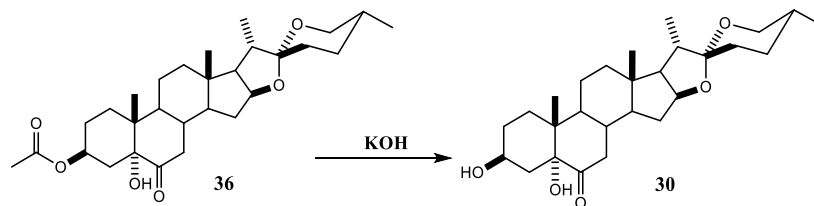
¹H

δ (ppm): 5.02 (*m*, 3H, H-3), 4.41 (*m*, 1H, H-16), 3.47 (*ddd*, J= 10.8, 4.5, 1.7 Hz, 1H, H-26eq.), 3.36 (*dd*, J = 10.9, 10.9 Hz, H-26ax.), 2.77 (*dd*, J= 12, 12.9 Hz, 1H, H- 7), 2.01 (*s*, 3H, CH₃COO-3), 0.97 (*d*, J = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.83 (*s*, 3H, H-19), 0.79 (*d*, J =6.4 Hz, 3H, H-27), 0.76 (*s*, 3H, H-18).

¹³C

δ (ppm): 212.05 (C-6), 171.14 (CH₃COO-3), 109.26 (C-22), 80.48 (C-16), 80.10 (C-5), 70.71 (C-3), 66.83 (C-26), 62.02 (C-17), 56.03 (C-14), 44.28 (C-9), 42.46 (C-10), 41.77 (C-7), 41.59 (C-20), 41.05 (C-13), 39.54 (C-12), 36.74 (C-8), 32.30 (C-4), 31.51 (C-15), 31.32 (C-23), 30.23 (C-25), 29.48 (C-1), 28.74 (C-24), 26.24 (C-2), 21.32 (CH₃COO-3), 21.17 (C-11), 17.07 (C-27), 16.36 (C-18), 14.40 (C-21), 13.93 (C-19).

❖ 5 α -hidroxilaxogenina / 5OHLaxo (**30**)



Esquema 17. Obtención de 5OHLaxo (**30**).

Se colocó en un matraz 1.0 g (2.04 mmol) de acetato de 5 α -hidroxilaxogenina (**36**) y 30 ml de una solución de KOH al 10% en etanol. Mediante agitación, la reacción es llevada a cabo a temperatura ambiente y monitoreada por CCF hasta la desaparición de la materia prima (aproximadamente 1 hora). El crudo de reacción se recuperó con metanol, se evaporó el solvente en rotavapor y se filtró al alto vacío. Se realizó CC para purificar el compuesto, utilizando como sistema de solventes 5:5 hexano/acetato de etilo, obteniendo rendimientos del 83%.

Caracterización

Fórmula molecular condensada: C₂₇H₄₂O₅. Peso molecular: 446.63 g/mol.

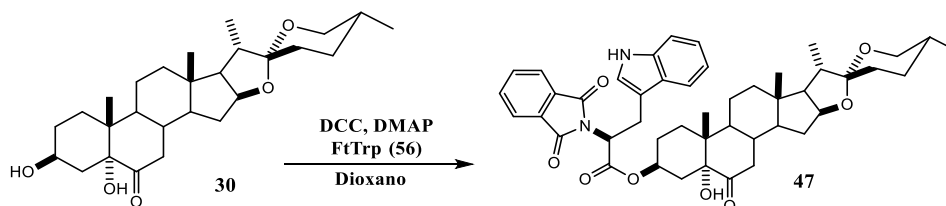
¹H

δ (ppm): 4.33 (*m*, 1H, H-16), 3.82 (*m*, 3H, H-3), 3.38 (*ddd*, *J*= 10.8, 4.5, 1.7 Hz, 1H, H-26eq.), 3.26 (*dd*, *J*= 10.9, 10.9 Hz, H-26ax.), 2.72 (*dd*, *J*= 12, 12.9 Hz, 1H, H-7), 0.90 (*d*, *J*= 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.83 (*s*, 3H, H-19), 0.75 (*d*, *J*= 6.4 Hz, 3H, H-27), 0.76 (*s*, 3H, H-18).

¹³C

δ (ppm): 214.05 (C-6), 109.63 (C-22), 80.56 (C-16), 79.71 (C-5), 66.83 (C-26), 66.74 (C-3), 62.0 (C-17), 56.06 (C-14), 44.31 (C-9), 42.40 (C-10) 41.77 (C-7), 41.51 (C-20), 41.02 (C-13), 39.40 (C-12), 36.74 (C-8), 32.30 (C-4), 31.32 (C-23), 31.27 (C-15), 30.23 (C-25), 29.74 (C-1), 28.74 (C-24), 26.24 (C-2), 21.03 (C-11), 16.64 (C-27), 16.03 (C-18), 14.40 (C-21), 13.96 (C-19).

❖ (N-ftaloidimil) triptofanato de 5 α -hidroxilaxogenina / FtTrp5OHLaxo (**47**)



Esquema 18. Obtención de FtTrp5OHLaxo (**47**).

En un matraz de bola se añadieron 500 mg (1.12 mmol) de 5 α -hidroxilaxogenina (**30**) disolviéndose en 15 ml de dioxano, posteriormente se añadió 802.39 mg (2.24 mmol) de FtTrp (**56**), 462.17 mg (2.24 mmol) de DCC y 100 mg (0.8 mmol) de DMAP, con agitación a reflujo por una hora. Posteriormente se filtra al alto vacío para eliminar residuos sólidos utilizando como co-disolvente AcOEt, se eliminan los solventes en rotavapor y se disuelve en AcOEt, se realizan lavados con agua destilada y posteriormente se seca la fase orgánica con Na₂SO₄.

Se realiza la purificación por CC utilizando un sistema de solventes 5:5 hexano/acetato de etilo, obteniendo un rendimiento del 78%.

Caracterización

Fórmula molecular condensada: C₄₆H₅₄N₂O₈. Peso molecular: 762.94 g/mol.

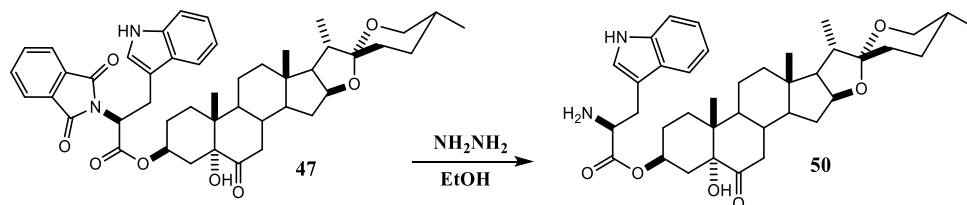
¹H

δ (ppm): 7.78 (*m*, 2H, H-fto), 7.68 (*m*, 2H, H-ftm), 7.0 (*m*, 2H, H-ftm), 6.65(*m*, 2H, H-fto), 6.22 (1H, *s*, H-In2), 5.02 (*m*, 3H, H-3), 4.41 (*m*, 1H, H-16), 4.17 (1H, *m*, H-2), 3.47 (*ddd*, *J*= 10.8, 4.5, 1.7 Hz, 1H, H-26eq.), 3.42 (2H, *m*, H-3''), 3.36 (*dd*, *J*= 10.9, 10.9 Hz, H-26ax.), 3.27 (2H, *m*, H-3''), 2.77 (*dd*, *J* = 12, 12.9 Hz, 1H, H-7), 0.97 (*d*, *J*= 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.83 (*s*, 3H, H-19), 0.79 (*d*, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-27), 0.76 (*s*, 3H, H-18).

¹³C

δ (ppm): 212.05 (C-6), 168.5 (C-3'), 167.7 (C-ftCO), 156.9(C-Ini2), 154.9(C-fti), 131.3 (C-fto), 130.0 (C-ftm), 128.3 (C-Inm), 123.5 (C-In2), 115.5 (C-Ini1), 109.26 (C-22), 80.48 (C-16), 80.10 (C-5), 70.71 (C-3), 66.83 (C-26), 62.02 (C-17), 56.03 (C-14), 50.6 (C-3''), 44.28 (C-9), 42.46 (C-10), 41.77 (C-7), 41.59 (C-20), 41.05 (C-13), 39.54 (C-12), 36.74 (C-8), 32.30 (C-4), 31.51 (C-15), 31.32 (C-23), 30.23 (C-25), 29.48 (C-1), 28.74 (C-24), 26.24 (C-2), 21.9 (C-3'''), 21.17 (C-11), 17.07 (C-27), 16.36 (C-18), 14.40 (C-21), 13.93 (C-19).

❖ (25*R*)-3-triptofanato de 5α-hidroxi espirostan-6-ona / Trp5OHLaxo (50)



Esquema 19. Obtención de Trp5OHLaxo (50).

En un matraz de bola se añadieron 500 mg (0.655 mmol) de **FtTrp5OHLaxo (50)** con 0.5 ml de NH₂NH₂ y 5 ml de EtOH, con agitación a reflujo constante por 2 horas, monitoreándose con CCF, posteriormente se filtra por gravedad para obtener estructuras cristalinas puras, finalmente, se elimina el etanol remanente para obtener el producto cuantitativamente con rendimientos de alrededor del 92%.

Caracterización

Fórmula molecular condensada: C₃₈H₅₂N₂O₆. Peso molecular: 632.84 g/mol.

¹H

δ (ppm): 7.0 (*m*, 2H, H-ftm), 6.65(*m*, 2H, H-fto), 6.22 (1H, *s*, H-In2), 5.02 (*m*, 3H, H-3), 4.17 (1H, *m*, H-3''), 4.41 (*m*, 1H, H-16), 3.47 (*ddd*, *J* = 10.8, 4.5, 1.7 Hz, 1H, H-26eq.), 3.42 (2H, *m*, H-3''), 3.36 (*dd*, *J* = 10.9, 10.9 Hz, H-26ax), 2.77 (*dd*, *J*=12, 12.9 Hz, 1H, H-7), 2.01 (*s*, 3H, CH₃COO-3),

0.97 (*d*, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.83 (*s*, 3H, H-19), 0.79 (*d*, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-27), 0.76 (*s*, 3H, H-18).

¹³C

δ (ppm): 212.05 (C-6), 168.5 (C-3'), 156.9 (C-Ini2), 128.3 (C-Inm), 123.5 (C-In2), 115.5 (C-Ini1), 109.26 (C-22), 80.48 (C-16), 80.10 (C-5), 70.71 (C-3), 66.83 (C-26), 62.02 (C-17), 56.03 (C-14), 44.28 (C-9), 42.46 (C-10), 41.77 (C-7), 41.59 (C-20), 41.05 (C-13), 39.54 (C-12), 36.74 (C-8), 32.30 (C-4), 31.51 (C-15), 31.32 (C-23), 30.23 (C-25), 29.48 (C-1), 28.74 (C-24), 26.24 (C-2), 21.17 (C-11), 17.07 (C-27), 16.36 (C-18), 14.40 (C-21), 13.93 (C-19).

5.3 Evaluación biológica

5.3.1 Ratas Wistar

Fueron utilizadas ratas hembra de la cepa Wistar, reproducidas en el bioterio *Claude Bernard-BUAP*. Las ratas se mantuvieron a una temperatura de 23°C, humedad del 50%, libre acceso a alimento y agua con ciclos de luz-obscuridad de 12 horas. Se siguieron los protocolos y lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) debido a la bioética que conlleva la experimentación en animales, destacando la capacitación previa sobre el cuidado, manipulación y técnicas quirúrgicas de ratas para fines del proyecto.

5.3.2 Seguimiento de ciclo estral

Fueron realizados frotis vaginales cada 24 horas para el monitoreo completo del ciclo estral. Los frotis fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina/Eosina rápida y observadas en microscopio óptico de campo claro marca *Zeiss Axiostar plus*, acoplado a una cámara fotográfica *Canon* de 8 megapíxeles para capturas remotas a una PC por medio de la aplicación *Camera Window*, con lo cual se tomaron fotografías. Las etapas se dividen en 4, siguiendo los siguientes criterios (Anexo D):

- ❖ Estro: Gran cantidad de células epiteliales.
- ❖ Metaestro: Gran cantidad de leucocitos y disminución de células epiteliales.
- ❖ Diestro: Casi totalidad de leucocitos con pocas células epiteliales y pocas nucleadas.
- ❖ Proestro: Aumento de las células nucleadas, en mayoría, con una disminución de leucocitos.

5.3.3 Inducción del SOP

Tras el seguimiento del ciclo estral de la rata y la confirmación de un ciclo regular, se seleccionaron aleatoriamente ratas para formar dos grupos, uno al cual se administró valerato de estradiol a dosis única de 4 mg/0.4 ml por vía subcutánea, usando aceite de maíz comercial marca *Mazola* como vehículo; y a un segundo grupo se administró con dosis única de 0.4 ml de aceite de maíz por vía subcutánea.

5.3.4 Confirmación del SOP

Se realizó la confirmación de SOP por medio de citología vaginal para determinar variaciones en el ciclo estral, usando como indicador el estro o proestro persistente por 4 días, tras 60 días de evolución desde la aplicación de la dosis.

5.3.5 Preparación de FtTrpDg (48) y Trp5OHLaxo (50) para su inyección como suspensión

Tras la obtención y purificación de los compuestos, se obtuvo un sólido blanquecino del cual se toma 1 mg de cada uno por separado y se disuelven en 10 µl de alcohol etílico absoluto, posteriormente, se agita vigorosamente hasta alcanzar la homogeneidad y se afora cada solución a 20 ml con SSI, obteniendo una concentración de 50 µl/ml. Ambas fueron preservadas en oscuridad a 4°C previo uso.

5.3.6 Administración de FtTrpDg (48) y Trp5OHLaxo (50)

Tras confirmar el SOP, se monitoreó el ciclo estral para ver posibles cambios previos y posteriores a la administración de los compuestos **48** y **50**, así, se formaron 4 grupos de estudio y se eligió aleatoriamente la distribución; se procedió a la administración de los derivados a una concentración de 50 µg/kg cada 24 horas por 6 días, administrados vía intraperitoneal.

5.3.7 Obtención de ovarios y útero

Se realiza el seguimiento del ciclo estral (4 días) posteriores y se procedió a la eutanasia para obtención de los órganos de interés: ovarios y útero. Se colocaron las ratas una a una en cámara saturada con CO₂ medicinal como anestesia, posteriormente se perfundieron por vía intracardiaca con solución salina isotónica (SSI) por 10 minutos y posteriormente PBS-paraformaldehído al 4% por 5 minutos. Se disecan y extraen ovarios y útero, registrando el peso y volumen húmedo de cada órgano. Para su conservación, se mantuvieron a temperatura ambiente en PBS-paraformaldehído por 24 horas y posteriormente se conservaron en alcohol al 70% hasta su inclusión en parafina.

5.3.8 Técnica histológica

Se obtuvo aproximadamente 1 cm de la región media de uno de los cuernos uterinos, seleccionado al azar para mantener aleatoriedad y no sesgar el resultado. Posteriormente se deshidrataron, por etapas, en alcohol a concentraciones crecientes de 70% a 100% y luego sumergidas en xileno por 1 hora, seguido de una inclusión en parafina líquida a 52°C.

Para realizar los cortes histológicos se realizaron bloques de parafina con las muestras para su posterior corte en micrótopo de deslizamiento marca *Leica SM2010R*, cortes de 5µm en intervalos de 100 µm del órgano, los cuales, una vez obtenidos se colocaron en un portaobjetos hasta realizar las tinciones.

5.3.9 Tinción de las muestras por Hematoxilina/Eosina (H&E)

Los cortes histológicos en portaobjetos se desparafinaron para luego teñirse con H&E que constó de una serie de pasos mostrados en el Anexo E, obteniendo de este modo una coloración rosa para colágeno, rojo para músculo, azul oscuro o púrpura para núcleos y rojo intenso para eritrocitos.

5.3.10 Fotografías y mediciones

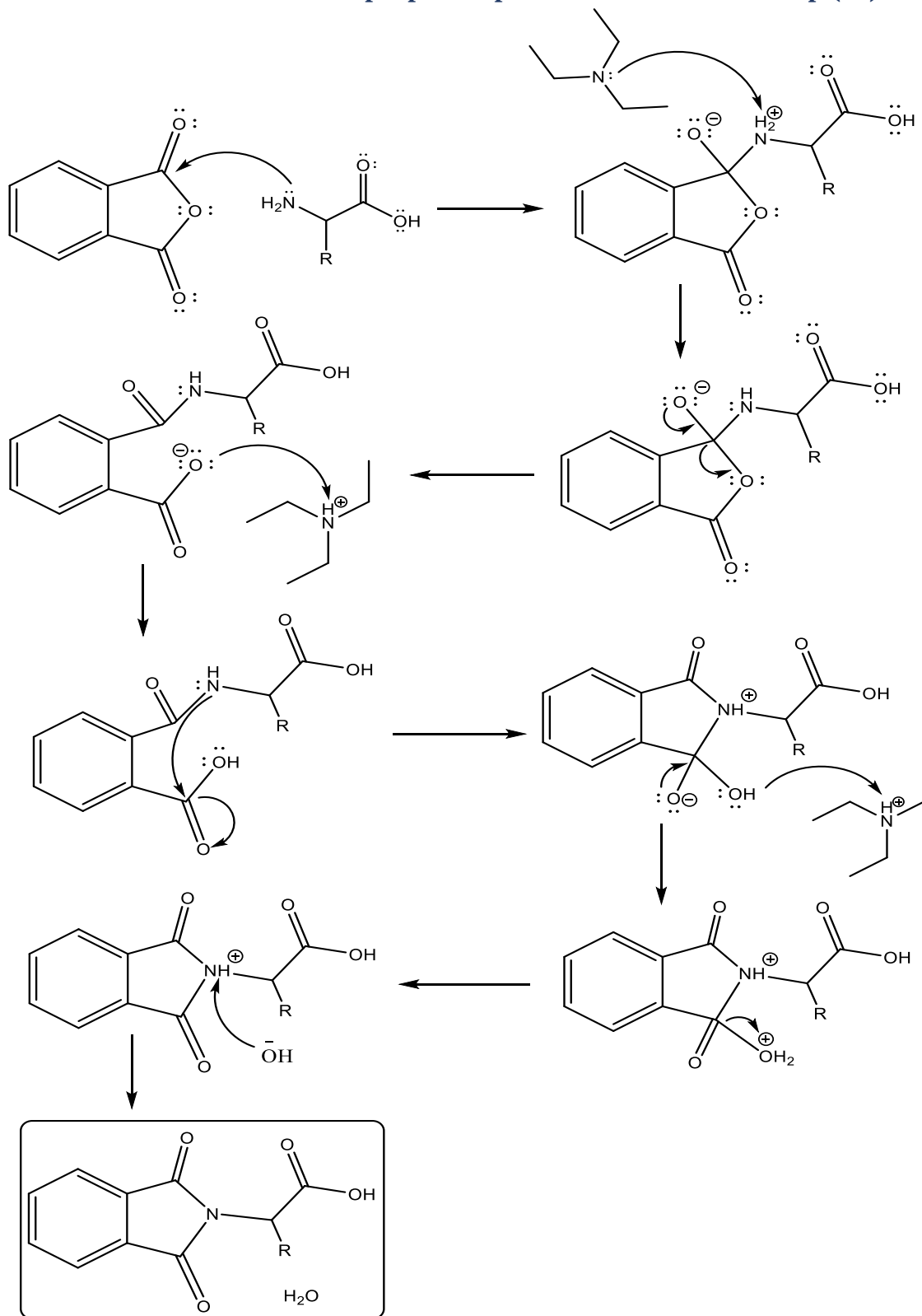
Los cortes histológicos fueron observados en microscopio óptico de campo claro marca Zeiss Axiostar plus y fotografiados mediante una cámara fotográfica acoplada marca MotiC modelo X2 a un aumento de 4X conectada vía wi-fi a una PC y analizadas mediante el programa MotiC Image Plus 2.0 previamente calibrado *para mediciones de útero en ratas Wistar, realizando y registrando las mediciones de cada capa de útero, expresadas en micrómetros.*

5.3.11 Pruebas estadísticas

En todas las comparaciones se usa la prueba de análisis de una varianza (ANOVA) de una vía, tomando en cuenta una diferencia en los grupos cuando la probabilidad entre ellos fue igual o menor a 5%; post ANOVA, se realizó prueba de Tukey para determinar las variaciones específicas entre cada grupo; los datos se expresaron como el error estándar de la media ($\pm$ EEM), utilizando los softwares Microsoft Excel Office 365 y Minitab 18.

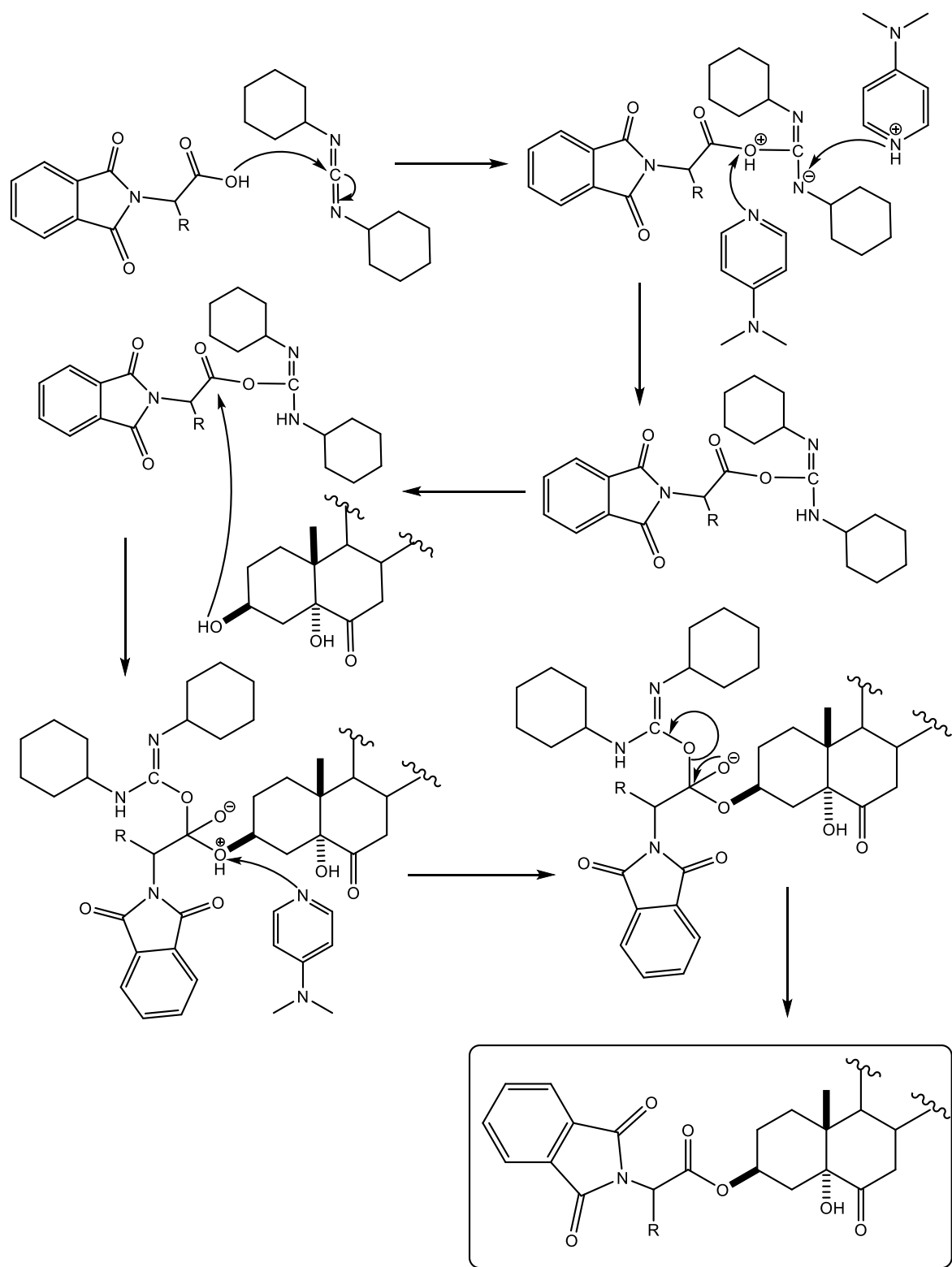
6. ANEXOS

ANEXO A: Mecanismo de acción propuesto para la obtención de FtTrp (56).



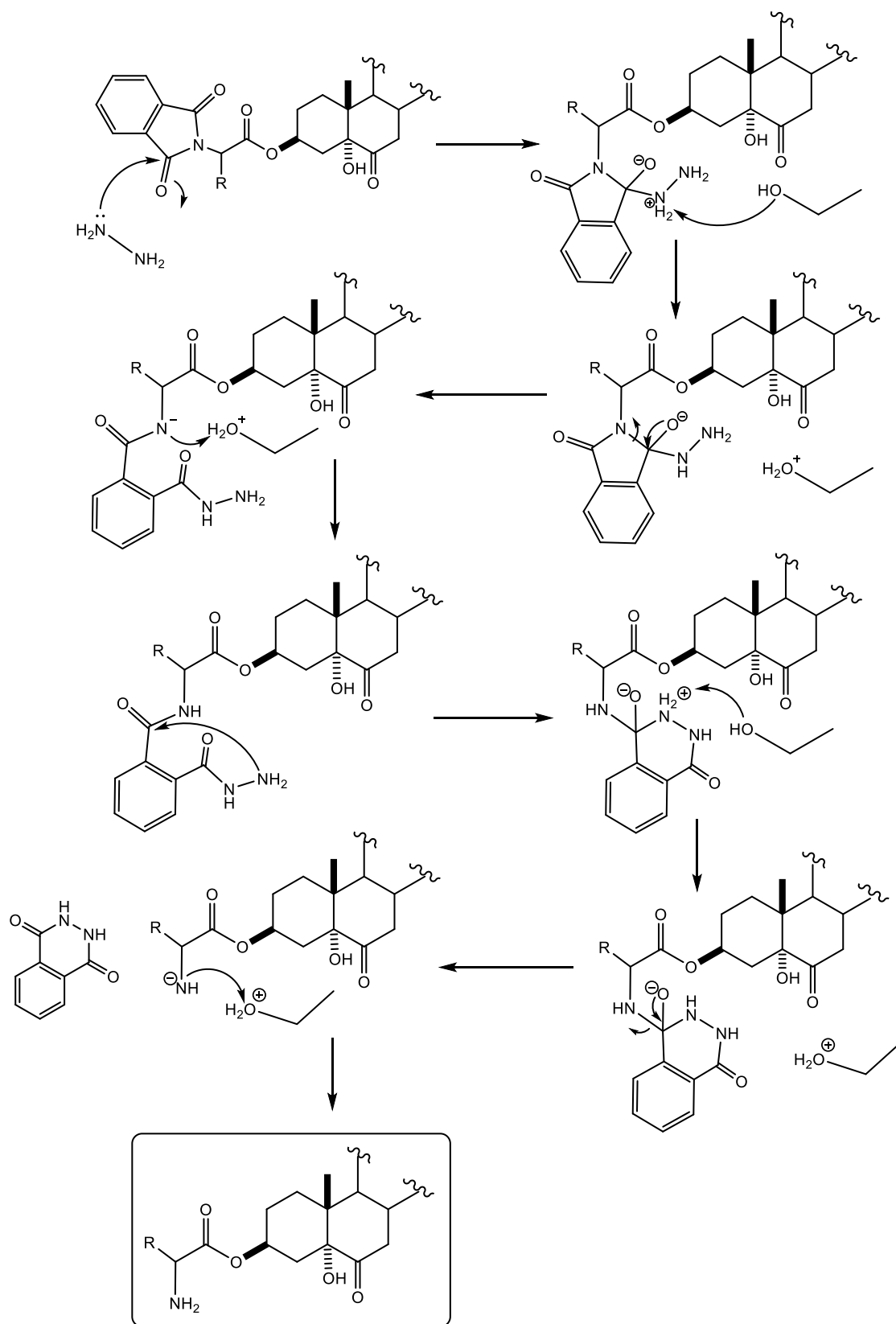
Esquema 20. Mecanismo de acción propuesto para la formación de ftalamidato de triptófano.

ANEXO B: Mecanismo de acción propuesto para la obtención de FtTrp5OHLaxo (49).



Esquema 21. Mecanismo de acción propuesto para la esterificación de 5α-hidroxilaxogenina y ftalamidato de triptófano.

ANEXO C: Mecanismo de acción propuesto para la obtención de Trp5OHLaxo (50).



Esquema 22. Mecanismo de acción propuesto para la desprotección del grupo amino del triptófano (FtTrp) esterificado.

ANEXO D: Ciclo Estral de rata Wistar

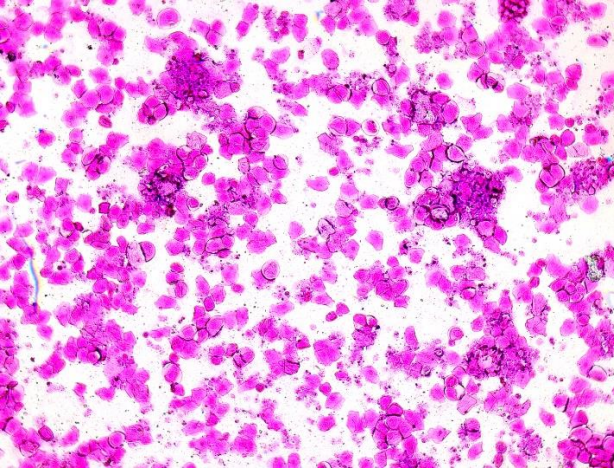
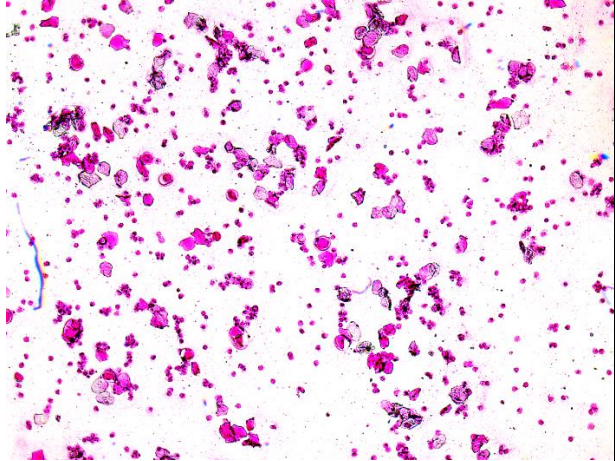
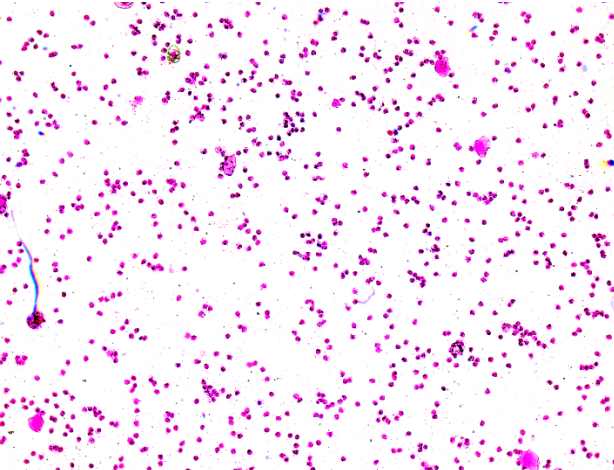
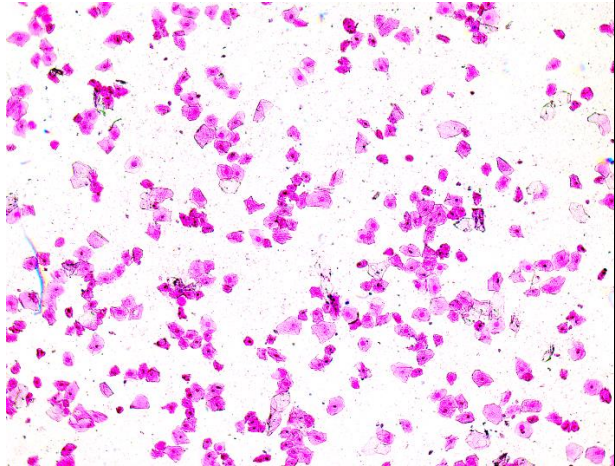
ESTRO  ❖ Gran cantidad de células epiteliales.	METAESTRO  ❖ Gran cantidad de leucocitos y disminución de células epiteliales.
DIESTRO  ❖ Casi totalidad de leucocitos con pocas células epiteliales y pocas nucleadas.	PROESTRO  ❖ Aumento de las células nucleadas, en mayoría, con una disminución de leucocitos.

Figura 45. Micrografías de citología vaginal de ratas Wistar teñidas con H&E. Amplificación 4X.

ANEXO E: Tinción Hematoxilina-Eosina (H&E)

PROCEDIMIENTO

1. Desparafinación e hidratación

❖ Xilol 1	10 min
❖ Xilol 2	3 min
❖ Alcohol-Xilol	1 min
❖ Alcohol Absoluto	1 min
❖ Alcohol Absoluto	1 min
❖ Alcohol 96°	1 min
❖ Alcohol 96°	1 min
❖ Agua destilada	5 lavados

2. Tinción

❖ Hematoxilina	4 min
❖ Agua destilada	5 lavados
❖ Alcohol-ácido	4 lavados
❖ Carbonato de Litio	10 lavados
❖ Agua destilada	5 lavados
❖ Eosina	3 min
❖ Agua destilada	5 lavados
❖ Alcohol 96°	1 min
❖ Alcohol 96°	1 min
❖ Alcohol 100°	1 min
❖ Alcohol 100°	1 min
❖ Alcohol-Xilol	1 min
❖ Xilol 2	1 min
❖ Xilol 1	1 min

3. Fijación con resina

INTERPETACIÓN

Colágeno: Rosa
Músculo:Rojo
Núcleos:Azul oscuro o púrpura
Eritrocitos: Rojo intenso

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. A. González, S. Echevarría, L. Aguilar, and J. Davila, *Guía de Práctica Clínica del Síndrome de Ovarios Poliquísticos, Evidencias y Recomendaciones*. Mexico: IMSS, 2010.
- [2] A. F. L. García, M. I. Pérez-Palacio, J. Lucia-Molina-Valencia, and L. M. Martínez-Sánchez, “Síndrome de ovario poliquístico y complicaciones metabólicas: Más allá del exceso de andrógenos,” *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.*, vol. 80, no. 6, pp. 515–519, 2015.
- [3] R. S. Legro *et al.*, “Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: An endocrine society clinical practice guideline,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 12, pp. 4565–4592, Dec. 2013.
- [4] W. M. Wolf, R. A. Wattick, O. N. Kinkade, and M. D. Olfert, “Geographical prevalence of polycystic ovary syndrome as determined by region and race/ethnicity,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 15, no. 11, pp. 1–13, 2018.
- [5] C. Moran, G. Tena, S. Moran, P. Ruiz, R. Reyna, and X. Duque, “Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome and Related Disorders in Mexican Women,” *Gynecol. Obstet. Invest.*, vol. 69, no. 4, pp. 274–280, Jun. 2010.
- [6] H. F. Escobar-Morreale, “Polycystic ovary syndrome: Definition, aetiology, diagnosis and treatment,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 14, no. 5, pp. 270–284, 2018.
- [7] R. L. Rosenfield, “The Polycystic Ovary Morphology-Polycystic Ovary Syndrome Spectrum,” *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.*, vol. 28, no. 6, pp. 412–419, Dec. 2015.
- [8] B. C. J. M. Fauser *et al.*, “Consensus on women’s health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS),” *Hum. Reprod.*, vol. 27, no. 1, pp. 14–24, Jan. 2012.
- [9] M. Kazemi *et al.*, “Comprehensive Evaluation of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease Risk Profiles in Reproductive-Age Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Large Canadian Cohort,” *J. Obstet. Gynaecol. Canada*, vol. 41, no. 10, pp. 1453–1460, Oct. 2019.
- [10] S. Jonard, “The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest,” *Hum. Reprod. Update*, vol. 10, no. 2, pp. 107–117, Mar. 2004.
- [11] R. S. Vázquez, “Efecto de la diosgenina y de la (26R)-26-hidroxidiosgenina sobre los ovarios y útero de ratas con síndrome de ovario poliquístico,” Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2019.
- [12] E. S. Ozyurek, T. Yoldemir, and G. Artar, “Androstenedione response to recombinant human FSH is the most valid predictor of the number of selected follicles in polycystic ovarian syndrome: (a case-control study),” *J. Ovarian Res.*, vol. 10, no. 1, May 2017.
- [13] D. A. Dumesic and R. A. Lobo, “Cancer risk and PCOS,” *Steroids*, vol. 78, no. 8, pp. 782–785, 2013.
- [14] V. Rodriguez Paris and M. J. Bertoldo, “The Mechanism of Androgen Actions in PCOS

- Etiology,” *Med. Sci.*, vol. 7, no. 9, p. 89, Aug. 2019.
- [15] A. M. Elnashar, “The role of metformin in ovulation induction: Current status,” *Middle East Fertility Society Journal*, vol. 16, no. 3. Middle East Fertility Society, pp. 175–181, 01-Sep-2011.
 - [16] W. Vitek, S. Alur, and K. M. Hoeger, “Off-label drug use in the treatment of polycystic ovary syndrome,” *Fertil. Steril.*, vol. 103, no. 3, pp. 605–611, Mar. 2015.
 - [17] D. S. Wishart *et al.*, “DrugBank: A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. SUPPL. 1, pp. D901-6, Jan. 2008.
 - [18] S. N. Unni C, L. R. Lakshman, K. Vaidyanathan, K. N. Subhakumari, and N. Leela Menon, “Alterations in the levels of plasma amino acids in polycystic ovary syndrome- A pilot study,” *Indian J. Med. Res.*, vol. 142, no. NOVEMBER, pp. 549–554, Nov. 2015.
 - [19] V. Unfer, M. Zacchè, A. Serafini, A. Redaelli, and E. Papaleo, “[Treatment of hyperandrogenism and hyperinsulinemia in PCOS patients with essential amino acids. A pilot clinical study].,” *Minerva Ginecol.*, vol. 60, no. 5, pp. 363–8, Oct. 2008.
 - [20] M. Hulchiy, Å. Nybacka, L. Sahlin, and A. L. Hirschberg, “Endometrial Expression of Estrogen Receptors and the Androgen Receptor in Women With Polycystic Ovary Syndrome: A Lifestyle Intervention Study.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 101, no. 2, pp. 561–71, Feb. 2016.
 - [21] L. G. de A. Chuffa, L. A. Lupi-Júnior, A. B. Costa, J. P. de A. Amorim, and F. R. F. Seiva, “The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers,” *Steroids*, vol. 118, pp. 93–108, 2017.
 - [22] L. C. Giudice, “Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA,” *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 20, no. 2. Baillière Tindall, pp. 235–244, 01-Jun-2006.
 - [23] D. H. Abbott, “Neuronal androgen receptor: Molecular gateway to polycystic ovary syndrome?,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 114, no. 16. National Academy of Sciences, pp. 4045–4047, 18-Apr-2017.
 - [24] D. Marcela Suárez-Calderón and I. Díaz-Yamal, “Antagonistas de receptores de progesterona (PRA) y moduladores selectivos de receptores de progesterona (SPRM): aplicaciones en ginecología y obstetricia,” 2008.
 - [25] L. D.- Medwave and undefined 2010, “Fertilidad en la perimenopausia,” *medwave.cl*.
 - [26] W. S. Yang, S. Y. Moon, M. J. Lee, E. K. Lee, and S. K. Park, “Diosgenin, an Activator of 1,25D 3 -MARRS Receptor/ERp57, Attenuates the Effects of TNF- α by Causing ADAM10-Dependent Ectodomain Shedding of TNF Receptor 1,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 43, no. 6, pp. 2434–2445, 2017.
 - [27] C. Tohda, T. Urano, M. Umezaki, I. Nemere, and T. Kuboyama, “Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D 3-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer’s disease pathologies in 5XFAD mice,” *Sci. Rep.*, vol. 2, pp. 1–11, 2012.
 - [28] K. S. Siveen *et al.*, “Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Tumour Vascularization: Potential and Challenges,” *Curr. Vasc. Pharmacol.*, vol. 15, no. 4, Jun. 2017.

- [29] J. H. Buchbinder, D. Pischel, K. Sundmacher, R. J. Flassig, and I. N. Lavrik, “Quantitative single cell analysis uncovers the life/death decision in CD95 network,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 14, no. 9, Sep. 2018.
- [30] J. Yeh and H. H. Kim, “Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Possible Roles of Apoptosis in Human Granulosa Cells,” in *Polycystic Ovary Syndrome*, Springer New York, 1996, pp. 51–70.
- [31] N. A. Cataldo, D. A. Dumesic, P. C. Goldsmith, and R. B. Jaffe, “Immunolocalization of Fas and Fas ligand in the ovaries of women with polycystic ovary syndrome: relationship to apoptosis,” *Hum. Reprod.*, vol. 15, no. 9, pp. 1889–97, Sep. 2000.
- [32] Z. Peng, Y. Sun, X. Lv, H. Zhang, C. Liu, and S. Dai, “Interleukin-6 levels in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis,” *PLoS One*, vol. 11, no. 2, Feb. 2016.
- [33] P. Peitsidis and R. Agrawal, “Role of vascular endothelial growth factor in women with PCO and PCOS: A systematic review,” *Reprod. Biomed. Online*, vol. 20, no. 4, pp. 444–452, Apr. 2010.
- [34] A. Jácome and Roca, *Historia de las Hormonas*, vol. 31, no. 1. 2009.
- [35] A. Sudhakar, “History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods,” *J. Cancer Sci. Ther.*, vol. 01, no. 02, pp. i–iv, 2009.
- [36] W. Y. Chey and T. M. Chang, “Secretin, 100 years later,” *J. Gastroenterol.*, vol. 38, no. 11, pp. 1025–1035, Nov. 2003.
- [37] A. Mariotti, “Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium,” *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, vol. 5, no. 1, pp. 27–53, 1994.
- [38] A. Almaraz Nieves *et al.*, “¿Cómo actúan las hormonas esteroides?,” *Educ. Química*, vol. 14, no. 4, p. 196, 2018.
- [39] T. Moses, K. K. Papadopoulou, and A. Osbourn, “Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 49, no. 6, pp. 439–462, Nov. 2014.
- [40] D. Nelson and M. Cox, *Lehninger: principios de bioquímica*. 2015.
- [41] K. Hostettmann and A. Marston, *Chemistry and pharmacology of natural products*. New York: Cambridge University Press, 1995.
- [42] A. Osbourn, R. Goss, R. F.-N. product Reports, and U. 2011, “The saponins–polar isoprenoids with important and diverse biological activities,” *R. Soc. Chem.*, 2011.
- [43] F. L. Olivares, “El origen de Syntex, una enseñanza histórica en la ciencia mexicana,” *ContactoS*, vol. 38, pp. 5–9, 2000.
- [44] L. E. Miramontes, “Industria de los esteroides en Mexico,” *Rev. la Soc. Química México*, vol. 45, no. 3, pp. 102–104, 2001.
- [45] B. Salehi *et al.*, “Dioscorea plants: A genus rich in vital nutra-pharmaceuticals-A review,” *Iran. J. Pharm. Res.*, vol. 18, no. Special Issue, pp. 68–89, 2019.
- [46] M. Jesus, A. P. J. Martins, E. Gallardo, and S. Silvestre, “Diosgenin: Recent Highlights on

- Pharmacology and Analytical Methodology,” *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2016, 2016.
- [47] C. Bachran, M. Sutherland, I. Heisler, P. Hebestreit, M. F. Melzig, and H. Fuchs, “The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 231, no. 4, pp. 412–420, 2006.
 - [48] M. Shen *et al.*, “Observation of the influences of diosgenin on aging ovarian reserve and function in a mouse model,” *Eur. J. Med. Res.*, vol. 22, no. 1, Oct. 2017.
 - [49] Z. Kiasalari, T. Rahmani, N. Mahmoudi, T. Baluchnejadmojarad, and M. Roghani, “Diosgenin ameliorates development of neuropathic pain in diabetic rats: Involvement of oxidative stress and inflammation,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 86, pp. 654–661, Feb. 2017.
 - [50] C.-C. Chang, T.-C. Kuan, Y.-Y. Hsieh, Y.-J. Ho, Y.-L. Sun, and C.-S. Lin, “Effects of diosgenin on myometrial matrix metalloproteinase-2 and -9 activity and expression in ovariectomized rats,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 7, no. 6, pp. 837–47, 2011.
 - [51] C. Y. Cheok, H. A. K. Salman, and R. Sulaiman, “Extraction and quantification of saponins: A review,” *Food Research International*, vol. 59. Elsevier, pp. 16–40, 01-May-2014.
 - [52] M. a Iglesias-arteaga *et al.*, “A Convenient Procedure for the Synthesis of 3 β -Hydroxy-6-oxo-5 α -steroids. Application to the Synthesis of Laxogenin,” *Synthesis (Stuttg.)*, vol. 16, no. 3, pp. 381–385, 2005.
 - [53] M. R.-Á. Rosado-Abón, A., “A rapid and simple one-pot procedure for the synthesis of 3 β -acetoxy-5 α -hydroxy-6-oxo steroids,” *search.ebscohost.com*, 2010.
 - [54] F. J. Sánchez C Gerardo Rodríguez N, “Esterificación.”
 - [55] L. Stryer, F. W. and company-4^a ed. Barcelona, E. E. R. SA, and undefined 1995, “Degradación de aminoácidos y ciclo de la urea.”
 - [56] M. Delgado, J. León, and J. N. Méndez, “Bioquímica Estructural y Metabólica,” 2011.
 - [57] D. Cantacuzène, F. Pascal, and C. Guerreiro, “Synthesis of amino acid esters by papain,” *Tetrahedron*, vol. 43, no. 8, pp. 1823–1826, Jan. 1987.
 - [58] R. Dahiya, “Synthesis, characterization and biological evaluation of a glycine-rich peptide - Cherimolacyclopeptide E,” *J. Chil. Chem. Soc.*, vol. 52, no. 3, pp. 1224–1229, 2007.
 - [59] Z. Ye, X. Wang, Z. Liu, B. LI, ... S. S.-... P. R. and, and U. 2003, “Synthesis of diosgenin succinic mono-ester derivatives and research of application,” 2003.
 - [60] A.-M. Liao *et al.*, “Synthesis and biological evaluation of arginyl-diosgenin conjugate as a potential bone tissue engineering agent,” *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 91, no. 1, pp. 17–28, Jan. 2018.
 - [61] A. J. Trott, O., Olson, “Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking,” *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 2, pp. 455–461, 2019.
 - [62] K. K. Chaudhary and N. Mishra, “A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery,” *JSM Chem*, vol. 4, no. 3, p. 1029, 2016.
 - [63] A. Daina, O. Michielin, and V. Zoete, “SwissADME: a free web tool to evaluate

- pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules.,” *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 42717, Mar. 2017.
- [64] N. S. Pagadala, K. Syed, and J. Tuszynski, “Software for molecular docking: a review,” *Biophys. Rev.*, vol. 9, no. 2, pp. 91–102, 2017.
- [65] D. Parimala, D. Leelavathi, and M. Balaji, “Drug Designing and Docking studies on PCOS and Hypothyroidism using advanced Cheminformatics tools and database,” *Interntional J. Nov. trends Pharm. Sci. drug*, vol. 6, pp. 74–78, 2016.
- [66] K. Hu, H. Kobayashi, A. Dong, Y. Jing, S. Iwasaki, and X. Yao, “Antineoplastic agents III: Steroidal glycosides from solanum nigrum,” *Planta Med.*, vol. 65, no. 1, pp. 35–38, 1999.
- [67] H. Berman, K. Henrick, and H. Nakamura, “Announcing the worldwide Protein Data Bank,” *Nature Structural Biology*, vol. 10, no. 12. Nature Publishing Group, p. 980, Dec-2003.
- [68] D. M. Tanenbaum, Y. Wang, S. P. Williams, and P. B. Sigler, “Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor’s ligand binding domains.,” *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, vol. 95, pp. 5998–6003, 1998.
- [69] P. C. T. Souza, L. C. Textor, D. C. Melo, A. S. Nascimento, M. S. Skaf, and I. Polikarpov, “An alternative conformation of ER beta bound to estradiol reveals H12 in a stable antagonist position.,” *Sci Rep*, vol. 7, pp. 3509–3509, 2017.
- [70] K. Pereira de Jesus-Tran, P.-L. Cote, L. Cantin, J. Blanchet, F. Labrie, and R. Breton, “Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity.,” *Protein Sci.*, vol. 15, pp. 987–999, 2006.
- [71] K. P. Madauss *et al.*, “Progesterone receptor ligand binding pocket flexibility: crystal structures of the norethindrone and mometasone furoate complexes,” *J.Med.Chem.*, vol. 47, pp. 3381–3387, 2004.
- [72] G. Dong, P. A. Wearsch, D. R. Peaper, P. Cresswell, and K. M. Reinisch, “Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer.,” *Immunity*, vol. 30, pp. 21–32, 2009.
- [73] R. Ganesan, S. Jelakovic, P. R. Mittl, A. Caflisch, and M. G. Grutter, “In Silico Identification and Crystal Structure Validation of Caspase-3 Inhibitors without a P1 Aspartic Acid Moiety.,” *Acta Crystallogr.,Sect.F*, vol. 67, p. 842, 2011.
- [74] F. L. Scott *et al.*, “The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering,” *Nature*, vol. 457, pp. 1019–1022, 2009.
- [75] J. N. Varghese *et al.*, “Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha-chain.,” *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, vol. 99, pp. 15959–15964, 2002.
- [76] S. T. Shen *et al.*, “Structural Basis for the Bivalent Glycosylated Human VEGF-A121 and VEGF-A165 in recruiment of Receptor and Co-receptor,” *TO BE Publ.*
- [77] A. J. Jakimiuk, S. R. Weitsman, H.-W. Yen, M. Bogusiewicz, and D. A. Magoffin, “Estrogen Receptor α and β Expression in Theca and Granulosa Cells from Women with Polycystic Ovary Syndrome,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 12, pp. 5532–5538,

Dec. 2002.

- [78] A. Villavicencio, K. Bacallao, C. Avellaira, F. Gabler, A. Fuentes, and 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.*, vol. 103, no. 1, pp. 307–314, Oct. 2006.
- [79] N. F. Goodman, R. H. Cobin, W. Futterweit, J. S. Glueck, R. S. Legro, and E. Carmina, “American association of clinical endocrinologists, American college of endocrinology, and androgen excess and pcos society disease state clinical review: Guide to the best practices in the evaluation and treatment of polycystic ovary syndrome - Part 1,” *Endocrine Practice*, vol. 21, no. 11. American Association of Clinical Endocrinologists, pp. 1291–1300, 01-Nov-2015.
- [80] D. Su, X. Hu, C. Dong, and J. Ren, “Determination of Caspase-3 Activity and Its Inhibition Constant by Combination of Fluorescence Correlation Spectroscopy with a Microwell Chip,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 18, pp. 9788–9796, Sep. 2017.
- [81] R. Puri, T. C. Wong, and R. K. Puri, “Solasodine and diosgenin: ¹H and ¹³C assignments by two-dimensional NMR spectroscopy,” *Magn. Reson. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 278–282, 1993.