



Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad de Concepción



*Tesis Pregrado*

**Síntesis de derivados esteroidales con  
implicancias en el receptor biológico TRPV-1**

**Jorge Romero Chávez**  
**Licenciatura en Química-Químico**

## RESUMEN

La síntesis de compuestos esteroideos con implicancia en receptores TRPV-1 constituye una diana importante para el estudio de nuevos productos farmacéuticos que inhiban el dolor agudo y/o crónico y su inflamación. Los modelos esteroideos naturales estudiados hasta el momento han mostrado una gran potencialidad de inhibir la activación de los receptores TRPV-1 por capsaicina.

El propósito de esta Tesis es la obtención sintética de derivados esteroideos y su estudio de su efecto de modulación con el receptor TRPV-1. Entre los núcleos esteroideos estudiados se encuentran: estrona, deshidroisoandrosterona, androsterona, testosterona y los derivados de estos, en forma de chalconas, obtenidos por condensación con los aldehídos vainillina, anisaldehído y p-dimetilaminobenzaldehído.

De acuerdo con la evaluación biológica de los derivados naturales y de los compuestos modificados sintéticamente, hechos en modelos de células transfectadas HEK 293 de ratón, para este receptor TRPV-1, estos compuestos mostraron ser capaces de activar al receptor por temperatura y capsaicina, y pueden ser potenciales productos para usos farmacéuticos al activar este receptor.



## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>1.- INTRODUCCION</b>	<b>4</b>
1.1.- Receptor TRPV-1 como diana para el tratamiento del dolor	4
1.2.- Agonismo y Antagonismo en el receptor TRPV-1	4
1.3.- Estructura de compuestos análogos de capsaicina	8
1.4.- Esteroles que activan el receptor TRPV-1	12
1.5.- Hipótesis y objetivos	14
<b>2.- MÉTODOLÓGIA</b>	<b>15</b>
2.1.- Procedimientos generales	15
<b>3.-PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>16</b>
3.1.- Síntesis de 4-Benciloxi-3-metoxibenzaldehido	16
3.2.- Síntesis de 16-(4-benciloxi-3-metoxifenilmetileno)-3-hidroxiestrán-1,3,5-trien-17-ona	16
3.3.- Síntesis de 16-(4-benciloxi-3-metoxifenilmetileno)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-ona	17
3.4.- Síntesis de 16-(4-metoxifenilmetileno)-3- hidroxiestrán-1,3,5-trien-17-ona	18
3.5.- Síntesis de 16-(4-metoxifenilmetileno)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en- 17- ona	18
3.6.-Síntesis de 16-(4-dimetilaminofenilmetileno)- 3- hidroxiestrán-1,3,5-trien-17-Ona	19
3.7.- Síntesis de 16-(4-dimetilaminofenilmetileno)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-ona	19
3.8.- Soluciones stock de los compuestos ensayados sobre el receptor TRPV-1	20
3.9.- Ensayo de activación del receptor TRPV-1 por temperatura	20
3.10.- Ensayo de activación del receptor TRPV-1 por capsaicina	21
3.11.- Evaluación biológica de la actividad en receptores TRPV-1	22
<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>
4.1.- Mecanismo de reacción	23
4.2.- Actividad sobre receptores TRPV-1 de esteroides	23
4.3.- Actividad biológica en receptores TRPV-1 de derivados esteroidales tipo Chalconas	30
<b>5.- CONCLUSIONES</b>	<b>33</b>
<b>6.- REFERENCIAS</b>	<b>34</b>
<b>7.- ANEXO: DATOS DE ESPECTROSCOPÍA</b>	<b>41</b>

## 1.- INTRODUCCION

### 1.1.-El Receptor TRPV-1 como una diana para el tratamiento del dolor

En las últimas dos décadas pasadas, uno de los grandes problemas en la salud de la población mundial fue el aumento en el consumo de productos farmacéuticos para el tratamiento del dolor crónico y de procesos antiinflamatorios y de aquellos productos que modifiquen las sensaciones de dolor, expresados en distintos procesos como son el de inflamación y el dolor, como también en problemas asociados a infección intrahospitalarias, traumatismo y cáncer. Los estudios moleculares realizados sobre los procesos biológicos asociados con el dolor, han llevado a identificar las bases moleculares que implicarían la detección de estímulos nocivos (nociceptores) del tipo de los receptores biológicos involucrados, en particular el conocimiento de la familia de los receptores vainilloides TRPV. siendo el receptor TRPV-1 quien presentaría la respuesta biológica asociada a las sensaciones del dolor en la mayoría de las implicaciones de los procesos fisiológicos relacionados con la detección de estos estímulos dolorosos y de aquellos de generación de procesos de inflamación.

El receptor biológico TRPV-1 [2], o *potencial transitorio vainilloide*, es un canal catiónico proteico no específico, que permite el paso de cationes monovalentes o divalentes y posee una estructura de proteína terciaria. Este se encuentra principalmente ubicado en el sistema nervioso periférico, en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, los ganglios trigeminales y torácico vagal, y en fibras sensoriales C y Aδ. El canal TRPV-1 también se encuentra en el sistema nervioso central y en múltiples tejidos no neuronales. Se ha comprobado que el receptor TRPV-1 es activado por estímulos provenientes del ambiente o del organismo mismo, tales como diferencias de voltaje, cambios de temperatura elevados, acidez extracelular ( $pK_a=5,3$ ), acidez intracelular alcalino ( $pK_a=9$ ) y por determinadas moléculas orgánicas entre las cuales se encuentra capsaicina, resiniferatoxina(RTX) y deshidroepiandrosterona [3].

### 1.2.-Agonismo y antagonismo en el receptor TRPV-1.

Las distintas moléculas que modulan con este receptor tienen efectos distintos de activación y actúan como un agonista al activarlo o antagonista al desactivarlo. Algunas características de estos compuestos son:

- a) **Agonistas del receptor TRPV-1:** Estos actúan activando el receptor y su efecto primario es el *aumento de la concentración de calcio intracelular*, lo cual activa diversos mecanismos de desensibilización del dolor produciendo finalmente el efecto analgésico. Uno de los agonistas naturales más conocidos por su alto efecto activante es la capsaicina, un principio pungente de los ajíes, que además se une a otros receptores cannabinoides, los cuales también estarían implicados en la modulación de señales nociceptivas [14, 15, 16].

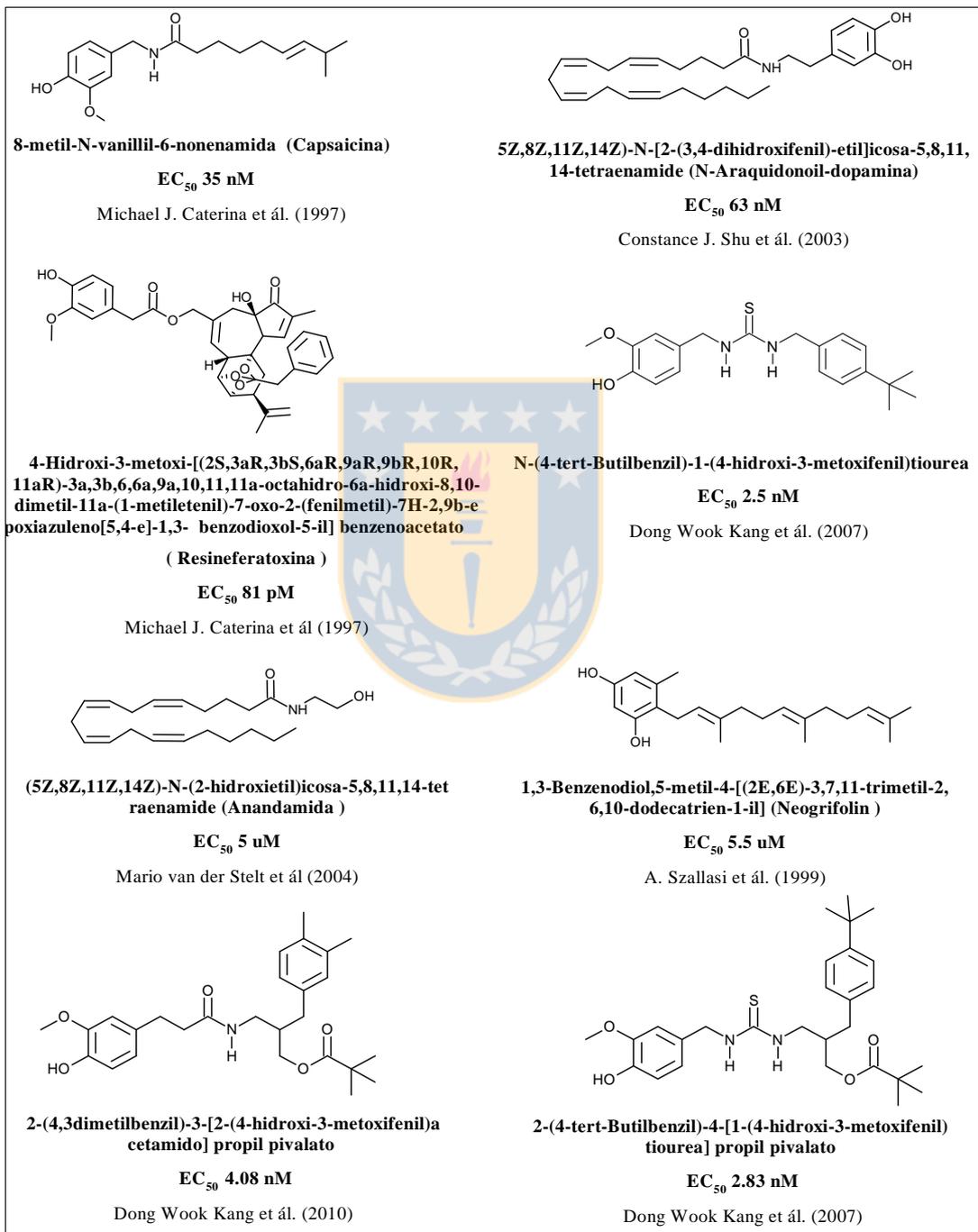
**b) Antagonistas del receptor TRPV-1:** Estos se basan en la inactivación del receptor, actuando principalmente mediante un mecanismo antagonista competitivo y no competitivo. Estos compuestos actúan a corto plazo y producen un aumento de la temperatura corporal [9, 11, 17].

El primer ligando agonista natural de TRPV-1 en ser identificado. Como fue señalado anteriormente fue la capsaicina [Figura N°1], la cual se caracterizó estructuralmente y luego se realizaron estudios para la síntesis de análogos estructurales que modifican la estructura y mejoran sus propiedades analgésicas [18-22]. Estos estudios, contribuyen en la identificación del modelo estructura-receptor molecular que sirve para la síntesis de nuevos agonistas para este receptor TRPV-1 [23-25].

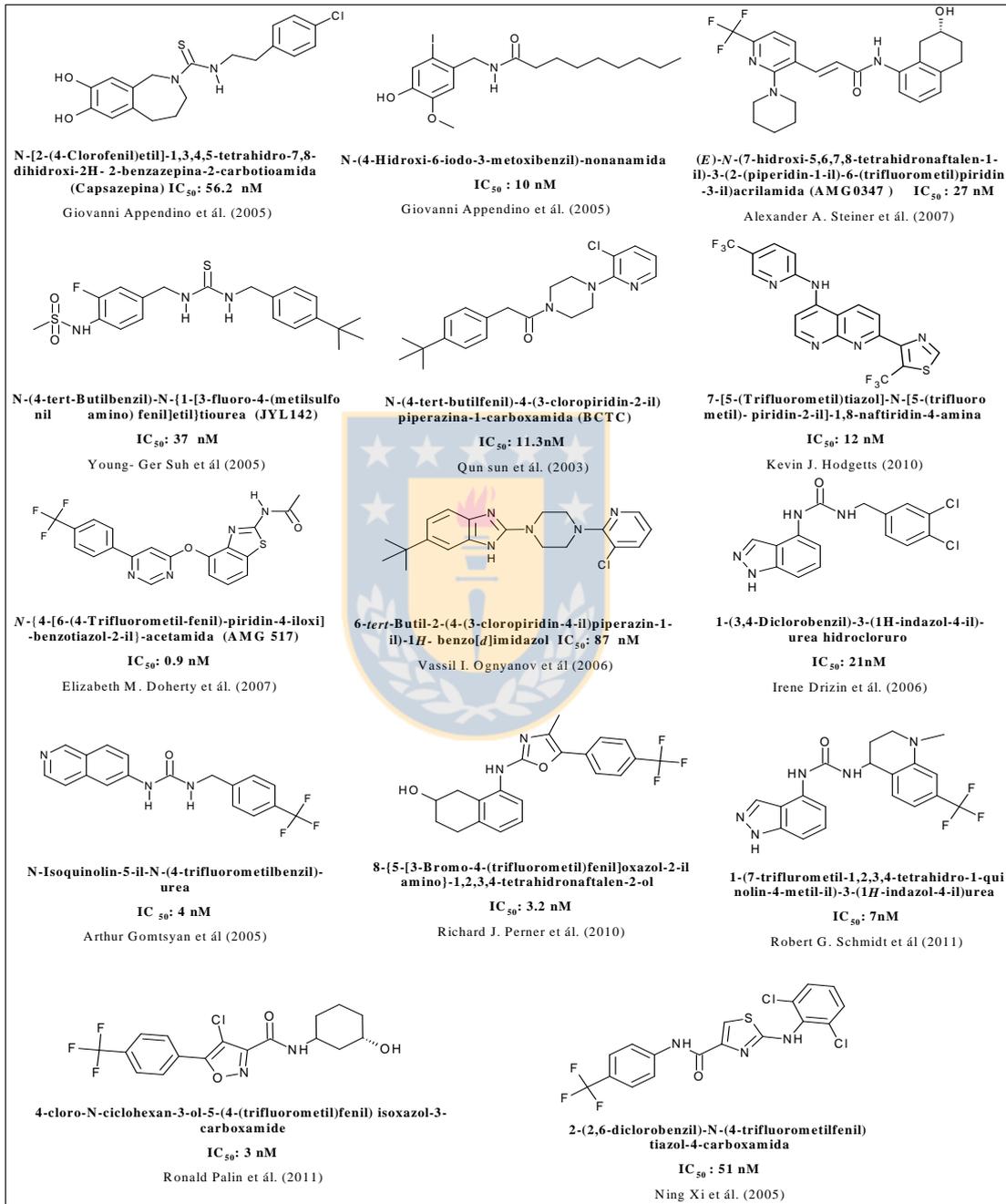
Entre los compuestos químicos más comunes que activan estos receptores se encuentran los señalados a continuación:

- Análogos Vainilloides
- Análogos derivados de tiourea y urea.
- Derivados de N-arilcinamidas.
- Derivados de piridina.
- Derivados de piperazina carboxamidas.
- Derivados de piperazinil benzoimidazoles
- Derivados de piridinil naftiridinas
- Derivados de aminoquinazolinas
- Derivados de Isoquinolin ureas
- Derivados de indazol ureas
- Derivados de Tetrahydroquinazolinas.
- Derivados de oxazol , isoxazol y tiazol.

**Figura N°1.- Ligandos agonistas de TRPV-1; junto a la actividad biológica EC<sub>50</sub> obtenida mediante ensayos de captación de <sup>45</sup>Ca<sup>+2</sup> en cultivos neuronales de DRG o células HEK293, transfectadas con el receptor TRPV-1.**



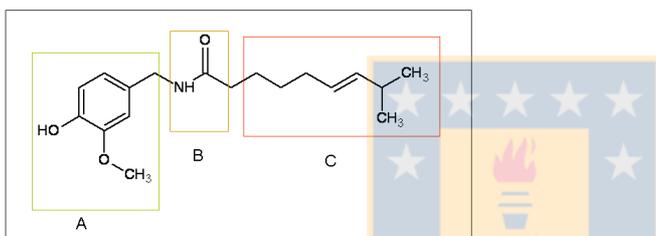
**Figura N°2.- Ligandos antagonistas de TRPV-1, junto a la actividad biológica determinada mediante EC<sub>50</sub> obtenida a través de ensayos de captación de <sup>45</sup>Ca<sup>+2</sup> en cultivos neuronales de DRG o células HEK293, transfectadas con el receptor TRPV-1.**



### 1.3.- Estructura de los Compuestos Análogos de Capsaicina

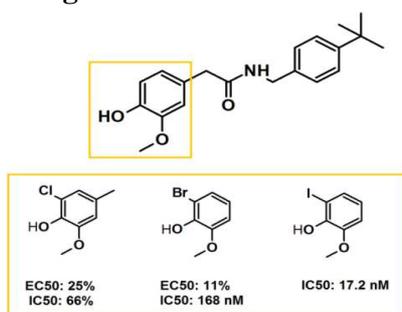
La acción antagonista del dolor de Capsaicina, un componente de los frutos picantes de los ajíes como se ha señalado anteriormente [Figura N°3], se ha estudiado considerando a la molécula en secciones de tres regiones importantes, una región aromática (A), una región polar de función amida (B) y una región hidrofóbica o lipofílica (C). Todos estos conceptos han sido usados posteriormente para la síntesis de modelos estructurales. La región A, está constituida por el núcleo de 4-hidroxi-3-metoxi vainillilo, la región B correspondiente a un agrupamiento de amida y/o de derivados y una región C, de baja polaridad, correspondiente a una cadena carbonada lipofílica de 9 a 10 carbonos. Se reconoce de este modo tres regiones importantes en la estructura de Capsaicina que estarían influyendo en la eficacia de los análogos estructurales de esta molécula natural.

**Figura N°3.- Regiones identificadas en la estructura de la Capsaicina.**

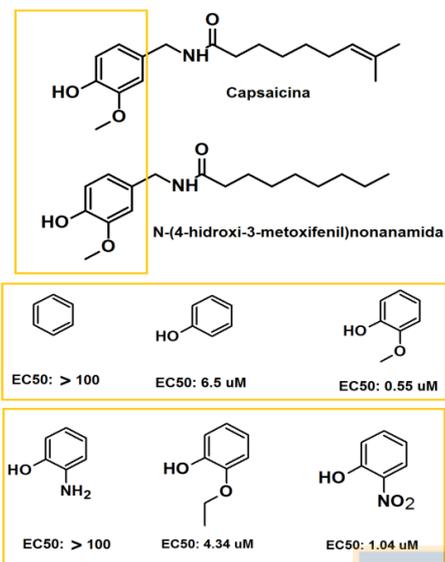


**Región A** [Figura N°4 y N°5]: Está constituida por un anillo aromático fenólico, reconociéndose la presencia del grupo 4-hidroxilo como primordial para la interacción con el receptor TRPV-1 mediante el establecimiento de enlaces hidrógeno. Su reemplazo por otros grupos aceptores de enlaces hidrógeno, causa pérdida en la actividad del ligando, lo cual se asocia a una falta de reconocimiento sobre el receptor TRPV-1 [20, 26]. La afinidad de esta unión está modulada por el carbono 3 del anillo aromático, mediante sustituciones en dicho carbono con grupos funcionales aceptores de enlaces hidrógenos, [27, 28]. Las sustituciones en el carbono 5 y 6 por halógenos, revierte la actividad agonista de los ligandos a antagonista [26].

**Figura N°4.- Actividad para amidas de 4-tert-butil bencilo, los cuales fueron modificados en la región A del modelo de Capsaicina y que representan el efecto de halógenos en la actividad del receptor TRPV-1 [26].**

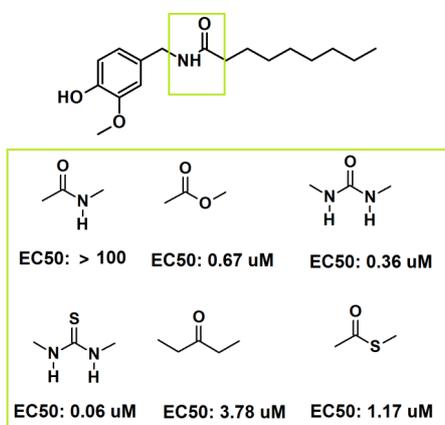


**Figura N°5.- Actividad agonista para derivados de nonanamida, los cuales fueron modificados en la región A y representan los requerimientos estructurales mínimos de actividad en receptores TRPV-1[20].**

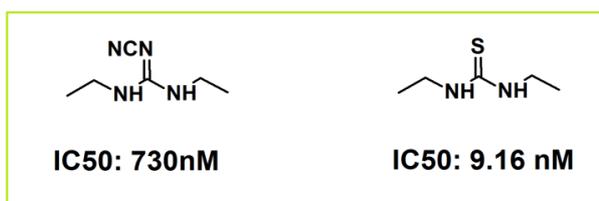
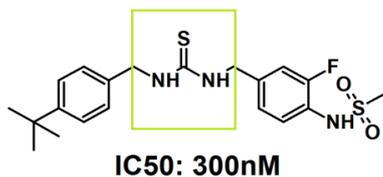


**Región B** [Figuras N°6-N°8]: Se ha reportado que esta región contribuye a aumentar la potencia agonista y antagonista de los ligandos mediante el establecimiento de enlaces hidrógeno a través de grupos funcionales altamente polares, los cuales actúan como donantes y aceptores de enlaces hidrógeno [21]. Además, el reemplazo isostérico por heterocíclicos en esta región permite controlar la geometría óptima al sitio de unión de TRPV-1, lo cual influye en la actividad agonista y antagonista, estableciendo un rearrreglo coplanar entre la región A y C para ligandos antagonistas y lineal para compuestos agonistas de TRPV-1. La unión al sistema heterocíclico de un agrupamiento cíclico aromático o alifático, generalmente de 6 miembros, permite el acceso adicional hacia un área hidrofóbica del receptor TRPV-1. [29-42].

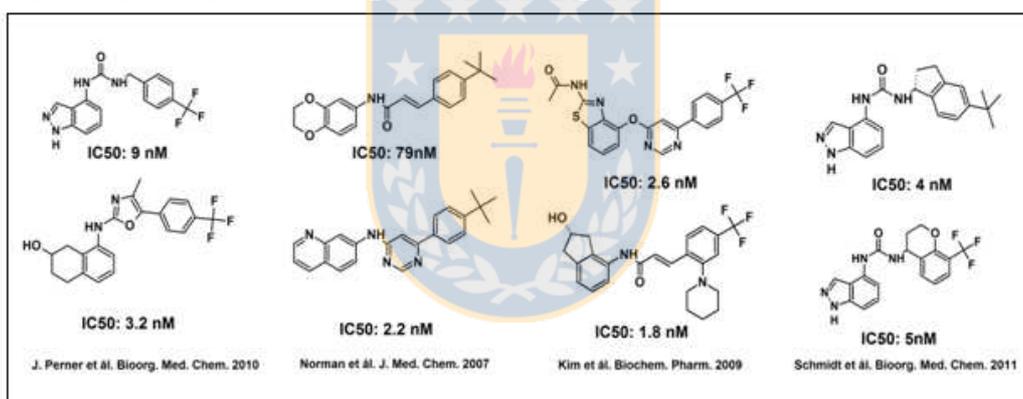
**Figura N°6.- Actividad agonista para derivados de nonanamida, los cuales fueron modificados en la región B y representan los requerimientos estructurales mínimos de actividad en receptores TRPV-1 [21]**



**Figura N°7.- Actividad antagonista para derivados de tiourea, los cuales fueron modificados en la región B y representan los requerimientos estructurales mínimos de actividad en receptores TRPV-1 [29].**



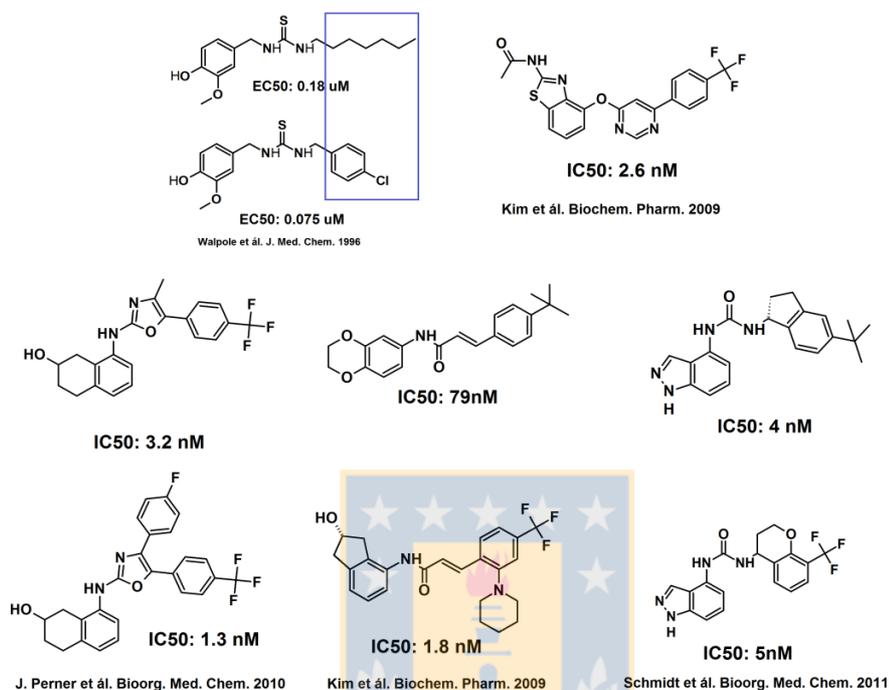
**Figura N°8.- Actividad para derivados antagonistas del receptor TRPV-1 y representan las diversas restricciones conformacionales realizadas a nivel de la región B para ligandos antagonistas de receptores TRPV-1.**



**Región C** [Figura N° 9]: Se caracteriza tanto por el establecimiento de interacciones hidrofóbicas a través de cadenas alquílicas o anillos aromáticos [19, 22] sustituidos principalmente, en posición *para* en el anillo fenólico por halógenos o grupos alquílicos como el grupo terc-butilo, los cuales aumentan la potencia agonista y/o antagonista, contribuyendo a la estabilización del complejo de unión ligando-receptor [9-11].

**Espaciador:** Regula la geometría de los ligandos y varía de acuerdo al motivo funcional de la región B, por ejemplo, en análogos derivados de tiourea [figura N°7 y figura N°8] el requerimiento para ambos espaciadores 1 y 2 es de 1-2 carbonos metilénico, mientras que si la sustitución es con un heterociclo como la naftiridina [figura N°2] el espaciador comúnmente está formado por ciclos de 6 miembros, sin embargo también puede incluir anillos de 5 miembros [Figura N° 9] como en ABT-102 [18-45].

**Figura N°9.- Actividad para derivados antagonistas del receptor TRPV-1 que representan las diversas modificaciones estructurales realizadas a nivel de la región C para ligandos antagonistas de receptores TRPV-1.**



De esta manera las modificaciones sintéticas realizadas en las diversas familias de compuestos análogos estructurales a capsaicina, actúan aumentando tanto el efecto como agonistas y antagonistas del receptor TRPV-1, lo que ha permitido la síntesis de derivados antagonistas muy potentes, con actividades del orden *nanomolar*, que han sido posteriormente evaluados en varios ensayos clínicos humanos para su aprobación como fármacos para el tratamiento del dolor. Sin embargo, aunque los antagonistas sintetizados son variados y muestran tanto actividad como propiedades farmacocinéticas mejoradas, estos exhiben un efecto secundario en ensayos clínicos correspondientes al **aumento de la temperatura corporal** que puede ir desde los 0,6 °C hasta 1,6 °C. Es así como el desarrollo de nuevos ligandos antagonistas, que no presenten estos efectos colaterales al interactuar con este receptor TRPV-1, constituye un área emergente en la búsqueda de nuevos compuestos antagonistas lo cual está planteado como una necesidad en el diseño de nuevos compuestos antagonistas con modulación específica, asociado al hecho que los antagonistas obtenidos hasta ahora, deben activar al receptor mediante los tres modos de activación de este receptor (pH, capsaicina y calor) [46-48].

Aún cuando la capsaicina ha sido usada como analgésico para el dolor desde hace mucho tiempo actualmente, debido a su efecto irritante de la piel y de sus efectos colaterales, su uso está restringido, sin embargo persiste el uso de este compuesto por

su conocida acción agonista del dolor. Los estudios de nuevos compuestos para estos mismos fines han sido diseñados mediante la estructura base de Capsaicina y hasta el momento se han sintetizado una serie de análogos estructurales a ella que conservan la unidad de vainillilo en su estructura química, o conservan al menos una similitud estructural con la estructura molecular de Capsaicina en la parte A. Un ejemplo de ellos es el compuesto NADA o N-araquidonil-dopamina [figura 1] que tiene acción en los receptores TRPV-1. De este modo se ha buscado obtener análogos estructurales de la capsaicina para uso como sustitutos de ella como fármacos para el control del dolor crónico, tal como el compuesto RTX [figura N°10], que es casi 20 veces más potente que la capsaicina (40 y 710nM) .

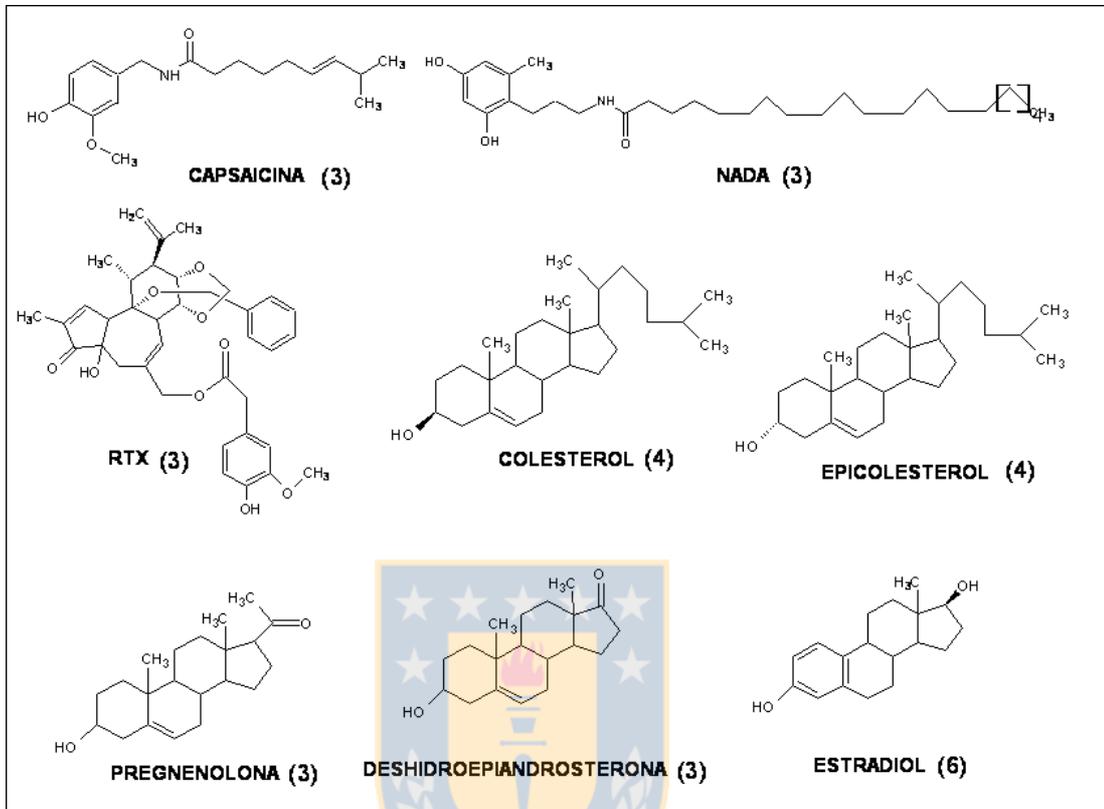
#### **1.4.- Esteroides que activan el receptor TRPV-1**

Los esteroides son compuestos naturales que actúan sobre el sistema nervioso central, actuando como compuestos neuroactivos, además de sus funciones conocidas para ellos, como su acción hormonal. Existen muy pocos estudios de esteroides para el tratamiento del dolor crónico que estén basados en el receptor TRPV-1 y, en cambio, muchos estudios relacionados con el receptor GABA, con el cual mantiene una importante función moduladora, que producen los efectos sedativos y anestésicos.

En efecto, el colesterol [4], uno de los esteroides más frecuentes de la naturaleza, interactúa con el receptor TRPV-1 de manera que reduce la respuesta electrofisiológica del canal, es decir, interactúa con el receptor de forma que baja su respuesta eléctrica frente al estímulo del dolor. El estradiol [6] o el 17  $\beta$ -estradiol en cambio, reduce los niveles de dolor como la cistitis intersticial a nivel de los ganglios de la espina dorsal. Este tiene una rápida respuesta del receptor (menos de 5 minutos) en donde aumenta la concentración de calcio intracelular, inhibiendo la respuesta del dolor por parte del receptor, su estructura molecular se muestra en la figura N°10. Otro esteroide importante es la deshidroepiandrosterona [3], un esteroide que se encuentra en la sangre y cuya estructura se muestra en la figura 10. Este esteroide, al igual que 17  $\beta$ -estradiol, participa en la inhibición del receptor TRPV-1. Al igual que la deshidroepiandrosterona y la pregnenolona, todos estos esteroides conservan el grupo hidroxilo en la posición 3  $\beta$ , señalando la importancia de mantener esta función en la estructura del esteroide. En mujeres, los síntomas del dolor en los ciclos reproductivos sugiere el papel de los receptores de estrógenos al modular la nocicepción. Estudios previos sugieren la interacción de los receptores de estrógenos con receptores de vainillina TRPV-1 de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) [55,56]

Resultados clínicos sugieren que muchos tipos de dolores de la región pelviana, tal como la cistitis, están influenciados por niveles hormonales y la modulación de estrógenos de los nociceptores de la región de la raíz del ganglio dorsal y éstos a su vez, inhiben la activación de la traducción química/térmica de los receptores catiónicos TRPV-1 [57, 58, 59, 60]

**Figura N°10.- Compuestos que modulan el Receptor TRPV-1**



## 1.5.-Hipótesis y objetivos

*Los cambios estructurales de esteroides, ya sea por modificación de su agrupamiento funcional o por incorporación de nuevas unidades activas, que sean reconocidas por el receptor TRPV-1 y/o por cambios conformacionales de la misma molécula, modificarán la respuesta del receptor. Bajo este concepto las modificaciones estructurales a compuestos esteroideos que presentan actividad frente a este receptor, podrían aumentar su eficiencia al incorporar en ellos unidades que son reconocidas por este receptor, las cuales presentan enlaces de hidrógenos importantes en su estructura molecular para enlazar con él.*

### Objetivo general

Modificar el anillo D de la deshidroisoandrosterona y estrona, mediante reacciones de condensación de Claisen, generando un grupo de análogos estructurales a capsaicina del tipo  $\alpha, \beta$ -enonas. Los esteroides previamente identificados ser activos con este receptor se modificaran con los aldehídos: vainillina benzilada, anisaldehído y p-dimetilaminobenzaldehído y luego se realizaran sus estudios de activación biológica.

### Objetivos específicos:

- Síntesis de 4-Benciloxi-3-metoxibenzaldehído
- Síntesis de 16-(4-benciloxi-3-metoxifenilmetileno)-3-hidroxiestrán-1,3,5-trien-17-ona
- Síntesis de 16-(4-benciloxi-3-metoxifenilmetileno)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-ona
- Síntesis de 16-(4-metoxifenilmetileno)-3- hidroxiestrán-1,3,5-trien-17-ona
- Síntesis de 16-(4-metoxifenilmetileno)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en- 17- ona
- Síntesis de 16-(4-dimetilaminofenilmetileno)- 3- hidroxiestrán-1,3,5,16-tetraen-17-ona
- Síntesis de 16-(4-dimetilaminofenilmetileno)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en- 17- ona
- Evaluación biológica de su actividad en receptores TRPV-1

## 2.- METODOLOGIA

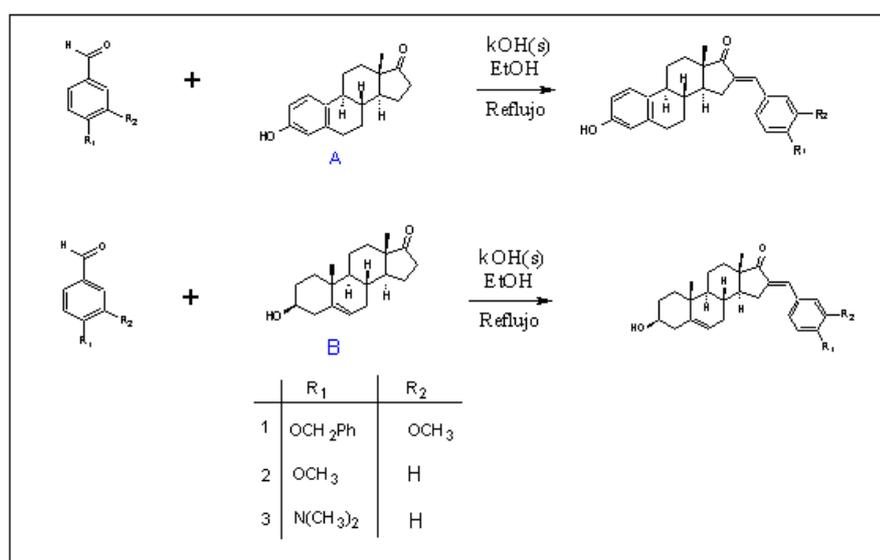
### 2.1.- Procedimientos generales

Las reacciones de síntesis corresponden a reacciones de condensación aldólica de Claisen, con aldehídos aromáticos que no presentan carbonos alfa, por tanto no enolizables en medio básico. El transcurso de la reacción fue evaluado mediante cromatografía en capa fina en placas de sílice gel 60G-F<sub>254</sub>, (0.063-0.2 mm), con indicador de fluorescencia, utilizando como fase móvil solventes de diferentes polaridad, desde 30% - 50% acetato etilo/hexano. Las placas fueron reveladas mediante luz ultravioleta y solución del 30% ácido sulfúrico/etanol. Los productos fueron purificados mediante cristalización o cromatografía en columna y la caracterización espectroscópica fue realizada en un espectrómetro FT-IR Nicolet Nexus; un espectrómetro de resonancia magnética nuclear BRUKER AVANCE-400 para los análisis de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C. La determinación del punto de fusión se realizó en un microscopio Olympus BX41 con una cámara RTV QIMAGING MicroPublisher 3.3 incorporada. La temperatura de observación fue controlada en un portaobjeto Linkam THMS600.

El método de síntesis de las estructuras antes citadas fue:

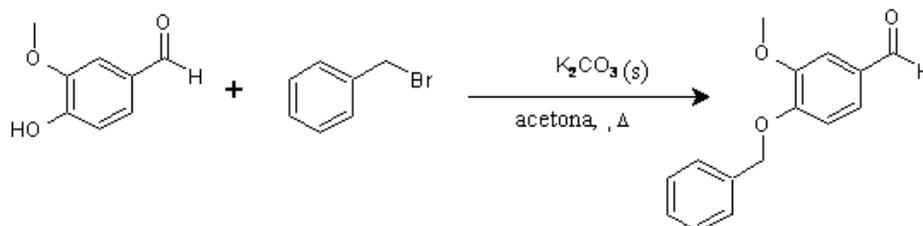
- Protección de grupo hidroxilo de vainillina con bromuro de bencilo
- Condensación aldólica de vainillina y de sus derivados con los sustratos esteroidales en medio básico, como se muestra en figura N°11.

**Figura N°11.-** Ruta sintética para la condensación a partir de distintos aldehídos y los esteroides, estrona(A) y deshidroisoandrosterona(B) y numeración de su cadena carbonada correspondiente.



### 3.-PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1.-Síntesis de 4-benciloxy-3-metoxibenzaldehído



En un matraz de fondo redondo de 250.0 mL se agrega 6.0 g (0.039 mol) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, y 6.0 g (0.043 mol) de carbonato de potasio en 30.0 mL de acetona. La mezcla resultante se refluxe bajo agitación vigorosa por 3 minutos y posteriormente se adiciona a la mezcla de reacción 4.0 mL (0.034 mol) de bromuro de bencilo y se deja a reflujo por 4 horas, luego de las cuales se concentra la solución y el residuo es extraído con diclorometano y lavado por 3 veces con una solución acuosa de NaOH 30% y finalmente lavado con una solución de NaCl saturada. La fase orgánica extraída es concentrada y el residuo sólido es cristalizado en metanol, obteniendo el producto como cristales color blanco.

**Rendimiento:** 96.31%.

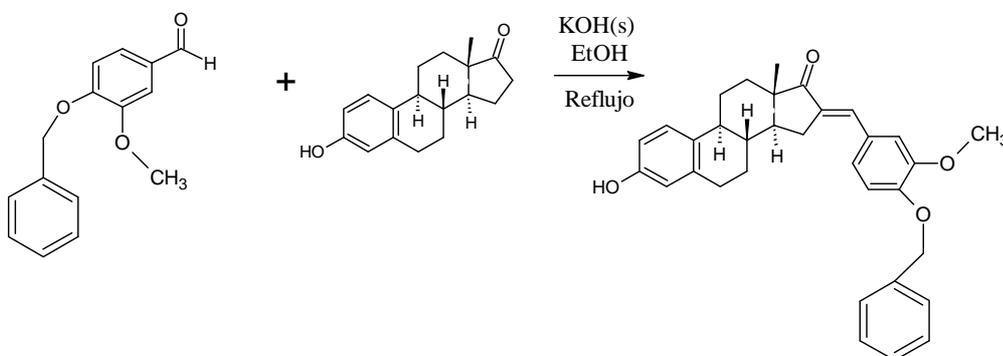
**Factor de Retención (Rf):** 0.6 (50% acetato de etilo/bencina)

**Punto fusión:** 65.3° C

**IR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ :** st C=C aromático 1461.39, 1502.83, 1587.57, st C=O 1675.61, st  $\text{Csp}^3\text{-H}$  2953.82, 3016.44, st C-H aldehído 2755.66, 2833.80; (Anexo, Espectro N° 2).

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:** 3.97 (s, 3H), 5.27 (s, 2H), 7.00- 7.47 (m, 8H), 9.86 (s, 1H);(Anexo, Espectro N° 1)

#### 3.2.-Síntesis de 16-(4-benciloxy-3-metoxifenilmetileno)-3-hidroxiestran-1,3,5-trien- 17-ona



En un matraz de fondo redondo de 25.0 mL se agrega 0,3 g (0,0011 mol) de estrona, 0,3 g de vainillina bencilada (0,0013 mol), 0.2 g de hidróxido de potasio

en 15.0 mL de etanol, la mezcla se lleva a reflujo por 9 horas y el producto formado, un sólido de color amarillo, se filtra y se recristaliza en una mezcla de etanol/agua 80/20.

**Rendimiento:** 40.3%

**Factor de Retención (Rf):** 0.2 (30% acetato de etilo/hexano)

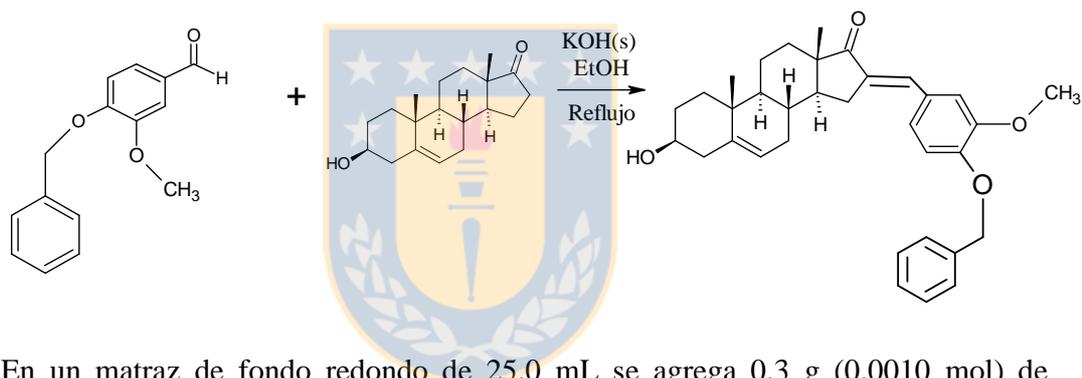
**Punto fusión:** 262.5 °C

**IR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ :** st C=C aromático, 1454.38, 1507.49, st C=C conjugado, 1609.56, st C=O, 1698.85, st  $\text{Csp}^3$ -H, 2876.15, 2930.47, st O-H, 3368.45 ; (Anexo, Espectro N° 5).

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:** 0.986 (s, 3H), 1,52-2.99 (m, 13H), 5,21(s, 2H), 7.60-7.45 (m, 12H);(Anexo, Espectro N° 3).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:** 13.99, 21.61, 25.05, 26.04, 26.61, 29.53, 31.84, 35.94, 38.38, 43.92, 47.80, 50.06, 113.30, 115.46, 126.52, 130.31, 137.56, 155.52 ; (Anexo, Espectro N°4)

### 3.3- Síntesis de 16-(4-benciloxi-3-metoxifenilmetilen)-3 $\beta$ -hidroxi-androst-5-en-17-ona



En un matraz de fondo redondo de 25.0 mL se agrega 0.3 g (0.0010 mol) de deshidroisoandrosterona, 0.26 g de vainillina bencilada (0,0012 mol), 0.2 g de hidróxido de potasio disueltos en 15.0 mL de etanol. La mezcla se somete a reflujo por 9 horas y el producto formado, un sólido de color amarillo, se filtra y se recristaliza en una mezcla de etanol/agua 80/20.

**Rendimiento:** 49,3%.

**Factor de Retención (Rf):** 0.3 (30% acetato de etilo/hexano)

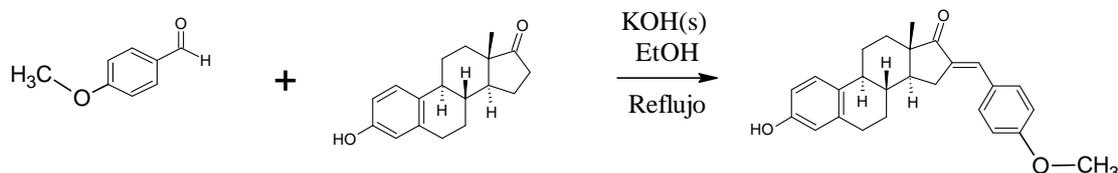
**Punto fusión:** 197.0 °C

**IR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ :** st C=C aromático, 1455.27, 1513.71 C=C conjugado 1620.10 st C=O, 1710.34 st  $\text{Csp}^3$ -H, 2848.25, 2930.87, O-H, 3408.86 ; (Anexo, Espectro N° 8).

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:** 0.99 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.36-2.47 (m, 18H), 3.95 (s, 3H), 5,24 (s, 2H), 6.93-7.47(m, 9H) ;(Anexo, Espectro N° 6).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:** 14.30, 19.36, 20.51, 29.36, 30.86, 31.29, 31.47, 36.59, 37.01, 42.24, 47.22, 49.95, 50.35, 56.07, 70.84, 71.62, 113.48, 114.09, 120.78, 123.67, 127.03, 127.85, 128.66, 128.99, 132.96, 133.93, 136.68, 141.22, 149.31; (Anexo, Espectro N°7)

### 3.4.- Síntesis de 16-(4-metoxifenilmetilen)- 3- hidroxiestran-1,3,5-trien-17-ona



En un matraz de fondo redondo de 25.0 mL se agregan 0.4 g (0.0015 mol) de estrona, 0.2 mL de p-metoxibenzaldehído (0,0018 mol), 0.2 g de hidróxido de potasio en 15.0 mL de etanol. La mezcla se somete a reflujo por 9 horas y el producto sólido obtenido, un sólido de color amarillo, se filtra y se recrystaliza en una mezcla de etanol/agua 80/20.

**Rendimiento:** 64,5%.

**Factor de Retención (Rf):** 0.5 (30% acetato de etilo/hexano)

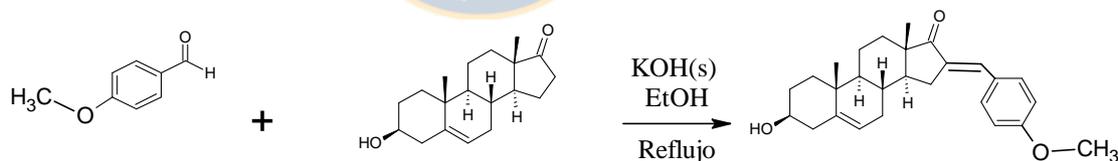
**Punto fusión:** 273.2 °C

**IR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ :** st C=C aromático, 1446.46, 1504.85, C=C conjugado 1606.24 st C=O, 1697.59 st  $\text{Csp}^3\text{-H}$ , 2926.84, O-H, 3377.73 ; (Anexo, Espectro N° 11).

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:** 0.99 (s, 3H), 1.42-2.99(m, 13H), 3.86 (s, 3H), 6.60-7.54 (m, 8H) ;(Anexo, Espectro N° 9).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:** 14.65, 26.00, 26.81, 29.10, 29.48, 29.71, 31.70, 37.96, 44.06, 47.77, 48.70, 55.38, 112.88, 114.22, 115.31, 126.49, 128.32, 132.13, 132.16, 133.14, 133.58, 137.98, 153.58, 160.50; (Anexo, Espectro N°10)

### 3.5.-Síntesis de 16-(Metoxifenilmetilen)-3 $\beta$ -hidroxiandroster-5-en- 17- ona



En un matraz de fondo redondo de 25 mL se agregan 0.4g (0.0014 mol) de deshidroisoandrosterona, 0,2 mL de p-metoxibenzaldehído (0.0017 mol), 0.2 g de hidróxido de potasio en 15.0 mL de etanol. La mezcla se somete a reflujo por 9 horas y el producto formado, un sólido de color amarillo, se filtra y recrystaliza en una mezcla de etanol/agua 80/20.

**Rendimiento:** 65,3%.

**Factor de Retención (Rf):** 0.4 (30% acetato de etilo/hexano)

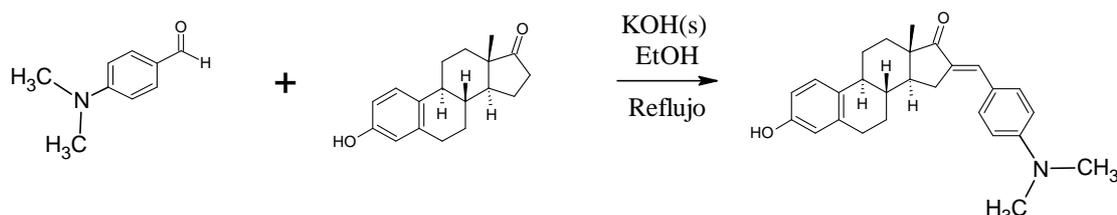
**Punto fusión:** 231.3 °C

**IR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ :** st C=C aromático, 1442.63, 1509.37 C=C conjugado 1597.27 st C=O, 1711.58 st  $\text{Csp}^3\text{-H}$ , 2931.94, 2851.27, O-H, 3455.28 ; (Anexo, Espectro N° 14).

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:** 0.97 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.14-2.44 (m, 18H), 3.84(s, 3H), 6.93-7.51(m, 5H); (Anexo, Espectro N° 12).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** 14.31, 19.48, 20.44, 29.33, 30.95, 31.18, 31.60, 36.73, 37.14, 42.23, 47.25, 49.98, 50.36, 55.37, 71.60, 114.21, 120.87, 128.33, 132.09, 132.90, 133.57, 141.19, 160.46; (Anexo, Espectro N°13)

### 3.6.-Síntesis de 16-(4-dimetilaminofenilmetilen)-3-Hidroxiestran-1,3,5-trien-17-ona



En un matraz de fondo redondo de 25.0 mL se agregan 0,2 g (0.00074 mol) de estrona, 0.13 g de p-dimetilamino benzaldehído, (0.0009 mol), 0.2 g de hidróxido de potasio en 15.0 mL de etanol. La mezcla se somete a reflujo por 9 horas y el producto formado, un sólido de color amarillo, se filtra y se recrystaliza en una mezcla de etanol/agua 80/20.

**Rendimiento:** 53,3%.

**Factor de Retención (Rf):** 0.3 (30% acetato de etilo/hexano)

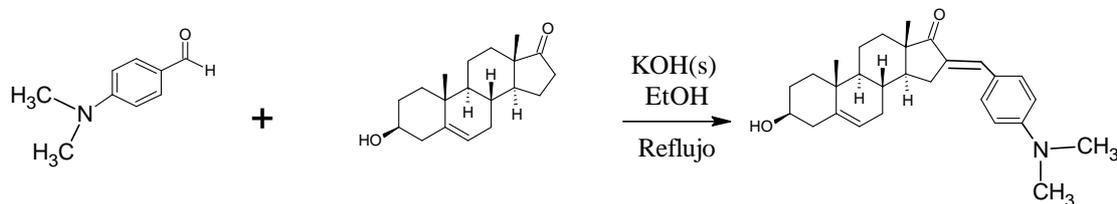
**Punto fusión:** 314.7 °C

**IR ν cm<sup>-1</sup>:** st C=C aromático, 1443.29, 1522.70, 1507.49, C=C conjugado, 1587.62 st C=O, 1691.11, st Csp<sup>3</sup>-H, 2927.64, O-H, 3343.15, ; (Anexo, Espectro N° 17).

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm:** 0.98 (s, 3H), 1.25-2.96 (m,13H), 3.03 (s, 6H), 6.60-7.50 (m, 8H); (Anexo, Espectro N°15)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm :** 14.77, 26.06, 26.83, 29.24, 29.52, 31.78, 37.98, 40.14, 44.11, 47.65, 48.90, 111.83, 112.84, 115.29, 123.44, 126.50, 130.92, 132.26, 132.35, 134.13, 138.05, 150.94, 153.52; (Anexo, Espectro N°16)

### 3.7.-Síntesis del compuesto 16-(4-Dimetilaminofenilmetilen)-3β-Hidroxiandrost-5-en-17-ona



En un matraz de fondo redondo de 25 mL se agregan 0.2g (0.0007 mol) de deshidroisoandrosterona, 0.10 g de p-dimetilamino benzaldehído(0.0008 mol), 0.2 g de hidróxido de potasio en 15.0 mL de etanol. La mezcla se somete a reflujo por 9 horas y el producto formado, un sólido de color amarillo, se filtra y se recrystaliza en una mezcla de etanol/agua 80/20.

**Rendimiento:** 60,5%.

**Factor de Retención (Rf):** 0.4 (50% acetato de etilo/hexano)

**Punto fusión:** 294,7 °C

**IR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ :** st C=C aromático, 1444.03, 1530.61, C=C conjugado, 1600.91 st C=O, 1698.62 st  $\text{Csp}^3\text{-H}$ , 2854.16, 2929.65, O-H, 3516.73 ; (Anexo, Espectro N° 20).

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:** 0.96 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.22-2.43(m, 18H), 6.70-7.52(m, 5H) ;(Anexo, Espectro N° 18).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:** 14.43, 19.48, 20.48, 30.98, 31.18, 31.63, 31.67, 36.75, 37.16, 40.14, 42.25, 50.17, 40.42, 71.65, 11.82, 120.99, 123.43, 130.95, 132.22, 133.90, 141.19, 150.90; (Anexo, Espectro N°19)

### **3.8.- Soluciones stock de los compuestos ensayados sobre el receptor TRPV-1**

Los compuestos destinados para los ensayos de screening sobre receptores TRPV-1 fueron preparados en una solución stock de 10.000X en DMSO, etanol o isopropanol y posteriormente para el ensayo fueron diluidos a una concentración de 1 $\mu\text{M}$  en 99.9 % de buffer Ringer (140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM Glucosa, 15mM de HEPES 7.35 pH, 292 mOsm). Las soluciones de capsaicina, BCTC, Lantano, Rojo de Rutenio se prepararon a concentraciones finales de 0,31  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

### **3.9.- Ensayo de activación del receptor TRPV-1 por temperatura**

Células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata fueron cargadas con Fluo-4AM a una concentración de 1 $\mu\text{M}$ /100 $\mu\text{L}$  por 30 minutos a 37.0°C, luego estas fueron lavadas con buffer Ringer para remover el exceso de Fluo-4AM. Posteriormente en placas de 48 pocillos, fueron plaqueadas 18  $\mu\text{L}$  de células a una densidad celular de 50,000 células por pocillo, con un porcentaje de transfección 40-50%. Seguido de la adición de 2  $\mu\text{L}$ /pocillo de cada compuesto a ensayar y por un periodo de 5-10 minutos a temperatura ambiente se dejaron incubar las células antes de la realización del experimento por temperatura. Posteriormente se procedió a hacer lectura de las medidas de fluorescencia en un equipo de real time PCR, StepOne Plus APPLIED BIOSYSTEM, que se programó en modo melting curve para llevar a cabo una rampa de temperatura que consistió en un incremento de 1.0°C cada 35 segundo desde 36.0°C hasta 55.0°C; la rampa de temperatura se inicio con una incubación de 35 segundos a 36.0°C y termino con una incubación a 55.0°C por 35 segundos. La lectura de las medidas de fluorescencia se realizó, utilizando el filtro FAM (483-533nm), el cual incluye el rango de excitación y emisión del indicador fluorescente Fluo-4AM (456-516nm). Una vez obtenidos los datos de fluorescencia para cada temperatura y cada compuesto, estos fueron procesados en Excel y los valores fueron corregidos, restando el background celular y la línea base correspondiente a la fluorescencia al inicio de la rampa (36.0°C) para cada muestra. Posteriormente los valores de fluorescencia corregidos se normalizaron expresando los datos como fluorescencia relativa, utilizando la fórmula que se muestra en la ecuación 1 y que corresponde a la razón entre el cambio de fluorescencia y la línea base. Los resultados se graficaron como el

promedio  $\pm$  desviación estándar de los cambios de fluorescencia relativa con el aumento de temperatura y que se obtuvieron en dos experimentos independientes.

### **3.10.- Ensayo de activación del receptor TRPV-1 por capsaicina.**

Células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata fueron cargadas con Fluo-4AM a una concentración de  $1\mu\text{M}/100\mu\text{L}$  por 30 minutos a  $37.0^\circ\text{C}$ , luego estas fueron lavadas con buffer Ringer para remover el exceso de Fluo-4AM. Posteriormente en placas de 48 pocillos, fueron plaqueadas  $16\mu\text{L}$  de células a una densidad celular de 50,000 células por pocillo, con un porcentaje de transfección 40-50%. Seguido de la adición de  $2\mu\text{L}/\text{pocillo}$  de cada compuesto a ensayar y  $2\mu\text{L}/\text{pocillo}$  de una solución de capsaicina  $0.31\mu\text{M}$  en 0.1% de etanol. Por un periodo de 2-5 minutos a temperatura ambiente se dejaron incubar las células para posteriormente hacer las mediciones de fluorescencia, las cuales se efectuaron antes de la adición de capsaicina y después de adicionar capsaicina. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un equipo de real time PCR, StepOne Plus APPLIED BIOSYSTEM, que se programo en modo curva estándar relativa-cuantificación para llevar a cabo las mediciones de fluorescencia a  $25.0^\circ\text{C}$  en 13 ciclos, el cual se inicia con una incubación a  $25.0^\circ\text{C}$  por 2 segundos y posteriormente cada 10 segundos se realizan medidas de los cambios de fluorescencia a  $25.0^\circ\text{C}$ . Los datos de fluorescencia registrados en el periodo de 122 segundos, luego son exportados a excel y procesados para su análisis. A cada medida se le restó el background celular y la línea base correspondiente a las células HEK293 transfectadas no expuestas a capsaicina para cada muestra y los datos fueron expresados como cambios de fluorescencia antes y después de la adición de capsaicina dividido por la fluorescencia basal [ecuación N° 1]. Los datos finalmente fueron graficados como la respuesta a capsaicina en el tiempo y la respuesta a capsaicina se expreso como el valor promedio  $\pm$  desviación estándar, que resultaron de la realización de dos experimentos independientes.

**Ecuación N°1: Fórmula aplicada para la normalización de los datos de fluorescencia obtenidos.**

$$\text{Fluorescencia relativa : } \frac{F - F_0}{F_0}$$

**F: Fluorescencia de la muestra sin background celular.**

**F<sub>0</sub>: Fluorescencia línea base sin background celular.**

### 3.11.- Evaluación biológica de la actividad en receptores TRPV-1

Los esteroides y los respectivos esteroides modificados a chalconas, fueron utilizados para su posterior evaluación biológica en receptores TRPV-1 de rata. Esta parte experimental fue realizada en el Laboratorio del Dr. Sebastián Brauchi, docente de la Universidad Austral de Valdivia.

Como se mencionó los receptores TRPV-1 tras su activación con ligandos exógenos o endógenos, aumentan los niveles de calcio intracelular de las células y se midieron los niveles de calcio intracelular utilizando indicadores fluorescentes sensibles a calcio. En este caso fue utilizado Fluo-4AM, el cual tras ser cargado en las células en estudio permite monitorear los cambios en el calcio intracelular de modo cualitativo, de este modo la fluorescencia emitida por Fluo-4AM luego de unirse al calcio intracelular es detectada a una longitud de onda específica 516nm y la intensidad de fluorescencia emitida se correlaciona de manera proporcional con los flujos de calcio intracelular. De este modo en presencia de ligandos agonistas la intensidad de fluorescencia es mayor respecto a ligandos antagonistas, los cuales disminuirán la fluorescencia cuando el receptor TRPV-1 es activado con agonistas.

Así, la actividad de los compuestos sintetizados en receptores TRPV-1 fue evaluada a través de mediciones de calcio intracelular en células HEK293 que expresan el receptor TRPV1 de rata, las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en un termociclador de real time PCR, el cual fue ensayado y validado por Derek S. Reubish et al. [49] con propósitos de screening y estudio de la respuesta de canales iónicos activados por temperatura, específicamente en canales TRPM-8 y TRPV-1 para los cuales fue validado el ensayo. También es importante destacar que permite estudiar los mecanismos de activación por temperatura del receptor TRPV-1 manteniendo temperaturas controladas, así se midió las señales de fluorescencia cuando el receptor TRPV-1 es activado por temperatura, capsaicina y en presencia de las chalconas sintetizadas.

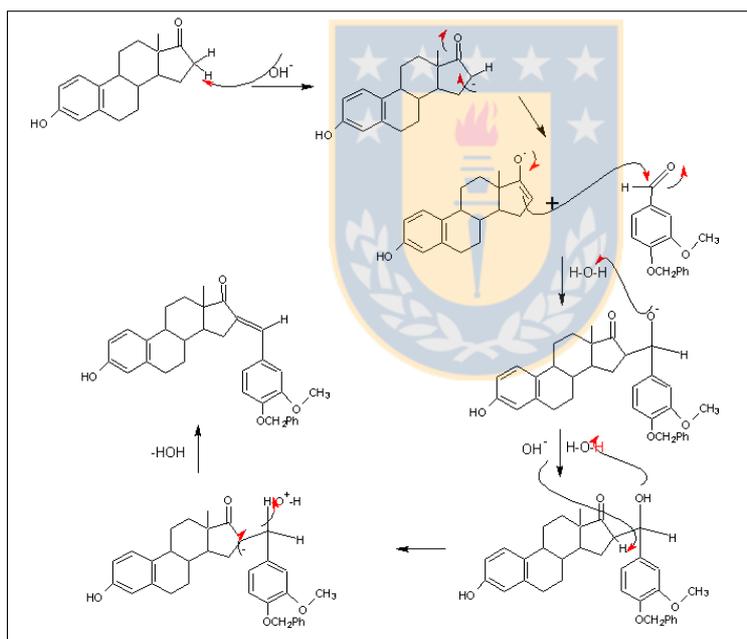
La evaluación de la actividad en receptores TRPV-1 consistió en un screening con el objetivo de identificar los compuestos activos para el receptor TRPV-1, para esto las células HEK 293 que expresan el receptor TRPV-1 de rata son plaqueadas en placas de 48 pocillos; en cada pocillo se plaquearon 18 $\mu$ L de células HEK 293 rTRPV-1 (50,000 células por pocillo) y 2 $\mu$ L de cada compuesto a una concentración de 1 $\mu$ M, esto para el experimento de activación del receptor TRPV-1 por temperatura. En el caso del screening realizado mediante activación del receptor TRPV-1 con capsaicina en cada pocillo se plaquearon 16  $\mu$ L de células HEK 293 rTRPV-1, 2 $\mu$ L de compuesto (1 $\mu$ M) y 2 $\mu$ L de capsaicina a una concentración de 0,31  $\mu$ M.

## 4.- RESULTADO Y DISCUSION

### 4.1.- Mecanismo de reacción

Las condensaciones aldólicas ensayadas para formar chalconas, derivadas de los esteroides sintetizados, tienen un mecanismo de reacción como el mostrado en la figura N°12. La condensación de Claisen-Smith comienza con una reacción ácido-base con la sustracción del protón ácido alfa, esto conduce a la formación del enolato, que reacciona como nucleófilo adicionando al carbonilo electrofílico de vainillina, luego de una serie de pasos en donde participa el agua como donador y aceptor de protones finalmente la estructura se deshidrata, formando la chalcona al liberar la molécula de agua.

**Figura N°12.- Mecanismo de reacción de condensación de Claisen-Smith, utilizando como ejemplo al esteroide estrona.**



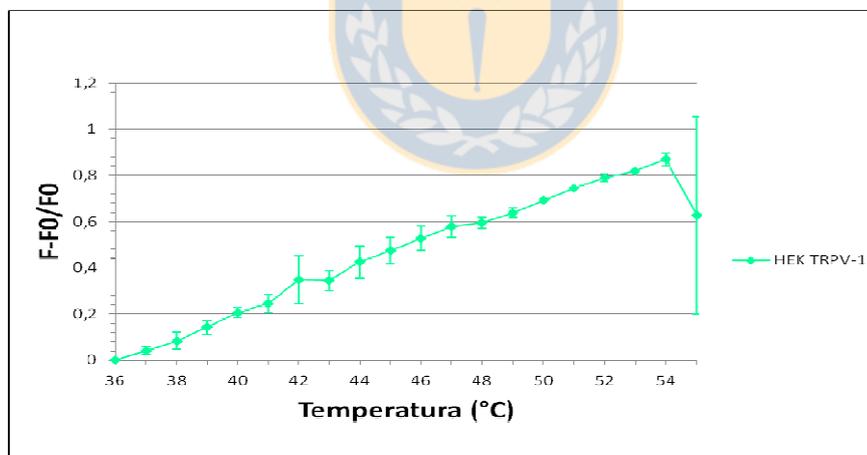
### 4.2.- Actividad sobre receptores TRPV-1 de esteroides.

Los resultados de actividad obtenidos tras la activación del receptor mediante temperatura para las muestras controles, que corresponden a compuestos con actividad antagonistas y agonista conocidas para el receptor TRPV-1, se muestran en los gráficos N°1 a N°3. Estos gráficos corresponden a la fluorescencia relativa en función de la temperatura desde 36.0 °C hasta 55.0 °C con incrementos de 1.0 °C efectuados cada 35 segundos y que fue medida para cultivos de células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata, incubadas en presencia o ausencia de antagonistas y agonistas del receptor TRPV-1. Los cambios de

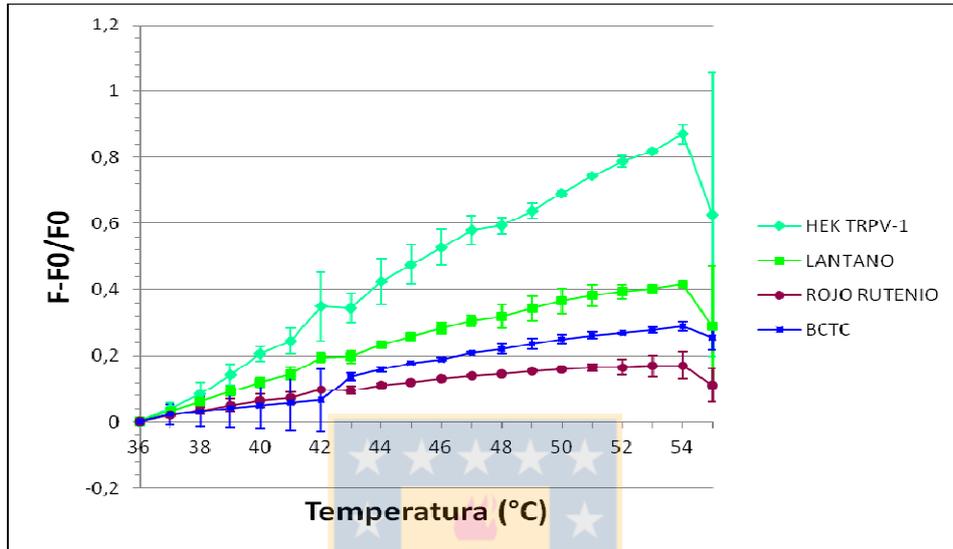
fluorescencia en función de la temperatura representan la respuesta del receptor TRPV-1 cuando este es activado por temperaturas mayores a la temperatura corporal.

En el gráfico N° 1 se puede observar que las células que expresan el receptor TRPV-1 de rata muestran un rápido aumento de los niveles de calcio intracelular al aumentar la temperatura, presentando su máximo nivel a los 54.0°C, estos cambios de calcio intracelular pueden asociarse con la activación del receptor TRPV-1 por temperatura debido a que cuando las células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 son incubadas en presencia de antagonistas del receptor, tales como BCTC, Lantano y Rojo de Rutenio (gráfico N° 2) se observa una disminución de los niveles de calcio intracelular y un aumento de este cuando las células HEK 293 transfectadas son incubadas en presencia de capsaicina; un agonista del receptor TRPV-1 [gráfico N° 3].

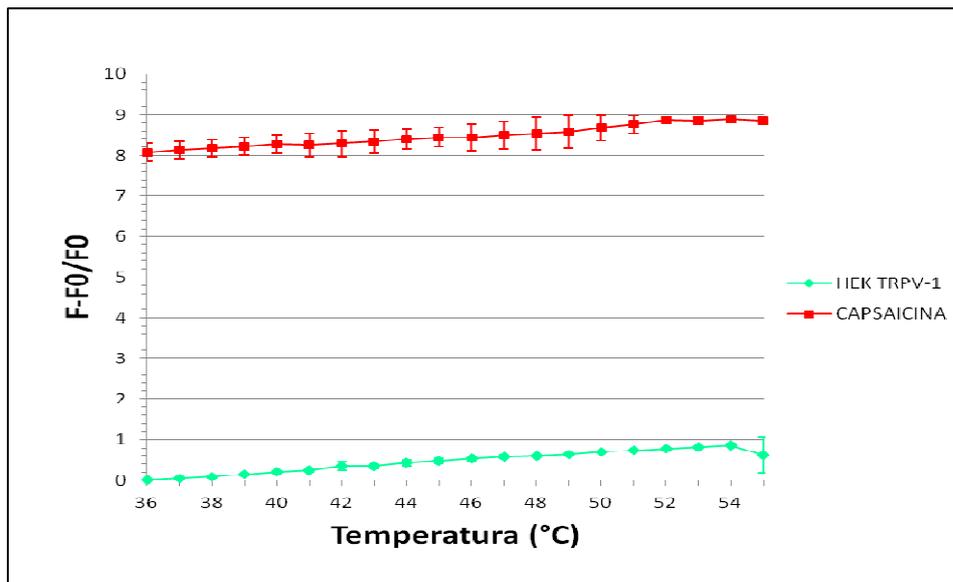
**Gráfico N° 1: Respuesta de células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata a la temperatura. La respuesta es expresada como fluorescencia relativa promedio  $\pm$  desviación estándar en función de la temperatura realizada para dos experimentos independientes.**



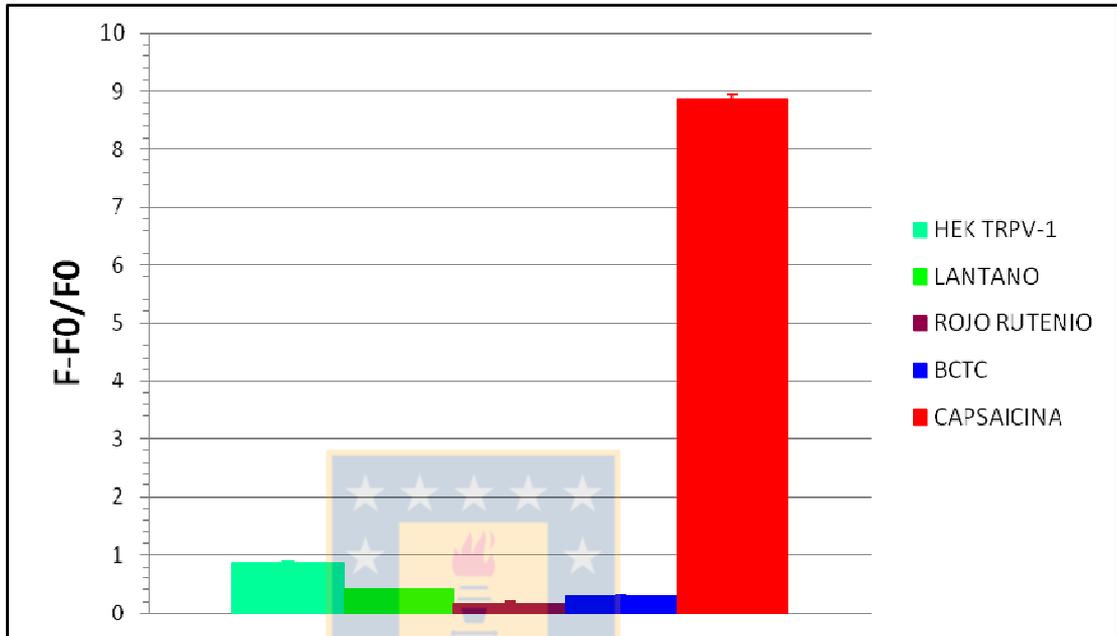
**Grafico N°2:** Respuesta inducida por temperatura de células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata en presencia de antagonistas del receptor a concentraciones de 1 $\mu$ M (BCTC), 100  $\mu$ M (Lantano) y 100  $\mu$ M (Rojo de Rutenio). La respuesta es expresada como fluorescencia relativa promedio  $\pm$  desviación estándar en función de la temperatura, obtenida para dos experimentos independientes.



**Gráfico N°3:** Respuesta inducida por temperatura de células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata incubadas en presencia de capsaicina a 3.1  $\mu$ M. La respuesta es expresada como fluorescencia relativa promedio  $\pm$  desviación estándar en función de la temperatura, obtenida para dos experimentos independientes.



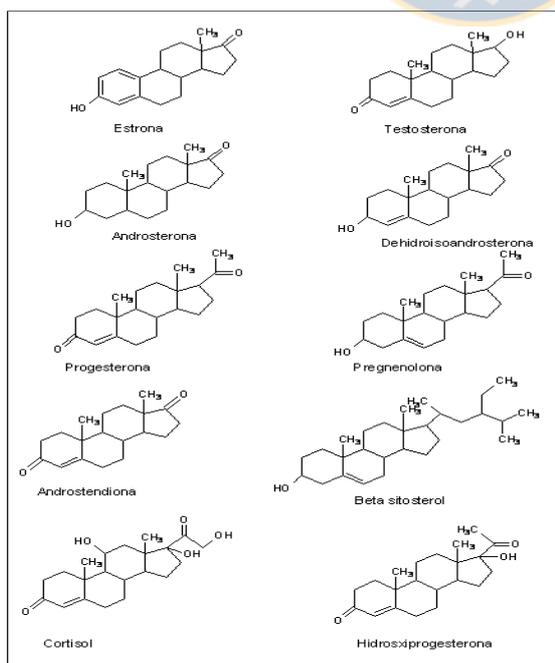
**Gráfico N°4: Respuesta de células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata a temperatura 54.0°C en presencia de antagonistas y capsaicina. La respuesta es expresada como fluorescencia relativa promedio  $\pm$  desviación estándar en función de la temperatura realizada para dos experimentos independientes.**



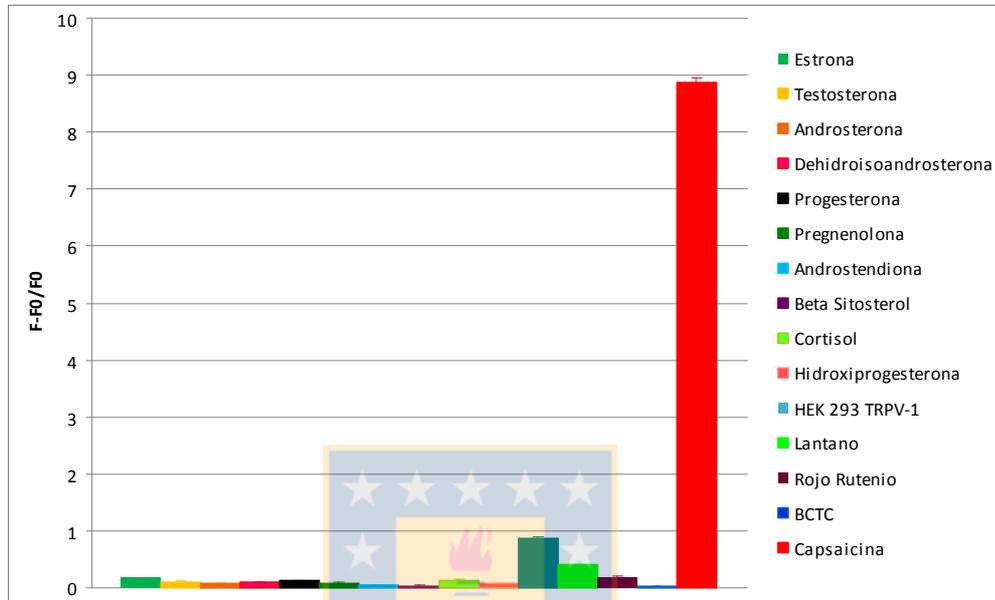
Así, considerando que la máxima activación del receptor TRPV-1 de rata para las condiciones experimentales realizadas es alcanzada a 54.0°C, se tomaron las muestras controles a la misma temperatura [gráfico N° 4], la cual representa la máxima activación del receptor TRPV-1 y el efecto agonista o antagonista de los controles sobre esta respuesta. La máxima respuesta del receptor es obtenida como la máxima fluorescencia y que corresponde al máximo aumento de calcio intracelular, generado por la máxima activación del receptor TRPV-1 alcanzada a los 54.0° C. Así en el gráfico N° 4 se observa el efecto antagonista de BCTC, Lantano y Rojo de Rutenio sobre la máxima activación de receptores TRPV-1 y el efecto agonista de capsaicina, el cual comparado con la respuesta de las células HEK 293 que expresan el receptor (HEK TRPV-1) en ausencia de capsaicina, se observa un aumento significativo de fluorescencia desde la temperatura inicial (grafico N° 3), lo cual es coincidente con el efecto agonista y de potenciación de capsaicina para la respuestas inducidas por calor del receptor TRPV-1 [8, 50]. De este modo los resultados de actividad agonista y antagonistas para los compuestos controles utilizados para este experimento son similares a los reportados mediante otras metodologías para el efecto del aumento de temperatura sobre la activación del receptor TRPV-1 en presencia y ausencia de los compuestos probados [21-54].

Los resultados obtenidos en el screening mediante activación del receptor TRPV-1 por temperatura y capsaicina para los esteroides [figura N°13] se presentan en los gráficos 5-8. Los gráficos N° 5 y N°6(ampliación del grafico N°5) muestra la fluorescencia relativa máxima obtenida para las células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 cuando es activado a 54.0°C y como fue mencionado anteriormente corresponde a la temperatura donde se observa la máxima activación del receptor TRPV-1. Los resultados obtenidos muestran el efecto inhibitor de los esteroides sobre la máxima respuesta del receptor TRPV-1 alcanzada a los 54.0°C y que es observada como una disminución de la fluorescencia relativa correspondiente a una disminución en la concentración de calcio intracelular. De esta manera los esteroides tienen capacidad para inhibir la activación de los receptores TRPV-1 por temperatura y capsaicina. En general los esteroides presentan una actividad antagonista, que es menor a la observada para BCTC, un potente antagonista del receptor TRPV-1, en el caso de la activación por temperatura, en la activación por capsaicina los esteroides en general, exceptuando a la estrona, presentan un mayor efecto antagonista que BCTC. El compuesto que presenta la menor actividad sobre el receptor fue la estrona y la que presenta la mayor actividad antagonista en el caso de la activación por temperatura es el  $\beta$ -sitosterol [grafico 6] y en el caso de la activación con capsaicina es la deshidroisoandrosterona [grafico 8]. En el caso de la activación por temperatura todos los esteroides presentan un menor efecto antagonista comparativamente con BCTC[grafico 6] a diferencia de la activación del receptor con capsaicina[grafico 8], en donde los esteroides presentan en general un mayor efecto antagonista, exceptuando la estrona.

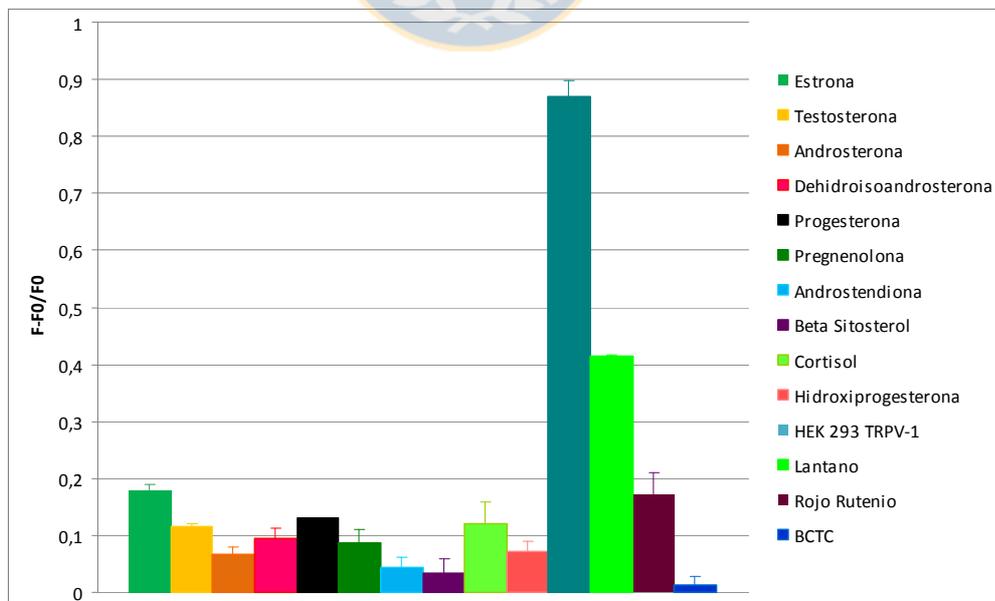
**Figura N°13.- Estructura de los esteroides evaluados en células HEK 293 rTRPV-1.**



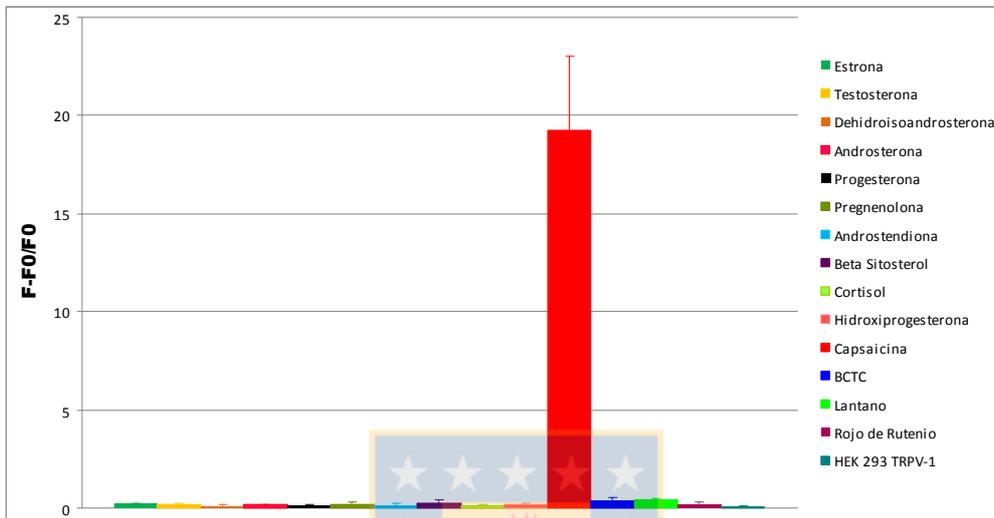
**Grafico N°5: Respuesta de células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata, activados por temperatura a 54.0°C, en presencia de antagonistas de capsaicina y capsaicina. La respuesta es expresada como fluorescencia relativa promedio  $\pm$  desviación estándar en función de la temperatura realizada para dos experimentos independientes.**



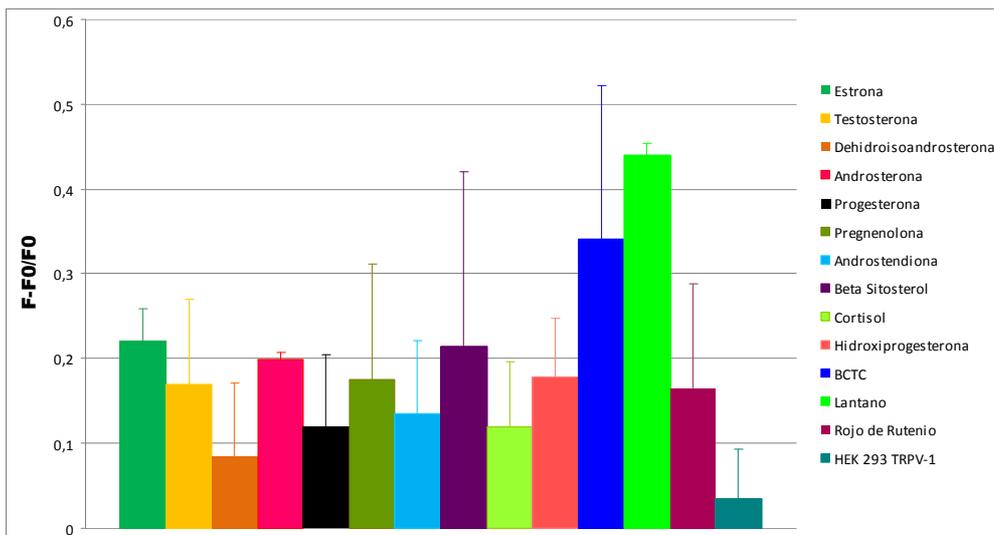
**Grafico N° 6: Ampliación del gráfico anterior de respuesta de células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata**



**Grafico N°7: Respuesta de células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata activados por capsaicina en presencia de antagonistas y capsaicina. La respuesta es expresada como fluorescencia relativa promedio  $\pm$  desviación estándar en función de la temperatura realizada para dos experimentos independientes.**



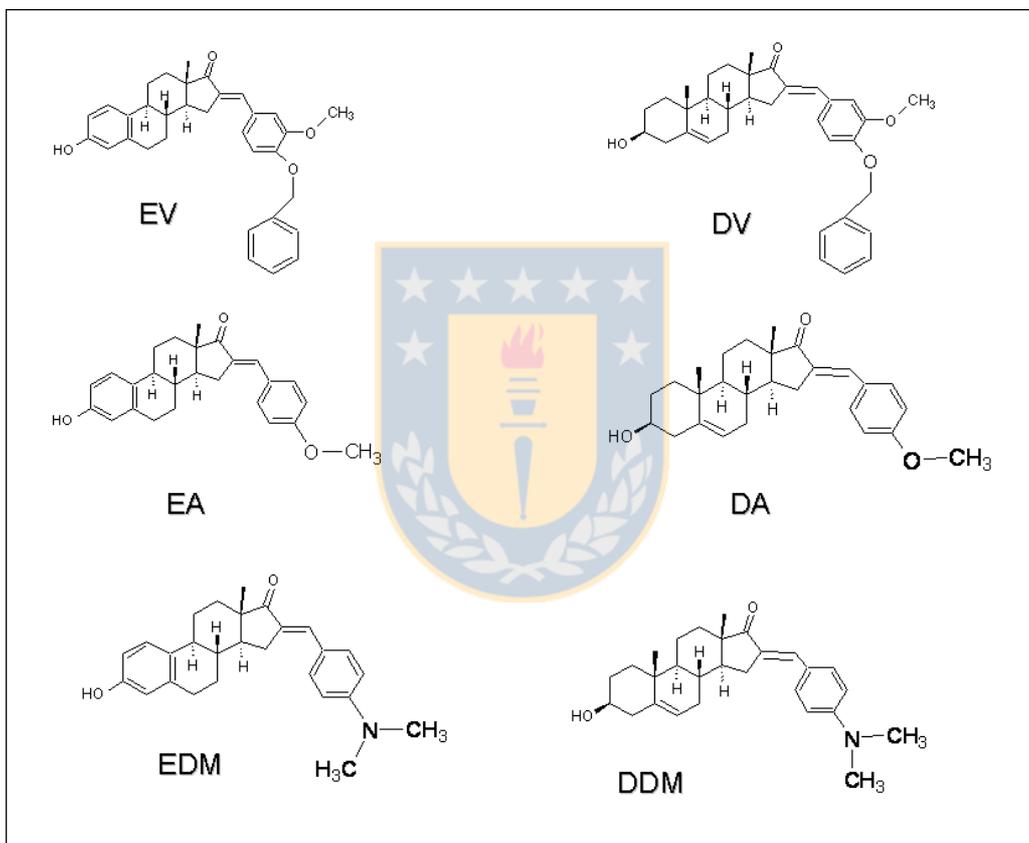
**Grafico N° 8: Respuesta de células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata activados con capsaicina en presencia de antagonistas y capsaicina. La respuesta es expresada como fluorescencia relativa promedio  $\pm$  desviación estándar en función de la temperatura realizada para dos experimentos independientes.**



### 4.3.-Actividad biológica en receptores TRPV-1 de derivados esferoidales tipo chalconas

Se realizó en tanto la evaluación biológica en el receptor TRPV-1 de la misma forma que se realizó para los distintos esteroides, el receptor fue activado por capsaicina en presencia de antagonistas como el RR( rojo de rutenio), BCTC, lantano y los esteroides sintetizados [figura 14]

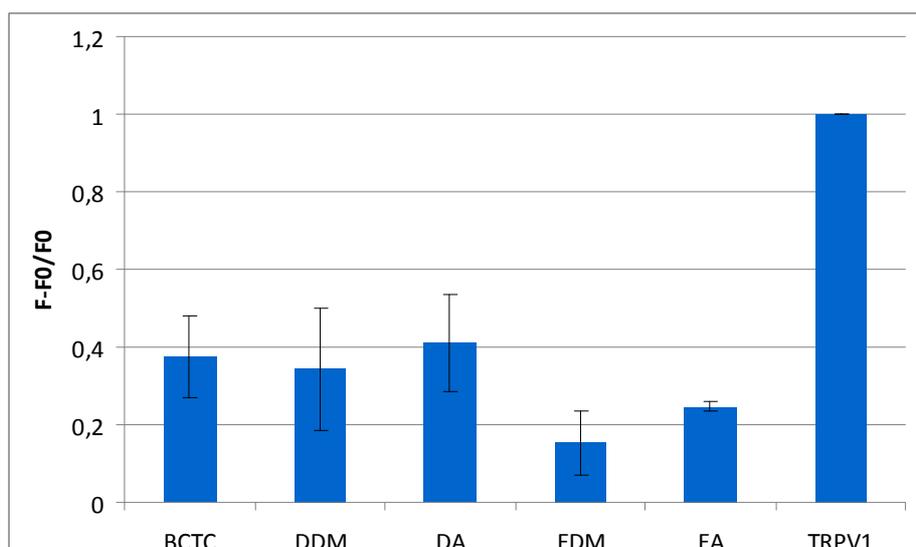
**Figura N°14.- Estructura de los compuestos esteroidales sintetizados tipo chalconas evaluados en células HEK rTRPV-1**



**Grafico N°9: Respuesta de células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata activados con capsaicina en presencia de antagonistas y capsaicina. La respuesta es expresada como fluorescencia relativa promedio  $\pm$  desviación estándar en función de la temperatura realizada para dos experimentos independientes.**



**Grafico N°10: Respuesta de células HEK 293 transfectadas con el receptor TRPV-1 de rata activados con capsaicina en presencia de antagonistas y capsaicina. La respuesta es expresada como fluorescencia relativa promedio  $\pm$  desviación estándar en función de la temperatura realizada para dos experimentos independientes.**



Los resultados obtenidos en los gráficos N° 9 y N°10, muestran la actividad de células HEK 293 que expresan el receptor TRPV-1 de rata y son incubadas en presencia de los correspondientes controles y esteroides sintetizados. Puede ser observado que la fluorescencia relativa de las células HEK 293 que expresan el receptor TRPV-1 y no son incubadas en presencia de antagonistas como Lantano, Rojo de Rutenio y BCTC es mayor comparada con las células que son incubadas en presencia de los antagonistas utilizados como controles, lo cual indica una relación entre la activación del receptor TRPV-1 por temperatura y los cambios de calcio intracelular. De este modo las células HEK 293 que expresan el receptor TRPV-1 de rata y son incubados en presencia de los esteroides sintetizados muestran una disminución en los niveles de calcio intracelular comparado con las células HEK 293 que expresan el receptor y no son incubadas en presencia de estos compuestos, lo cual permite establecer que los esteroides modificados tienen la capacidad de inhibir las respuestas activadas por capsaicina de receptores TRPV-1. En general los esteroides modificados presentan una mejor actividad inhibidora que BCTC, exceptuando el DA [grafico N°10]. De los compuestos con mayor actividad de inhibición se encuentra el EV y EDM, aunque son comparativamente equivalentes a la estrona (E) sin modificar, que presentan un menor efecto antagónico. En general todos los esteroides modificados presentan un menor efecto antagónico que los esteroides de partida, además los compuestos sintetizados con estrona(E) presentan una mayor actividad antagónica que los sintetizados con deshidroisoandrosterona(D). La unidad polar adicionada a los esteroides, ya sea el motivo vainilloide bencilado (EV y DV) o los sustituidos en la posición 4 del anillo aromático por grupo metoxi(EA y DA) y dimetilamino(EDM y DDM) y el doble enlace conjugado característico en todos, no favorecería la interacción con el receptor y por tanto se muestra un aumento en la fluorescencia relativa, lo que se relaciona directamente con el aumento del calcio intracelular.

## 5.-CONCLUSIONES

- La síntesis de chalconas se realiza de forma satisfactoria, con rendimientos entre el 40-60% pese a los impedimentos estructurales inherentes del esteroide y de la baja acidez de los hidrógenos alfa de un carbonilo estéricamente impedido.
- Los esteroides sin modificar presentan una actividad importante, para ser considerados como antagonistas del receptor TRPV-1, la cual es mayor que BCTC un potente antagonista del receptor
- Los compuestos de síntesis que tienen mayor actividad antagonista son los que fueron acoplados con vainillina bencilada, siendo la estrona la más alta.
- El receptor TRPV-1 es un receptor termosensible, este es estimulado a altas temperaturas nocivas y el cual presenta una elevada actividad en presencia de capsaicina
- Las modificaciones sintéticas en los esteroides deshidroisoandrosterona y estrona no producen una potenciación en la actividad antagonista de los esteroides sin modificar



## 6.-REFERENCIAS

- [1] Klyne, William, the chemistry of steroids.london.willmer brother & haram ltda, **1957**.pag 58
- [2] H. Salazar , A. Jara-Oseguera , T. Rosenbaum. El canal TRPV1 como diana para tratar el dolor. *Rev neurol.* 48: 357-64, marzo **2009**
- [3] Arpad Szallasi. Small molecule vanilloid TRPV1 receptor antagonists approaching drug status: can they live up to the expectations?. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 373: 273–286, 10 abril **2006**.
- [4] Giovanni Picazo-Juarez, Silvina Romero-Suarez, Andres Nieto-Posadas‡, Itzel Llorente, Andres Jara-Oseguera, Margaret Briggs, Thomas J. McIntosh, Sidney A. Simon, Ernesto Ladron-de-Guevara, Leon D. Islas,and Tamara Rosenbaum. Identification of a Binding Motif in the S5 Helix That Confers Cholesterol Sensitivity to the TRPV1 Ion Channel. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 286, N°. 28 : 24966–24976, July 15, **2011**
- [5] Abid H. Banday , M. Iqbal Zargar , Bashir A. Ganaie, Synthesis and antimicrobial studies of chalconyl pregnenolones. *Elsevier.*2 julio **2011**.
- [6] Shenghong Xu, Ying Cheng, Janet R. Keast, and Peregrine B. Osborne. 17  $\beta$ -Estradiol Activates Estrogen Receptor  $\beta$ -Signalling and Inhibits Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1 Activation by Capsaicin in Adult Rat Nociceptor Neurons. *Endocrinology*, 149(11):5540–5548. November **2008**
- [7] H Surya Prakash Rao. A convenient procedure for the synthesis of allyl and benzyl ethers from alcohols and phenols. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, Vol. 113, (3) : 191–196. 29. June **2001**.
- [8] Jörg Grandl, Sung Eun Kim, Valerie Uzzell, Badry Bursulaya, Matt Petrus, Michael Bandell<sup>2</sup> and Ardem Patapoutian. Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain. *Nature Neuroscience*, **2010**, 13, 708–714.
- [9] Arpad Szallasi, Daniel N. Cortright, Charles A. Blum and Samer R. Eid. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature reviews drug discovery* , **2007**, 6, 357-372.
- [10] Angel Messeguer, Rosa Planells-Cases and Antonio Ferrer-Montiel. Physiology and Pharmacology of the Vanilloid Receptor. *Current Neuropharmacology*, **2006**, 4, 1-15.

- [11] Arpad Szallasi, Francisco Cruz and Pierangelo Geppetti. TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *TRENDS in Molecular Medicine*, **2006**, 12, 545-554.
- [12] Martin J. Gunthorpe and Boris A. Chizh. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug Discovery Today* **2009**, 14, 56-67.
- [13] Gilbert Y. Wong,<sup>1</sup> Narender R. Gavva. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Research Reviews*, **2009**, 60, 267-277.
- [14] Tomoyuki Kawamata, Yukitoshi Niiyama, Jun Yamamoto and Shingo Furuse. Reduction of bone cancer pain by CB1 activation and TRPV1 inhibition. *Journal of Anesthesia*, **2010**, 24, 328-332.
- [15] Attila Tóth, Peter M. Blumberg and Judit Boczán. Anandamide and the Vanilloid Receptor (TRPV1). *Vitamins and Hormones*. **2009**, 81, 389-419.
- [16] Enza Palazzo, Livio Luongo, Vito de Novellis, Liberato Berrino, Francesco Rossi and Sabatino Maione. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. *Molecular Pain*. **2010**, 6, 1-11.
- [17] Narender R. Gavva, James J.S. Treanor, Andras Garami, Liang Fang et al. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain*, **2008**, 136, 202-210.
- [18] Christopher S. J. Walpole, Stuart Bevan, Graham Bloomfield, Robin Breckenridge, Iain F. James, Timothy Ritchie, Arpad Szallasi, Janet Winter, and Roger Wrigglesworth. Similarities and differences in the structure-activity relationships of capsaicin and resiniferatoxin analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1996**, 39, 2939-2952.
- [19] Roger Wrigglesworth, Christopher S. J. Walpole, Stuart Bevan, Elizabeth A. Campbell, Andy Dray, Glyn A. Hughes, Iain James, Kay J. Masdin and Janet Winter, Analogues of Capsaicin with Agonist Activity as Novel Analgesic Agents: Structure-Activity Studies. 4. Potent, Orally Active Analgesics. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, 39, 4942-4951.
- [20] Christopher S. J. Walpole, Roger Wrigglesworth, Stuart Bevan, Elizabeth A. Campbell, Andy Dray, Iain F. James, Martin N. Perkins, Derek J. Reid, and Janet Winter, Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 1. The aromatic "A-region". *Journal of Medicinal Chemistry*, **1993**, 36, 2362-2372.

- [21] Christopher S. J. Walpole, Stuart Bevan, Graham Bloomfield, Robin Breckenridge, Ian F. James, Timothy Ritchie, Arpad Szallazi, Janet Winter and Roger Wrigglesworth. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond "B-region". *Journal of Medicinal Chemistry*, **1993**, 36, 2373-2380.
- [22] Christopher S. J. Walpole, Roger Wrigglesworth, Stuart Bevan, Elizabeth A. Campbell, Andy Dray, Iain F. James, Derek J. Reid, Martin N. Perkins and Janet Winter. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 3. The hydrophobic side-chain "C-region". *Journal of Medicinal Chemistry*, **1993**, 36, 2381-2389.
- [23] Giovanni Appendino, Nives Daddario, Alberto Minassi, Aniello, Schiano Moriello, Luciano De Petrocellis, and Vincenzo Di Marzo. The Taming of Capsaicin. Reversal of the Vanilloid Activity of *N*-Acylvanillamines by Aromatic Iodination. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2005**, 48, 4663-4669.
- [24] Giovanni Appendino, Abdellah Ech-Chahad, Alberto Minassi, Sara Bacchiega, Luciano De Petrocellis and Vincenzo Di Marzo. Structure-activity relationships of the ultrapotent vanilloid resiniferatoxin (RTX): The homovanillyl moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2007**, 17, 132-135.
- [25] Mark E. McDonnell, a Sui-Po Zhang, a Adrienne E. Dubin b and Scott L. Dax. Synthesis and in vitro evaluation of a novel iodinated resiniferatoxin derivative that is an agonist at the human vanilloid VR1 receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2002**, 12, 1189-1192.
- [26] Dong Wook Kang , Yong Soo Kim , Kwang Su Lim , Myeong Seop Kim , Larry V. Pearce, et al. Halogenation of 4-hydroxy/amino-3-methoxyphenyl acetamide TRPV1 agonists showed enhanced antagonism to capsaicin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, 18, 8092-8105.
- [27] Jeewoo Lee, Mi-Kyoung Jin, Sang-Uk Kang and et al. Analysis of structure-activity relationships for the 'A-region' of *N*-(4-*t*-butylbenzyl)-*N'*-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]thiourea analogues as TRPV1 antagonists. *Journal Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2005**, 15, 4136-4142.
- [28] Hyun-Kyung Choi a, Sun Choi b, Yoonji Lee b, Dong Wook Kang a, HyungChul Ryu, et al. Non-vanillyl resiniferatoxin analogues as potent and metabolically stable transient receptor potential vanilloid 1 agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 690-698.
- [29] Jeewoo Lee, Mi-Kyoung Jin, Sang-Uk Kang and et al, Analysis of structure-activity relationships for the 'B-region' of *N*-(4-*t*-butylbenzyl)-*N'*-[4-(methylsulfonylamino)benzyl]-thiourea analogues as TRPV1 antagonists. *Journal Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2005**, 15, 4143-4150.

- [30] Vellarkad N. Viswanadhan, Yaxiong Sun, and Mark H. Norman. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships and Activity Predictions of Human TRPV1 Channel Antagonists: Comparative Molecular Field Analysis and Comparative Molecular Similarity Index Analysis of Cinnamides. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2007**, 50 (23), 5608–5619.
- [31] Elizabeth M. Doherty, Christopher Fotsch, Yunxin Bo, Partha P. et ál. Discovery of Potent, Orally Available Vanilloid Receptor-1 Antagonists. Structure-Activity Relationship of N-Aryl Cinnamides. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, 48 (1), 71–90.
- [32] Vassil I. Ognyanov, Chenera Balan, Anthony W. Bannon, Yunxin Bo, Celia Dominguez, et ál. Design of potent, orally available antagonists of the transient receptor potential vanilloid 1. Structure-activity relationships of 2-piperazin-1-yl-1H-benzimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 49, 3719-3742.
- [33] Jeewoo Lee, Su Yeon Kim, Soyoung Park, Ju-Ok Lim, Ji-Min Kim. Structure-activity relationships of simplified resiniferatoxin analogues with potent VR1 agonism elucidates an active conformation of RTX for VR1 binding. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, 12, 1055–1069.
- [34] Young-Ger Suh, Yong-Sil Lee, Kyung-Hoon Min, Ok-Hui Park, Jin-Kwan Kim, Ho-Sun Seung, Seung-Yong Seo, Bo-Young Lee, Yeon-Hee Nam and et Al, Novel Potent Antagonists of Transient Receptor Potential Channel, Vanilloid Subfamily Member 1: Structure-Activity Relationship of 1,3-Diarylalkyl Thioureas Possessing New Vanilloid Equivalents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, 48, 18, 5823-5836.
- [35] Enrico Morera , Luciano De Petrocellis , Ludovica Morera, et ál. Synthesis and biological evaluation of piperazinyl carbamates and ureas as fatty acid amide hydrolase (FAAH) and transient receptor potential (TRP) channel dual ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, 19, 6806–6809.
- [36] Kevin J. Hodgetts, Charles A. Blum, Timothy Caldwell, Rajagopal Bakthavatchalam, Xiaozhang Zheng, et al. Pyrido[2,3-*b*]pyrazines, discovery of TRPV1 antagonists with reduced potential for the formation of reactive metabolites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, 20, 4359–4363.
- [37] Natalie A. Hawryluk, Jeffrey E. Merit, Alec D. Lebsack, Bryan J. Branstetter, Michael D. Hack, et ál. Discovery and synthesis of 6, 7, 8, 9-tetrahydro-5H-pyrimido-[4,5-*d*]azepines as novel TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, 20, 7137–7141.

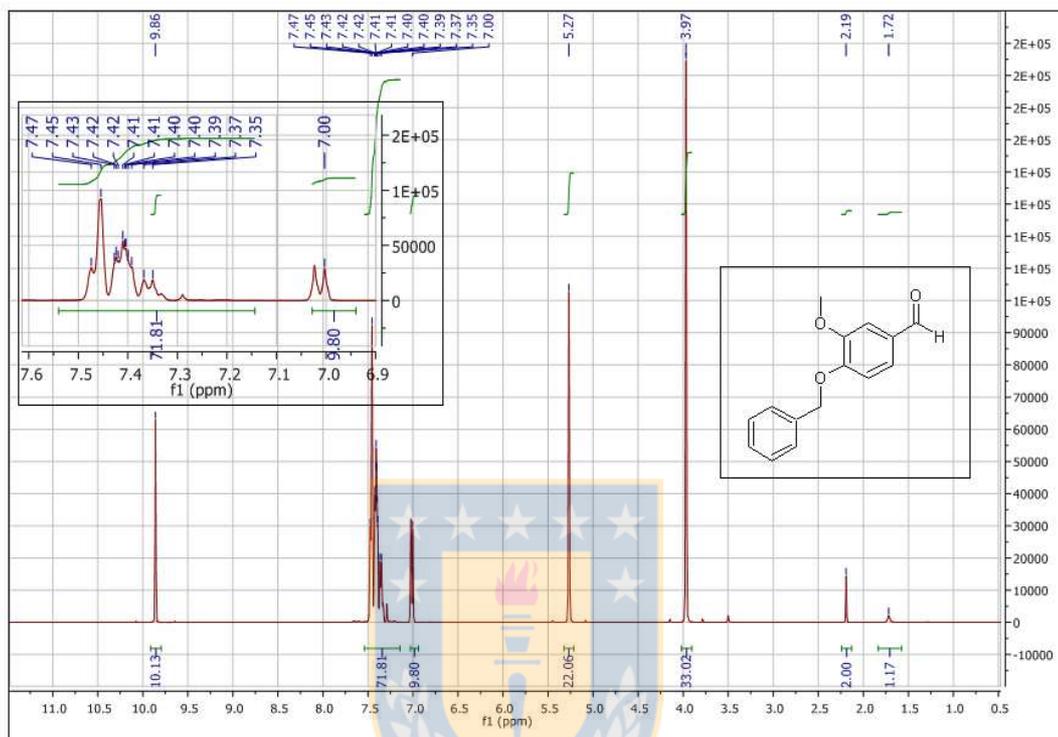
- [38] Bin Shao, Jincheng Huang, Qun Sun, Kenneth J. Valenzano, Lori Schmid and Scott Nolan. 4-(2-Pyridyl) piperazine-1-benzimidazoles as potent TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2005**, 15, 719–723.
- [39] Irene Drizin, Arthur Gomtsyan, Erol K. Bayburt, Robert G. Schmidt, Guo Zhu Zheng, et ál. Structure–activity studies of a novel series of 5, 6-fused heteroaromatic ureas as TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, 14, 4740–4749.
- [40] Ronald Palin, Lynn Abernethy, Nasrin Ansari, Kenneth Cameron, Tom Clarkson, Maureen Dempster, et ál. Structure–activity studies of a novel series of isoxazole-3-carboxamide derivatives as TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 21, 892–898.
- [41] Richard J. Perner, John R. Koenig, Stanley DiDomenico, Arthur Gomtsyan, et ál. Synthesis and biological evaluation of 5-substituted and 4, 5-disubstituted-2-arylamino oxazole TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, 18, 4821–4829.
- [42] Nuria Tamayo, Hongyu Liao, Markian M. Stec, Xianghong Wang, et ál. Design and Synthesis of Peripherally Restricted Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV 1) Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 51, 2744–2757.
- [43] Ning Xi, Yunxin Bo, Elizabeth M. Doherty, Christopher Fotsch, et ál. Synthesis and evaluation of thiazole carboxamides as vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2005**, 15, 5211–5217.
- [44] Vijay K. Gore, Vu V. Ma, Rami Tamir, Narender R. Gavva, James J. S. Treanor and Mark H. Norman. Structure–activity relationship (SAR) investigations of substituted imidazole analogs as TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2007**, 17, 5825–5830.
- [45] Michele C. Jetter, James J. McNally, Mark A. Youngman, Mark E. McDonnell, et ál. N -Pyridin-3-yl- and N -quinolin-3-yl-benzamides: Modulators of Human Vanilloid Receptor 1 (TRPV1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18, 2730–2734
- [46] C. Mills, M. McMackin, R. Jaffe, J. Yu, e. Zininberg, D. Slee, K. Gogas and M. Bradbury. Effects of the transient receptor potential vanilloid 1 antagonist A-425619 on body temperature and thermoregulation in the rat. *Neuroscience*, **2008**, 156 165–174.
- [47] Sonya G. Lehto, Rami Tamir, Hong Deng, Lana Klionsky, Rongzhen Kuang, April Le, et ál. Antihyperalgesic Effects of (R, E) -N- ( 2-

- Hydroxy-2,3-dihydro-1H-acrylamide (AMG8562), a Novel Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Modulator That Does Not Cause Hyperthermia in Rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **2008**, 326, 218-229.
- [48] Andras Garami, Yury P. Shimansky, Eszter Pakai, Daniela L. Oliveira, Narender R. Gavva and Andrej A. Romanovsky. Contributions of Different Modes of TRPV1 Activation to TRPV1 Antagonist-Induced Hyperthermia. *The Journal of Neuroscience*, **2010**, 30, 1435–1440.
- [49] Derek S. Reubish, Daniel E. Emerling, Jeff DeFalco, Daniel Steiger, Cheryl L. Victoria, and Fabien Vincent. Functional assessment of temperature-gated ion-channel activity using a real-time PCR machine. *Short Technical Reports*, **2009**, 47, 3-9.
- [50] Dan Ni and Lu-Yuan Lee. Effect of increasing temperature on TRPV1-mediated responses in isolated rat pulmonary sensory neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2008**,294, L563-L571
- [51] James D. Pomonis, James E. Harrison, Lilly Mark, David R. Bristol, Kenneth J. Valenzano, and Katharine Walker. N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorphyrudin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carbox-amide (BCTC), a Novel, Orally Effective Vanilloid Receptor 1 Antagonist with Analgesic Properties: II. In Vivo Characterization in Rat Models of Inflammatory and Neuropathic Pain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2003**, 306, 387–393.
- [52] Narender R. Gavva, Anthony W. Bannon, Sekhar Surapaneni, David N. Hovland Jr, Sonya G. Lehto, et ál. The Vanilloid Receptor TRPV1 Is Tonicly Activated In Vivo and Involved in Body Temperature Regulation. *The Journal of Neuroscience*, **2007**, 27, 3366 –3374.
- [53] Rachid El Kouhen, Carol S. Surowy, Bruce R. Bianchi, Torben R. Neelands, et ál. A-425619, a Novel and Selective TRPV1 Receptor Antagonist, Blocks Channel Activation by Vanilloids, Heat and Acid. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2005**, 314, 400-409.
- [54] C. Jerman, S.J. Brough, R. Prinjh, M.H. Harries, J.B. Davis and D. Smart. Characterization using FLIPR of rat vanilloid receptor (rVR1) pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, **2000**, 130, 916-922.
- [55] Holdcroft A, Berkley KJ. Sex and gender differences in pain and its relief. In: Wall PD, McMahon SB, Koltzenburg M, eds. Wall and Melzack's textbook of pain. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, **2006**, 1181–1197

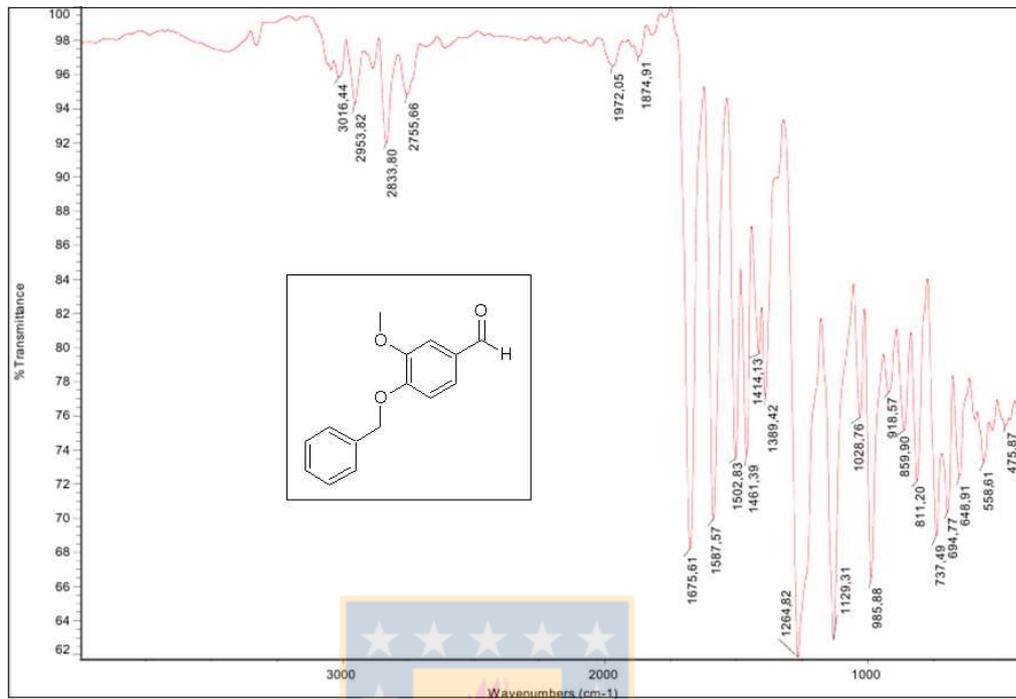
- [56] Dong-Yuan Cao, Yaping Ji, Bing Tang, Richard J. Taub. Estrogen receptor  $\beta$  activation is antinociceptive in a model of visceral pain in the rat, *Jpain* Jul **2012**, 13, 685-694
- [57] Fillingim RB, Ness TJ Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. *Neurosci Biobehav*, **2000**, Rev 24:485–501.
- [58] Papka RE, Srinivasan B, Miller KE, Hayashi S Localization of estrogen receptor protein and estrogen receptor messenger RNA in peripheral autonomic and sensory neurons. *Neuroscience*, **1997**, 79:1153–1163.
- [59] Papka RE, Storey-Workley M, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Collins JJ, Usip S, Saunders PT, Shupnik M Estrogen receptor- $\alpha$  and  $\beta$ - immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord. *Cell Tissue*, **2001**, Res 304:193–214.
- [60] Bennett HL, Gustafsson JA, Keast JR Estrogen receptor expression in lumbosacral dorsal root ganglion cells innervating the female rat urinary bladder. *Auton Neurosci*, **2003**, 105:90–100.

## 7.- ANEXO: DATOS DE ESPECTROSCOPÍA

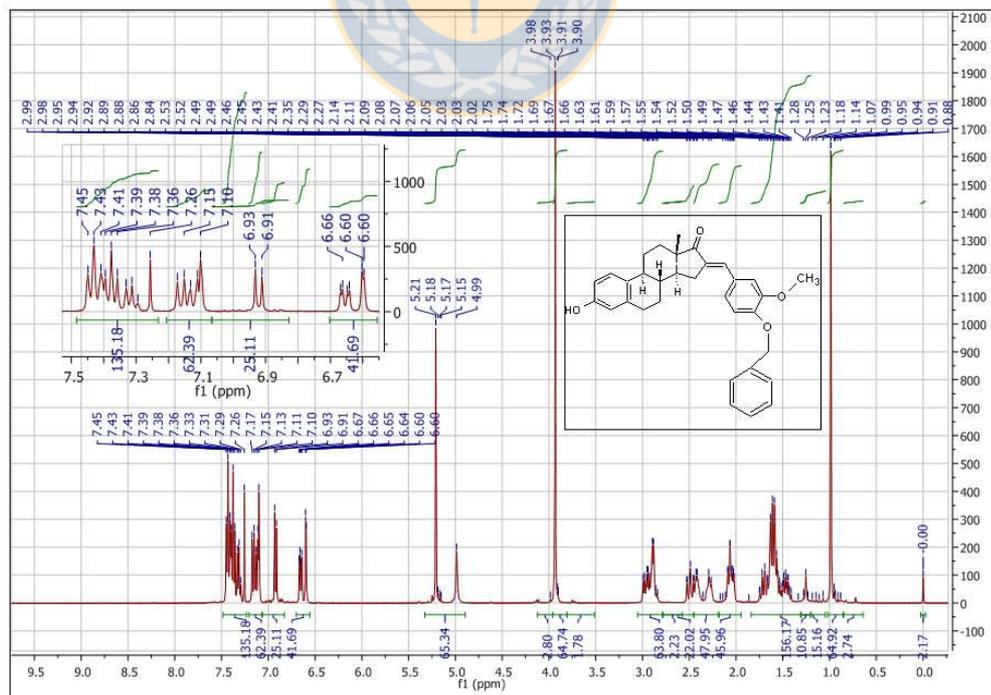
Espectro 1.- RMN  $^1\text{H}$  correspondiente a 4-benciloxi-3-metoxibenzaldehído



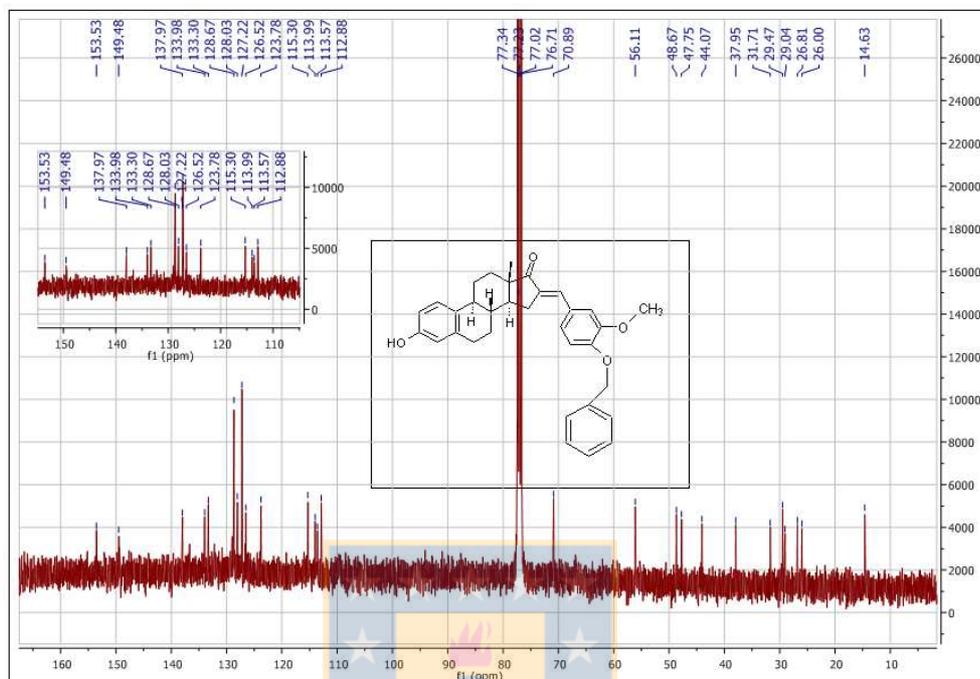
**Espectro 2.- IR correspondiente a 4-benciloxi-3-metoxibenzaldehido**



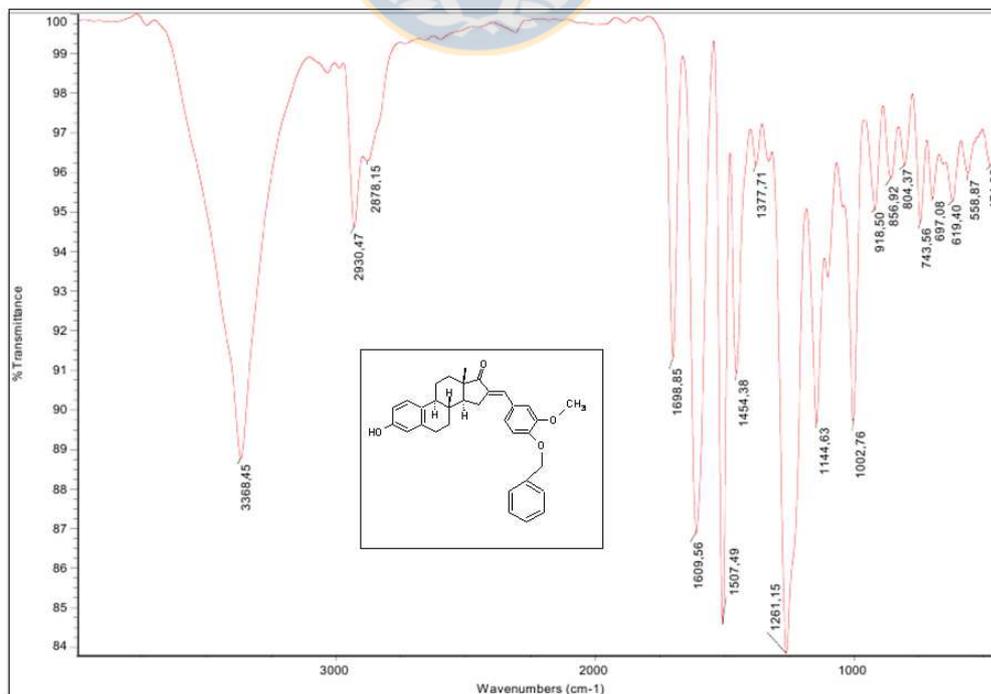
**Espectro 3.- RMN <sup>1</sup>H correspondiente 16-(4-benciloxi-3-metoxifenilmetilen)-3-hidroxiestran-1,3,5-trien-17-ona**



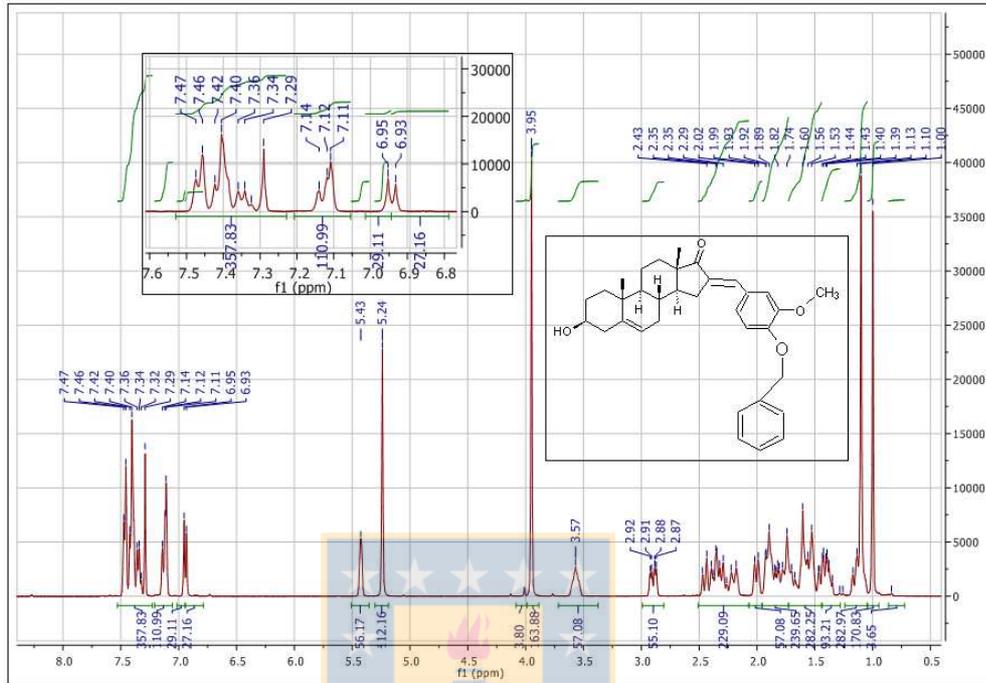
**Espectro 4.-  $^{13}\text{C}$  correspondiente a 16-(4-benciloxi-3-metoxifenilmetilen)-3-hidroxiestran-1,3,5-trien-17-ona**



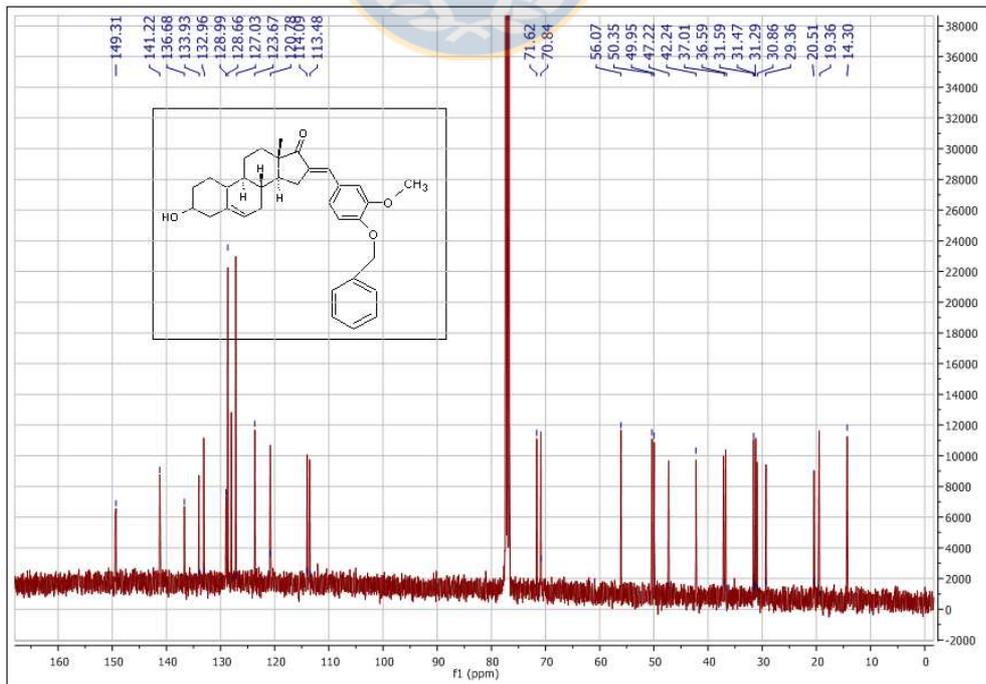
**Espectro 5.- IR correspondiente a 16-(4-benciloxi-3-metoxifenilmetilen)-3-hidroxiestran-1,3,5-trien-17-ona**



**Espectro 6.- RMN  $^1\text{H}$  correspondiente a 16-(4-benciloxi-3-metoxifenilmetileno)- $3\beta$ -hidroxiandrosto-5-en-17-ona**

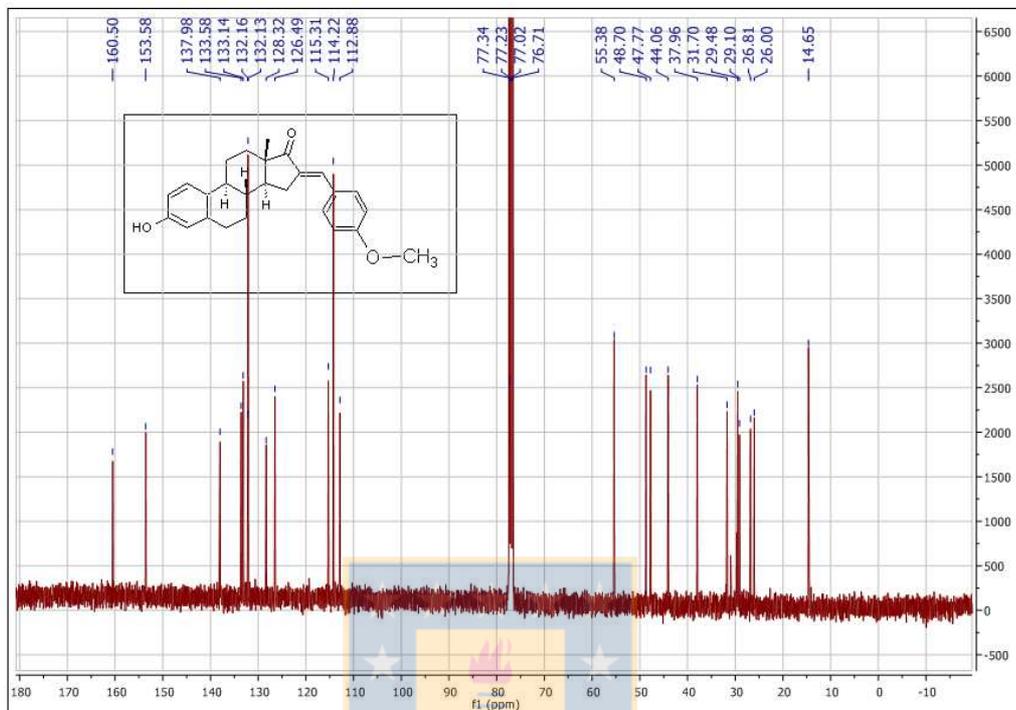


**Espectro 7.- RMN  $^{13}\text{C}$  correspondiente a 16-(4-benciloxi-3-metoxifenilmetileno)- $3\beta$ -hidroxiandrosto-5-en-17-ona**

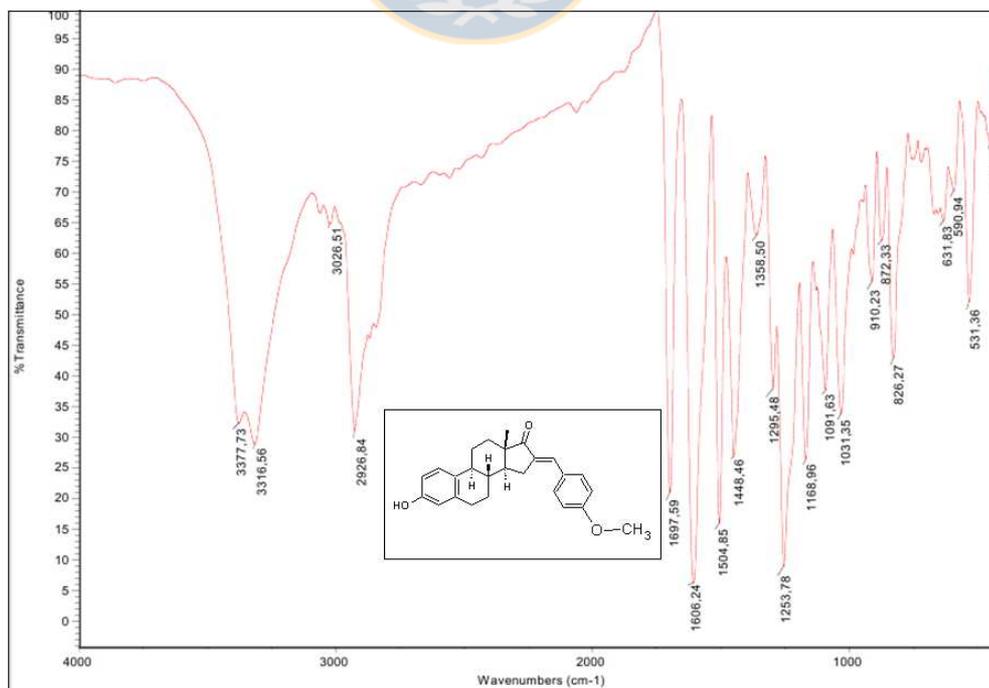




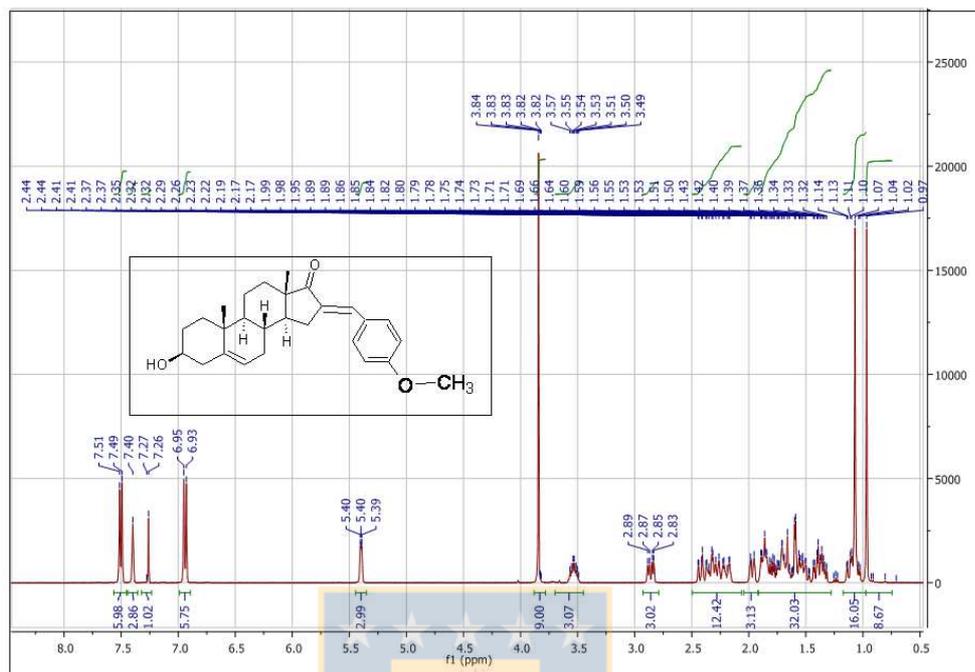
**Espectro 10.- RMN  $^{13}\text{C}$  correspondiente a 16-(4-metoxifenilmetilen)- 3-hidroxiestran-1,3,5-trien-17-ona**



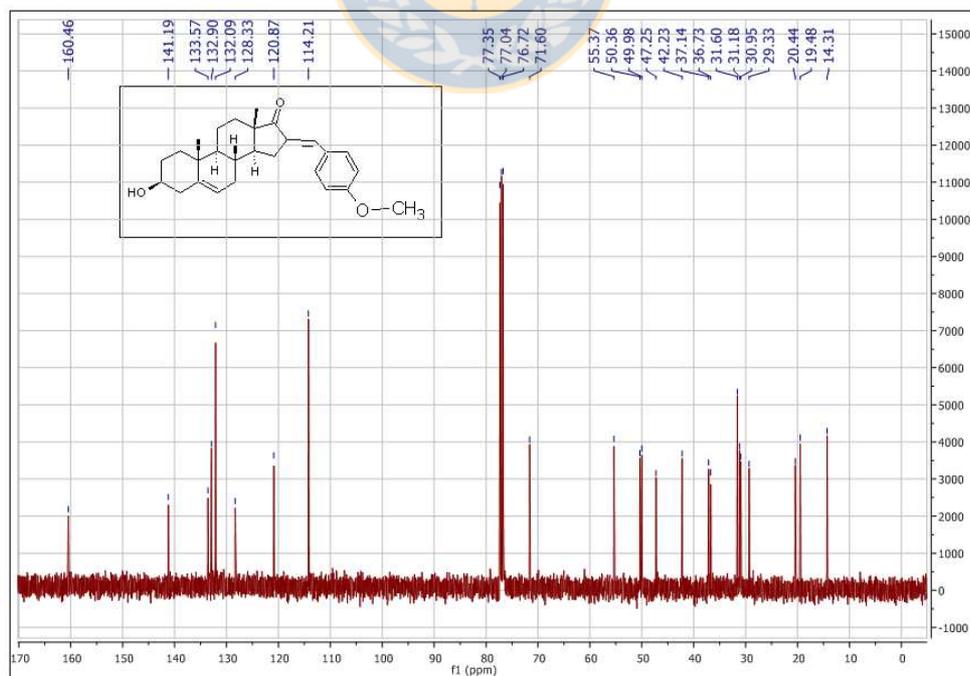
**Espectro 11.- IR correspondiente a 16-(4-metoxifenilmetilen)- 3-hidroxiestran-1,3,5-trien-17-ona**



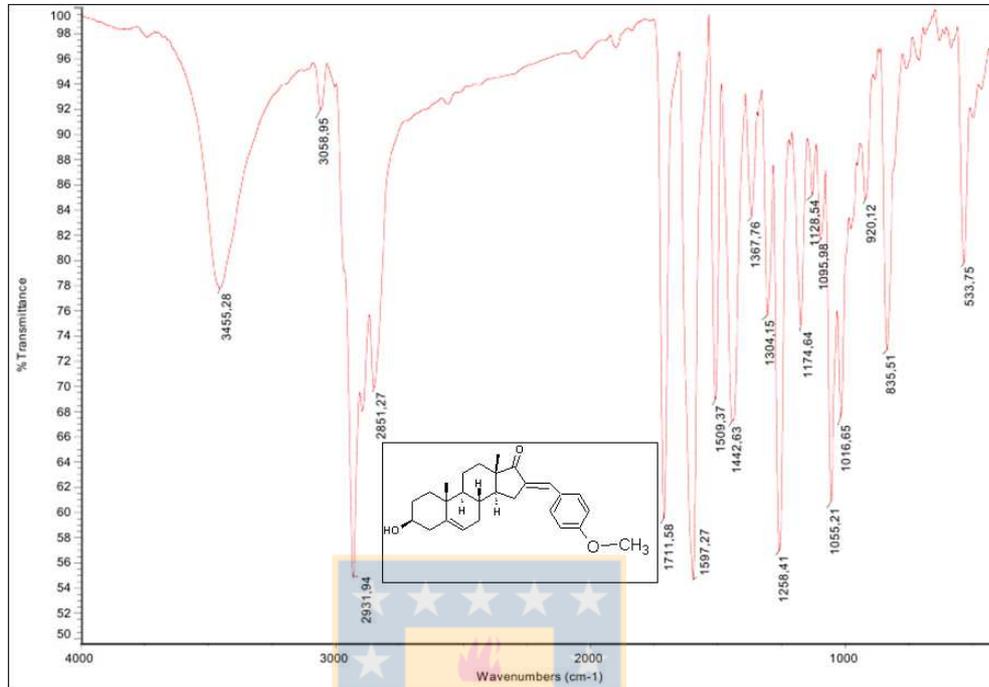
**Espectro 12.- RMN  $^1\text{H}$  correspondiente a 16-(4-metoxifenilmetilen)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-ona**



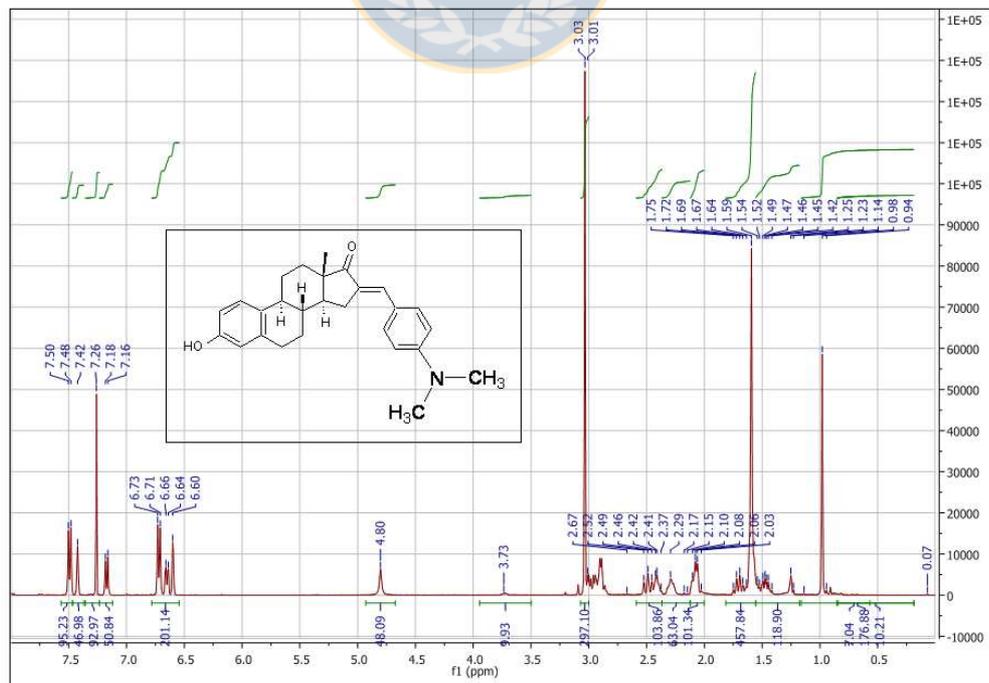
**Espectro 13.- RMN  $^{13}\text{C}$  correspondiente a 16-(4-metoxifenilmetilen)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-ona**



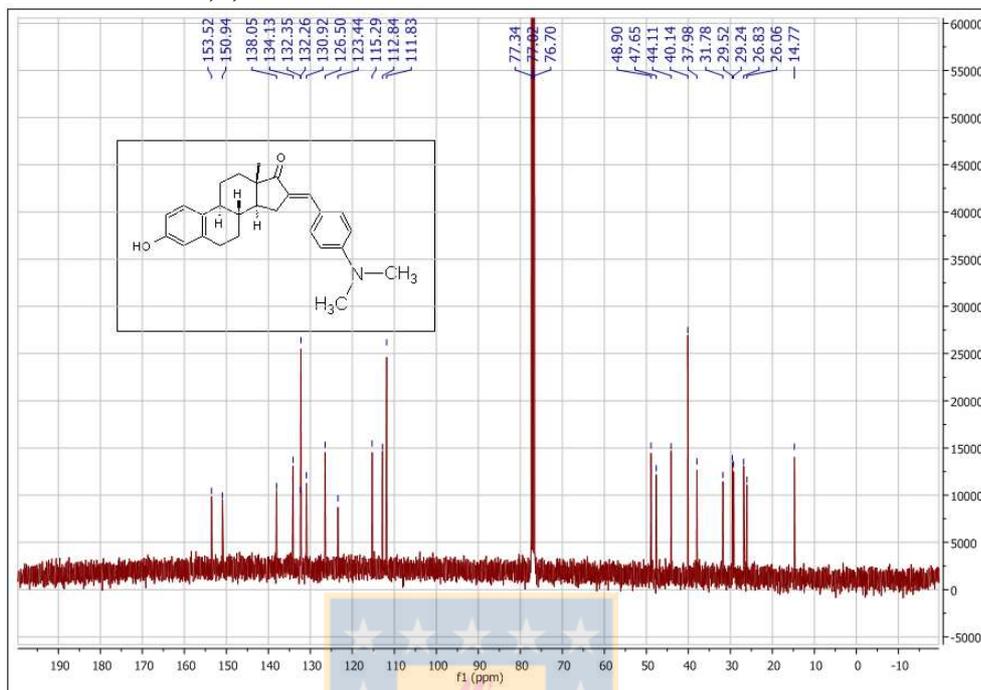
**Espectro 14.- IR correspondiente a 16-(4-metoxifenilmetilen)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-ona**



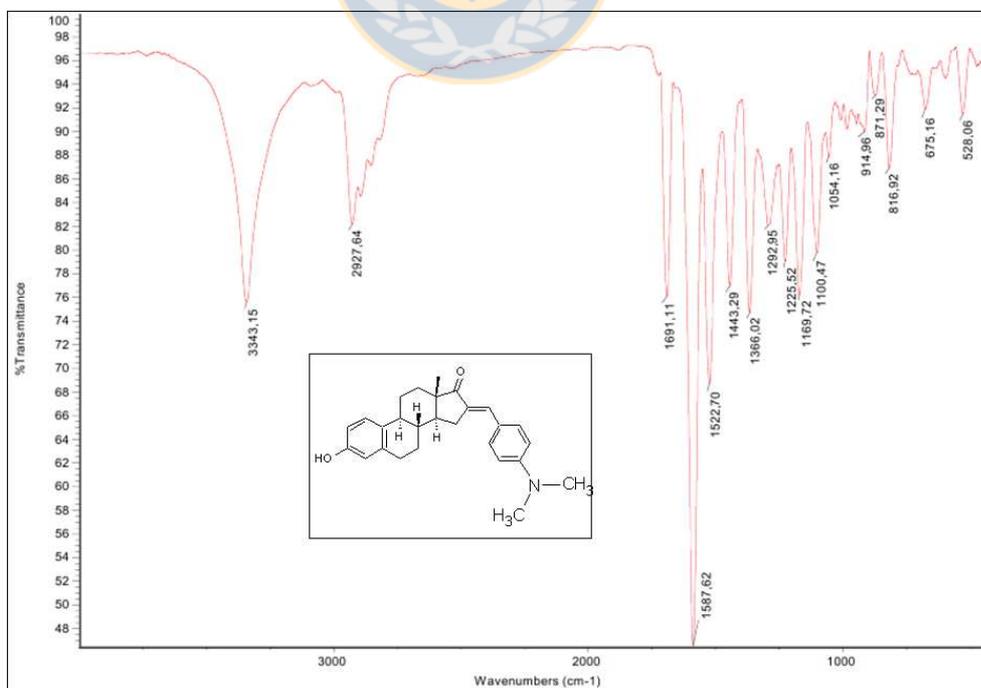
**Espectro 15.- RMN <sup>1</sup>H correspondiente 16-(4-dimetilaminofenilmetilen)- 3-hidroxiestrán-1,3,5-trien-17-ona**



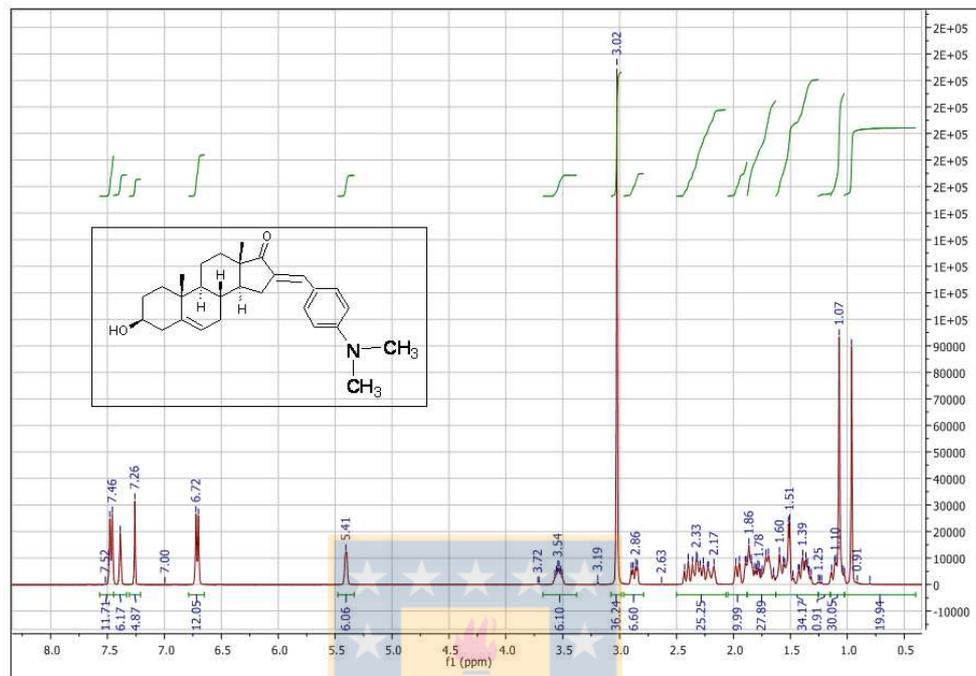
**Espectro 16.- RMN  $^{13}\text{C}$  correspondiente 16-(4-dimetilaminofenilmetilen)- 3-hidroxiestran-1,3,5-trien-17-ona**



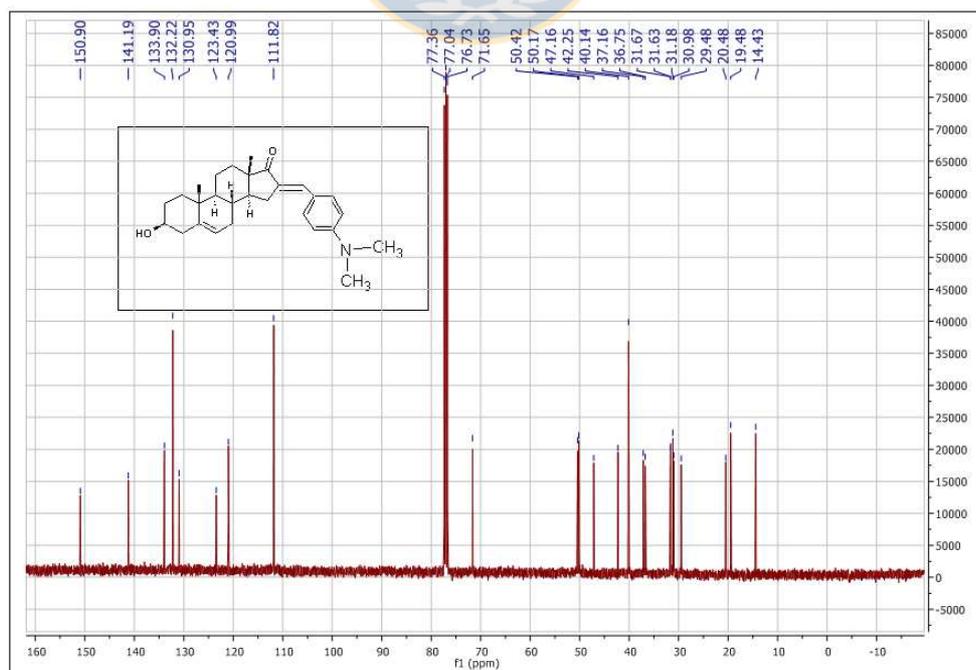
**Espectro 17.- IR correspondiente 16-(4-dimetilaminofenilmetilen)- 3-hidroxiestran-1,3,5-trien-17-ona**



**Espectro 18.- RMN  $^1\text{H}$  correspondiente a 16-(4-dimetilaminofenilmetileno)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-ona**



**Espectro 19.- RMN  $^{13}\text{C}$  correspondiente a 16-(4-dimetilaminofenilmetileno)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-ona**



**Espectro 20.- IR correspondiente a 16-(4-dimetilaminofenilmetilen)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17-ona**

