

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA

Trabajo Final de Graduación

EVALUACIÓN DE MÉTODOS SINTÉTICOS PARA LA OBTENCIÓN
DEL ÁCIDO (2E,4E,6E)-3-METIL-8,8,8-TRIFLUORO-7-
(2,2,4,4-TETRAMETILTIOCROMAN-6-IL)-2,4,6-OCTATRIENOICO

ALBERTO JIMÉNEZ SOMARRIBAS
CARNE 882054

Requisito parcial para optar por el grado académico de
LICENCIATURA EN QUÍMICA

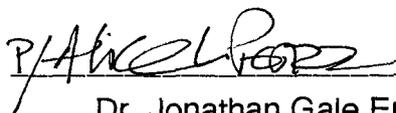
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica

1999

Este Trabajo Final de Graduación ha sido aceptado en su forma presente por la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química



Lic. Jorge Chacón Solano
Director de la Escuela de Química



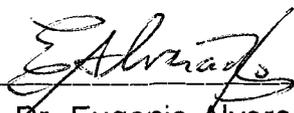
Dr. Jonathan Gale Entz
Director del Trabajo Final de Graduación.



Dra. Giselle Tamayo Castillo
Asesora



Dr. Eduardo Libby Hernández
Asesor



Dr. Eugenio Alvarado Zamora
Miembro del Tribunal



Alberto Jiménez Somarribas
Postulante

"El primer día de la semana, al rayar el alba, volvieron al sepulcro llevando los aromas preparados. Y se encontraron con que la piedra había sido rodada del sepulcro. Entraron y no encontraron el cuerpo de Jesús, el Señor. Mientras estaban desconcertadas por esto, se presentaron dos varones con vestidos deslumbrantes. Ellas se asustaron y bajaron los ojos; ellos les dijeron: «¿Por qué buscáis entre los muertos al que vive? No está aquí, ha resucitado.»"

Lucas 24, 1-6

A mi abuelita Lydia, a mi mamá Lidia y a mi tía Liliana.

A Jesucristo, mi Señor y Salvador

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle especialmente a mi abuelita Lydia, a mi mamá Lidia y a mi tía Liliana por todo el amor que me han dado y por todo el esfuerzo que hicieron para que yo alcanzara esta meta.

A mi familia materna, por su apoyo constante.

Al Dr. Jonathan Gale y a la Dra. Giselle Tamayo por las enseñanzas, los consejos y el estímulo que me han dado.

A Leonardo Alvarez, Víctor Hugo Soto, Jorge Cabezas, Tatiana Rodríguez, Kattya Víquez, Juan Carlos Brenes y Juan Cristián Santa María por su apoyo y compañía durante la realización del trabajo de laboratorio.

A Sandra Chaves, Cynthia González, Beatriz Zumbado y Allan Jiménez, por su apoyo y compañía durante la etapa de escritura de este trabajo.

A Adrián Pacheco por su ayuda durante la etapa de correcciones finales y elaboración de la presentación.

Al Lic. Johnny Valverde, al Dr. Eugenio Alvarado y al Dr. Robert Borris por su colaboración en la obtención de espectros de RMN.

A mi Señor Jesucristo, por todas las bendiciones que he recibido.

RESUMEN

Los retinoides son una familia de compuestos que comprende a la vitamina A y sus análogos naturales y sintéticos. Por su participación en procesos de diferenciación y proliferación celular, han despertado interés como potenciales agentes anticáncer y se utilizan en la actualidad para el tratamiento de desordenes de la piel.

Este trabajo describe la síntesis de dos compuestos no reportados previamente en la literatura, el (*E*) y el (*Z*)-3-4,4,4-trifluoro-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo, como resultado de la aproximación hacia la obtención del ácido (*2E,4E,6E*)-3-metil-8,8,8-trifluoro-7-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2,4,6-octatrienoico, posible análogo del ácido 9-*cis*-retinoico.

ÍNDICE

Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Resumen	vi
Índice	vii
Índice de espectros	viii
Índice de abreviaturas	xi
Introducción	1
Discusión	35
Conclusiones y recomendaciones	67
Parte experimental	68
Bibliografía	80
Apéndice	88

ÍNDICE DE ESPECTROS

Figura 2. Espectros ^1H -RMN 400 MHz (CDCl_3) de <i>E</i> y <i>Z</i> - (12)	54
Figura 3. Espectro de ^1H -NOE diferencial 400 MHz de <i>Z</i> - (12)	55
Figura 4. Espectro de ^1H -NOE diferencial 400 MHz de <i>E</i> - (12)	56
Figura 5: Espectro ^1H -RMN 90 MHz (CDCl_3) del 3-metil-2-butenato de etilo (17)	88
Figura 6: Espectro ^1H -RMN 90 MHz (CDCl_3) del (<i>E/Z</i>)-4-bromo-3-metil-2-butenato de etilo (18)	89
Figura 7: Espectro ^1H -RMN 90 MHz (CDCl_3) del (<i>E/Z</i>)-3-etoxicarbonil-2-metilpropen-2-enilfosfonato de dietilo (7)	90
Figura 8: Espectro ^1H -RMN 90 MHz (CDCl_3) de la mezcla de 3-metil-2-butenato de etilo (17) y (<i>E</i>)-4-hidroxi-3-metil-2-butenato de etilo (19)	91
Figura 9: Espectro IR (película) del (<i>E</i>)-3-metil-4-oxo-2-butenato de metilo (9)	92
Figura 10: Espectro RMN ^1H 90 MHz (CDCl_3) de la 4-metil-4-tiofenil-2-pentanona (24)	93
Figura 11: Espectro ^1H -RMN 90 MHz (CDCl_3) del 2,2,4,4-tetrametiltiocromano (26)	94

Figura 12: Espectro ^1H -RMN 90 MHz (CDCl_3) de la (2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-trifluorometilcetona (14)	95
Figura 13: Espectro ^1H -RMN 90 MHz (CDCl_3) del (2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-carboxilato de metilo (36)	96
Figura 14: Espectro ^1H -RMN 90 MHz (CDCl_3) del (<i>Z</i>)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (12)	97
Figura 15: Espectro ^1H -RMN 90 MHz (CDCl_3) del (<i>E</i>)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (12)	98
Figura 16: gHMQC 500 MHz (CDCl_3) del (<i>Z</i>)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (12)	99
Figura 17: gHMQC 500 MHz (CDCl_3) del (<i>E</i>)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (12)	100
Figura 18: gHMBC 500 MHz (CDCl_3) del (<i>Z</i>)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (12)	101
Figura 19: gHMBC 500 MHz (CDCl_3) del (<i>E</i>)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (12)	102
Figura 20: Espectros ^1H -RMN 400 MHz (CDCl_3) del (<i>E</i>) y (<i>Z</i>)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (12) (ampliación)	103
Figura 21: Espectros ^{13}C -RMN 100 MHz (CDCl_3) del (<i>E</i>) y (<i>Z</i>)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (12)	104

- Figura 22: Espectro ^{13}C -RMN 100 MHz (CDCl_3) del (*Z*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (**12**) (ampliación) 105
- Figura 23: ^1H -NOE diferencial 500 MHz (CDCl_3) del (*Z*)-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-4-trifluoro-2-butenato de metilo (**12**) (ampliación) 106
- Figura 24: Espectros ^{19}F -RMN 376 MHz (CDCl_3) del (*E*) y (*Z*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (**12**) (estándar externo $\text{C}_6\text{H}_5\text{CF}_3/\text{C}_6\text{D}_6 = -62,80$ ppm) 107
- Figura 25: Espectro ^1H -RMN 300 MHz (CDCl_3) de los productos de oxidación con MnO_2 del producto de reducción de (*E*)-**12** con LiAlH_4 108

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

9- <i>cis</i> -RA	ácido 9- <i>cis</i> -retinoico
13- <i>cis</i> -RA	ácido 13- <i>cis</i> -retinoico
α -IFN	α -Interferon
AIBN	aza-bis-isobutironitrilo
APL	leucemia aguda promielocítica
ARAT	retinol acil transferasa
ATRA	ácido todo- <i>trans</i> -retinoico
BCC	carcinoma de células basales
br	ancho
CAT	cloranfenicol acil transferasa
CRABP	proteína celular de transporte de ácido retinoico
CRBP	proteína celular de transporte de retinol
d	doblete
DBD	dominio de unión al ADN
dd	doblete de dobletes
DR	repetición directa
ER	repetición de adentro hacia afuera
FXR	receptor del farnesoide X
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPV	papilomavirus humano
HRE	elemento de respuesta hormonal
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IR	repetición invertida o infrarrojo

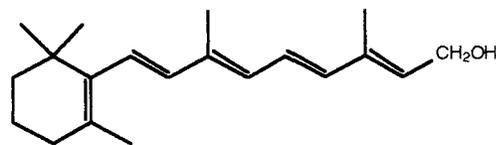
KS	sarcoma de Kaposi
LBD	dominio de unión al ligando
LRAT	retinol acil transferasa
m	multiplete
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NOE	efecto nuclear Overhauser
ODC	Ornitina decarboxilasa
PPAR	receptor del proliferador de peroxisomas
q	cuarteto
RA	ácido retinoico
RAR	receptor del ácido retinoico
RARE	elemento de respuesta al ácido retinoico
RBP	proteína de transporte de retinol
RXR	receptor del retinoide X
RXRE	elemento de respuesta al retinoide X
s	singulete
SAR	relaciones estructura-actividad
t	triplete
T ₃	estrógeno
TGase-I	transglutaminasa
TLC	cromatografía de capa fina
TPA	1O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TR	receptor de la hormona tiroidea
VDR	receptor de la vitamina D
VLC	cromatografía líquida al vacío

INTRODUCCIÓN

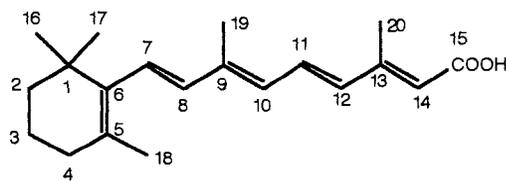
1.1 Retinoides

Los retinoides son una familia de compuestos que comprende al retinol (vitamina A), sus derivados naturales y análogos sintéticos. Este grupo de compuestos con alta diversidad estructural se enlazan a uno o varios receptores e inician múltiples respuestas fisiológicas en el organismo.

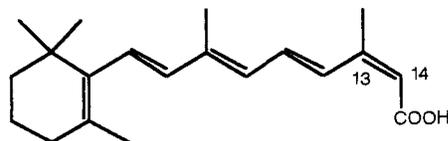
Los retinoides endógenos como el ácido todo-*trans*-retinoico (ATRA), el ácido 9-*cis* retinoico (9-*cis*-RA), el ácido-13-*cis*-retinoico (13-*cis*-RA) y el 11-*cis*-retinal regulan procesos celulares como desarrollo, reproducción, formación de huesos, proliferación y diferenciación celular, muerte celular programada, hematopoyesis. Además participan en la función inmune y en la visión.¹



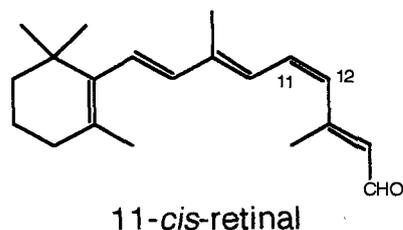
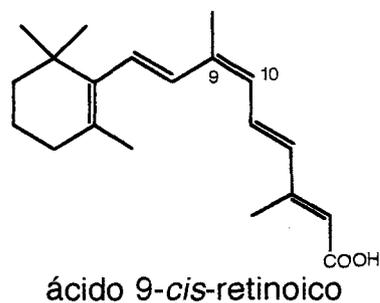
retinol



ácido todo-*trans* retinoico



ácido 13-*cis*-retinoico



Por esta gran cantidad de propiedades biológicas los retinoides se han evaluado para el tratamiento de enfermedades de la piel y de algunos tipos de cáncer.¹⁻³ El ATRA, el 13-*cis*-RA y los retinoides sintéticos Etretinate[®], Adapalene[®], Tazarotene[®] y Acitretin[®] están siendo empleados en la actualidad para el tratamiento de desordenes proliferativos de la piel como psoriasis, acné, queratinización y tratamiento de la piel dañada por la luz.

Se han encontrado retinoides que han demostrado ser agentes potenciales anticáncer por inhibir la progresión de células neoplásicas o preneoplásicas o por inducir su diferenciación a un fenotipo normal.^{2,4} Algunos de ellos se encuentran en etapas de desarrollo clínicas y preclínicas, como el LGD1069, 9-*cis*-RA, AM80 y ATRA liposomal.¹

Además de su participación en los procesos visuales, en los que el 11-*cis*-retinal actúa como cromóforo en los fotorreceptores, otros derivados del retinol son fundamentales para la reproducción, el desarrollo embrionario y la regulación del crecimiento y la diferenciación y proliferación celular.⁶

1.3 Metabolismo de la Vitamina A

Los ésteres de retinilo son convertidos a retinol en el intestino antes de ser absorbidos por las células intestinales (enterocitos). Los carotenoides son parcialmente convertidos en retinol en los enterocitos. El retinol reacciona dentro de los enterocitos convirtiéndose en ésteres de retinilo antes de ser absorbido por los quilomicrones, las principales lipoproteínas intestinales. Hay dos enzimas involucradas en la esterificación del retinol: una acil coenzima A (retinol acil transferasa, ARAT) y una lecitina (retinol acil transferasa, LRAT). El retinol debe estar enlazado a una proteína intracelular de transporte de retinol [CRBP-(II)] para ser sustrato de LRAT.⁵

Los quilomicrones pasan a la sangre, donde ocurren ciertos procesos como hidrólisis de triacilgliceroles e intercambio de apolipoproteínas que conducen a la formación de residuos de quilomicrones (que contienen la mayor parte del retinol en forma de ésteres de retinilo) y son absorbidos principalmente por el hígado. La absorción extrahepática de residuos de quilomicron se produce principalmente en células de la médula ósea y del bazo, y en menores proporciones el tejido adiposo, óseo o muscular, los testículos, pulmones o riñones. Aparentemente los residuos de quilomicron tienen un papel importante para el transporte de los ésteres de retinilo a tejidos que experimentan periodos intensivos de proliferación y diferenciación celular.⁵

En el hígado las células parenquimales son las responsables de la absorción de los residuos de quilomicrón. Los ésteres de retinilo son convertidos en retinol por una hidrolasa durante el proceso de endocitosis. En el retículo endoplásmico se une a la proteína de transporte de retinol (RBP) que se encuentra en altas concentraciones. El retinol-RBP pasa al complejo de Golgi y posteriormente se secreta fuera de las células. La mayor parte del retinol derivado de los residuos de quilomicrón es transferido de las células parenquimales a las células estelares. Entre el 50 y el 80% del retinol del organismo de un mamífero es almacenado dentro de las células estelares en el hígado en forma de ésteres de retinilo.⁵

El retinol que se encuentra en el plasma y no forma parte de residuos de quilomicrón se encuentra enlazado a RBP y proviene de las células estelares del hígado. Estas células controlan el almacenamiento y la movilización del retinol en el plasma y mantienen la concentración cercana a 2 μ M independientemente de las variaciones en el consumo de vitamina A. En estas células la saturación de CRPB(I) y de RBP por el retinol, unida a la regulación por retinoides de la expresión de CRBP(I) controlan la absorción, almacenamiento, y movilización del retinol. En el plasma el complejo retinol-RBP se enlaza reversiblemente a la proteína transtiretina (TTR), haciéndolo menos susceptible a la eliminación por medio de los riñones.⁵

Los mecanismos de entrada del retinol a las células extrahepáticas no se conocen detalladamente. Se sabe que existen receptores que se enlazan al retinol pero no se sabe si estos actúan como transportadores o si se desencadenan procesos de endocitosis.^{5,6}

Al igual que RBP, dentro de las células existen varias proteínas que actúan como transportadoras de retinol y son importantes para su transformación

en otros metabolitos activos como el ATRA, el 9-*cis*-RA, el 13-*cis*-RA o el ácido 3,4-dideshidroretinoico (DDRA).⁶

La CRBP (I) se encuentra principalmente en el hígado, los pulmones, la epidermis y los testículos, mientras que CRBP(II) está restringida a las células intestinales absorptivas.^{5,6}

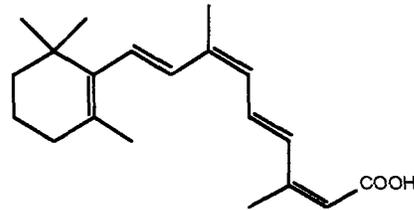
El retinol y el retinal enlazados a CRPB(I) son sustratos de una deshidrogenasa dependiente de NADP y una retinal deshidrogenasa en la cascada que conduce a la obtención de ATRA. Esta interacción asegura la protección en contra de otras deshidrogenasas no específicas.⁶

El ATRA se enlaza dentro de las células a las proteínas de transporte del ácido retinoico CRABP(I) y CRABP(II) que participan en la regulación del catabolismo del ATRA. Las células que requieren ATRA expresan CRBP, mientras que las que pueden verse afectadas por su presencia expresan CRABP y lo catabolizan a metabolitos polares a mayor velocidad. Por otro lado las CRABP pueden actuar secuestrando el ATRA en el citoplasma y previniendo que llegue al núcleo.⁶

La concentración de ácido retinoico dentro de las células depende de la absorción de retinol, de las velocidades de síntesis y degradación que están relacionadas con la cantidad de CRBP y CRABP en el citoplasma. Por otro lado, existen células que responden a la acción de los retinoides pero no expresan las proteínas transportadoras.⁵

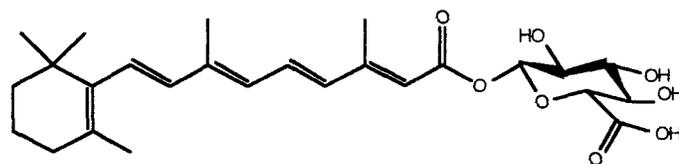
1.3.1 Metabolismo del ácido retinoico

El ATRA se isomeriza en el organismo a 13-*cis*-RA, 9,13-di-*cis*-RA⁷ y 9-*cis*-RA,⁸ estos dos últimos siendo metabolitos activos muy importantes. Más adelante se discutirá con detalle los mecanismos de acción de los ácidos retinoicos.

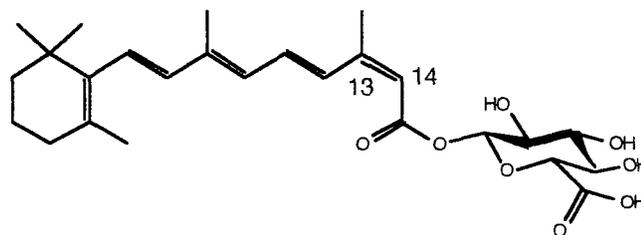


9,13-di-*cis*-RA

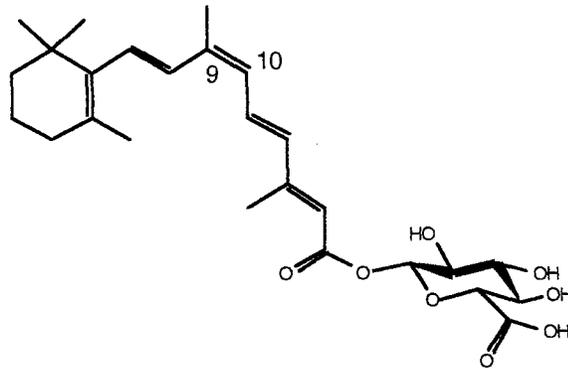
Otros metabolitos aislados en el plasma sanguíneo son el β -D-glucurónido de todo-*trans*-retinoilo (ATRAG), el β -D-glucurónido de 13-*cis*-retinoilo (13-*cis*-RAG) y el β -D-glucurónido de 9-*cis*-retinoilo (9-*cis*-RAG). Se supone que los glucurónidos son metabolitos de eliminación pero podrían participar en el mantenimiento de una concentración óptima de RA en el plasma.^{9,10}



β -D-glucurónido de todo-*trans*-retinoilo

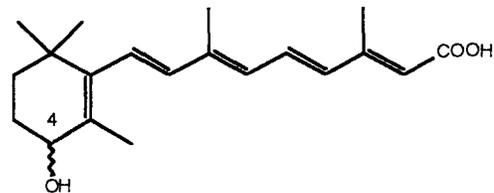


β -D-glucurónido de 13-*cis*-retinoilo

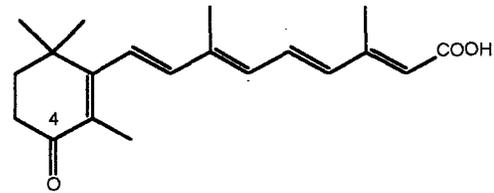


β -D-glucónido de 9-*cis*-retinoilo

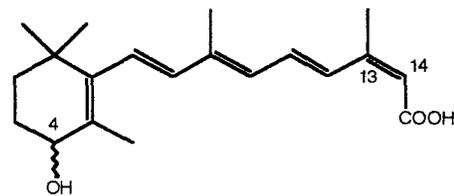
Al interactuar con las CRABP el ácido retinoico queda expuesto a la acción de los citocromos P450 en la mitocondria que lo degradan a metabolitos polares.¹⁰ De diferentes organismos se han aislado el ácido todo-*trans*-4-hidroxitretinoico (4-hidroxi-ATRA), el ácido todo-*trans*-4-oxoretinoico (4-oxo-ATRA),⁹ ácido 13-*cis*-4-oxoretinoico (4-oxo-13-*cis*-RA) y el ácido 13-*cis*-4-hidroxitretinoico. El 4-oxo-ATRA demostró poseer actividad regulatoria del crecimiento.¹¹



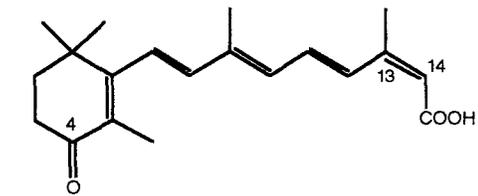
ácido todo-*trans*-4-hidroxitretinoico



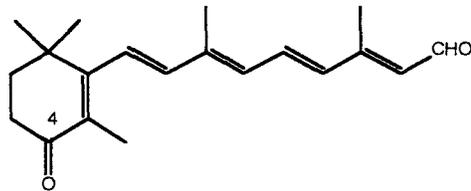
ácido todo-*trans*-4-oxoretinoico



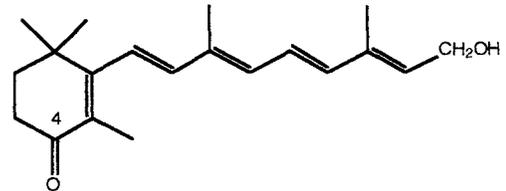
ácido-13-*cis*-4-hidroxitretinoico



ácido-13-*cis*-4-oxoretinoico

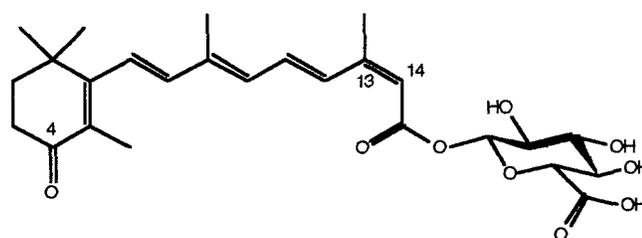


4-oxoretinal



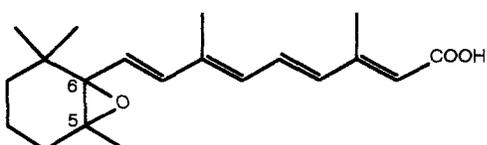
4-oxoretinol

El 4-oxoretinol y el 4-oxo-ATRA tienen funciones en el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis* (rana).^{12,13} El 4-oxo retinol induce la diferenciación *in vitro* de células de teratocarcinomas F9 embrionarias.¹³ Al inyectar en ratas 13-*cis*-RA marcado se aisló el glucurónido de 13-*cis*-4-oxoretinoilo.⁹

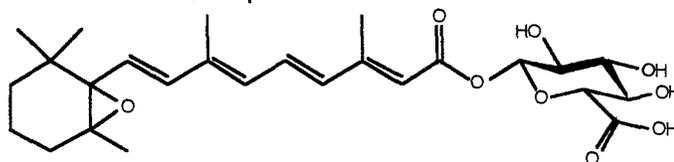


β -D-glucurónido de 13-*cis*-4-oxoretinoilo

El RA también se oxida en el organismo a ácido-5,6-epoxi-todo-*trans*-retinoico (5,6-epoxiATRA). Este metabolito y el glucurónido de 5,6-epoxiretinoilo son considerados como metabolitos de eliminación^{14,15}

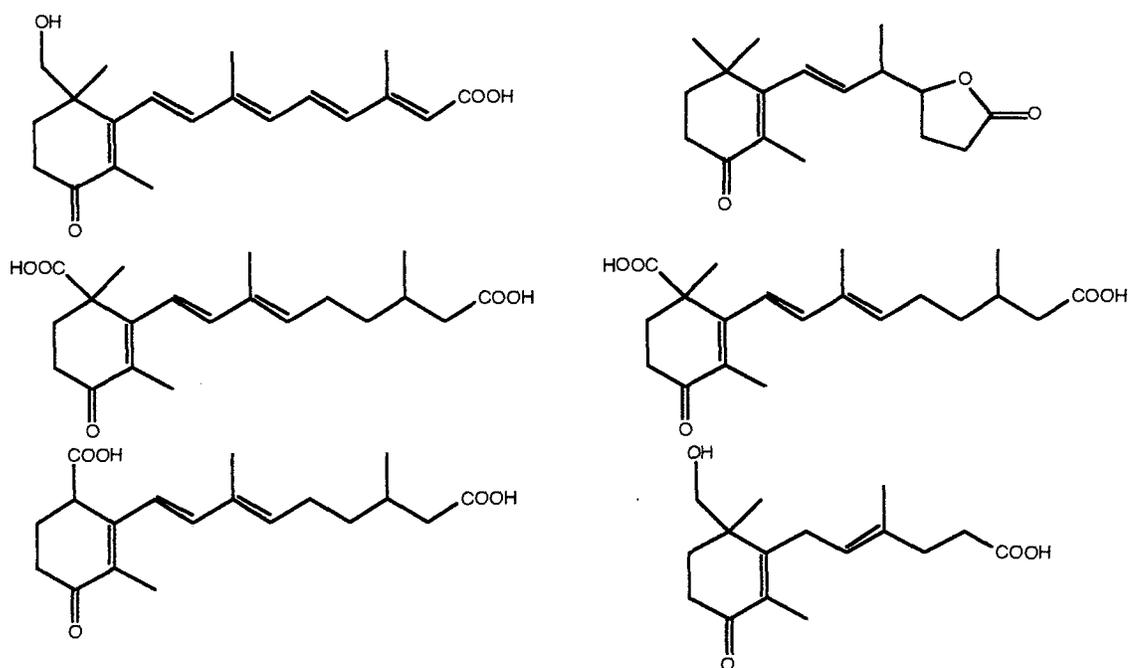


ácido-5,6-epoxi-todo-*trans*-retinoico

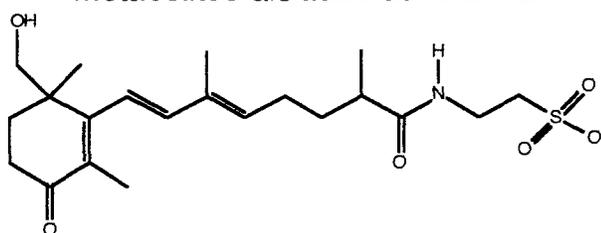


β -D-glucurónido de 5,6-epoxi-todo-*trans*-retinoilo

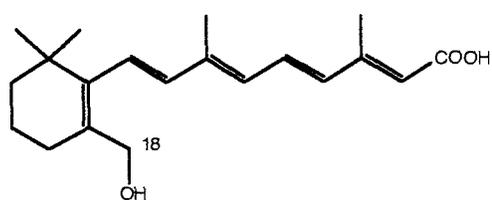
Otros metabolitos con diferentes grados de oxidación en los metilos unidos al carbono del ciclo han sido aislados de la orina, al igual que compuestos resultantes de la saturación o ruptura de la cadena poliénica.⁹ Además se han aislado de las heces la retinotaurina,¹⁶ el 18-hidroxi-ATRA y 18-hidroxi-9-*cis*-RA.⁹



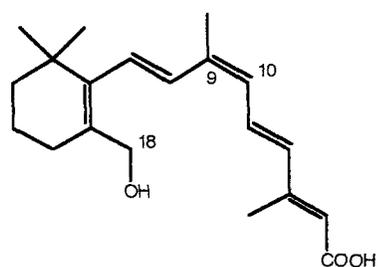
metabolitos aislados de la orina



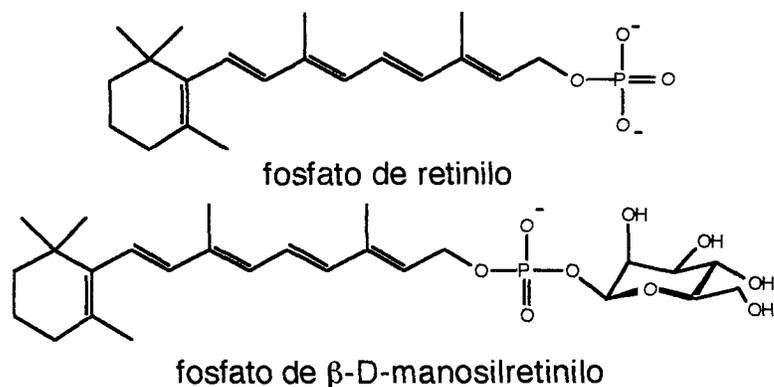
retinotaurina



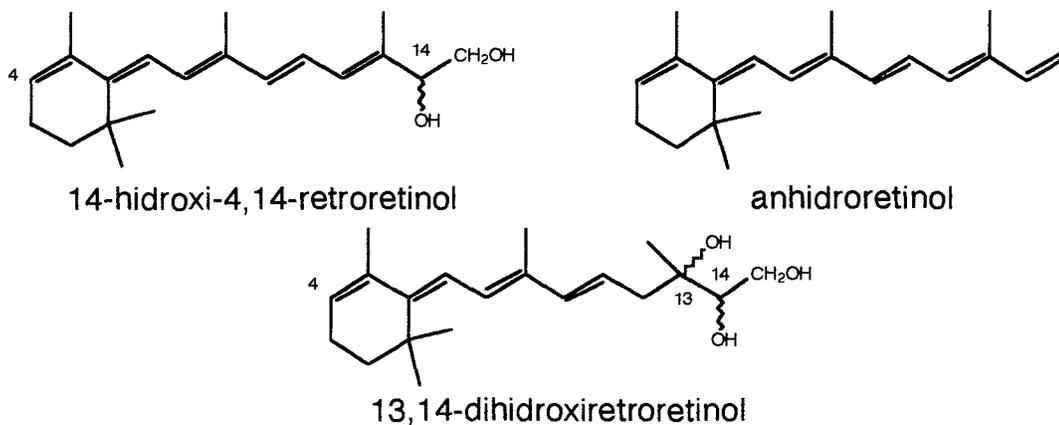
18-hidroxi-ATRA

18-hidroxi-9-*cis*-RA

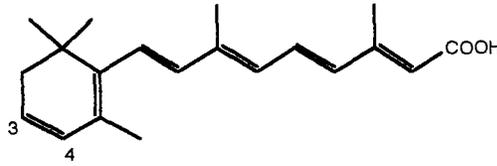
El fosfato de retinilo (RP) y el fosfato de β -D-manosilretinilo (MRP) están involucrados en la incorporación de azúcares en glicoconjugados y han sido aislados de células del intestino y del hígado de ratas.⁹



Se han aislado tres miembros de la familia de retroretinoides, que reciben ese nombre por la ubicación de sus dobles enlaces: el 14-hidroxi-4,14-retroretinol (14-HRR), el 13,14-dihidroxi-retroretinol (DHR) y anhidroretinol (AR). El 14-HRR y el DHR participan en la función inmune, interviniendo en la proliferación de los linfocitos B activados y en la activación de los linfocitos T.¹⁷ El AR bloquea de una manera reversible la proliferación de los linfocitos B y la activación de los linfocitos T, lo que lo convierte en un antagonista del 14-HRR y del DHR.¹⁸



En tejidos de mamíferos y de aves se ha aislado el ácido 3,4-dideshidro-todo-*trans*-retinoico (ddRA) y se encontró que presenta actividad biológica similar al ATRA.¹⁹



ácido 3,4-dideshidro-todo-*trans*-retinoico

1.5 Mecanismos de acción

1.5.1 Receptores nucleares

La comprensión de los mecanismos de acción del ácido retinoico dentro del núcleo se inició en 1987, cuando se descubrió el primer receptor nuclear del ácido retinoico (RAR).²⁰⁻²³

Los receptores del ácido retinoico son miembros de la superfamilia de los receptores nucleares, que son proteínas que actúan como factores de transcripción dependientes de ligandos. Regulan la expresión de genes enlazándose a fragmentos del ADN. Se han descubierto receptores nucleares para las hormonas esteroidales, la hormona tiroidea, vitamina D y los retinoides.²⁴

Los receptores se caracterizan por poseer varios fragmentos que cumplen diversas funciones. El dominio de unión al ADN (DBD, del inglés DNA binding domain) se une a secuencias conocidas como elementos de respuesta hormonal (HRE, hormone response element). El dominio de unión al ligando (LBD) posee la propiedad de reconocer un ligando específico.²⁴ Los dominios de transactivación (AF-1 y AF-2) permiten la interacción con otras proteínas del

complejo de transcripción. Los dominios de dimerización facilitan la formación de homodímeros y heterodímeros con otros receptores.²⁴

1.5.2 Receptores del ácido retinoico

En 1987 se identificó al ATRA como el ligando activador de un receptor miembro de la familia de receptores nucleares de la hormona tiroidea y de la vitamina D₃.^{20,21,22,23} A partir de ese momento se supo que los retinoides ejercen su acción en el núcleo a través de regulación transcripcional por medio de los receptores del ácido retinoico (RAR).

En 1990 se identificó un receptor "huérfano" que se denominó "receptor del retinoide X" (RXR), y en 1992 se descubrió que el ligando correspondiente es el 9-*cis*-RA.⁸ Los RAR son activados por ATRA y 9-*cis*-RA, mientras que los RXR son activados únicamente por 9-*cis*-RA.⁶

Los RAR son codificados por tres genes distintos presentes en cromosomas diferentes generando tres subtipos (RAR α , RAR β y RAR γ).²⁶ Cada uno de ellos puede tener diferentes isoformas dependiendo de los promotores activados durante la transcripción, lectura diferenciada de los exones o distintas secuencias de inicio de la traducción. Las isoformas, en general, presentan diferencias en las regiones del grupo amino terminal. Se han identificado dos estructuras para el subtipo α (RAR α 1 y RAR α 2), cuatro para el β (RAR β 1 al RAR β 4) y dos para el γ (RAR γ 1 y RAR γ 2).⁶

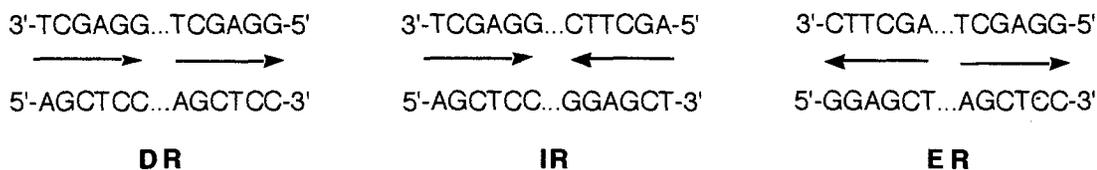
Al igual que el RAR, en el RXR existen tres subtipos: RXRa, RXRb y RXR γ . Solo se han identificado isoformas para el RXR γ de ratón, (RXR γ 1 y RXR γ 2).^{6,27}

Los RAR y RXR modulan la acción de los retinoides en el núcleo por la interacción de homodímeros (RXR-RXR) o heterodímeros (RAR-RXR) con

elementos de respuesta específicos en el ADN. Como parte del complejo de transcripción, los dímeros interactúan directamente con el ADN uniéndose a los HRE del ácido retinoico (RARE) o del retinoide X (RXRE).^{6,28,29,30}

Los RXR también pueden formar dímeros con otros receptores que interactúan con otras hormonas o vitaminas, como el de la vitamina D₃ (VDR), el receptor de la hormona tiroidea (TR) u otros receptores huérfanos (de los que no se conoce aún un ligando específico).^{6,25,31,32} Otra actividad importante es la que presentan los RAR y RXR como represores de la transcripción de ciertos genes al interactuar con otras proteínas reguladoras de la transcripción como el AP-1.⁶ Los HRE están situados en la región promotora lejana del gen. Estos contienen secuencias consenso de bases que interactúan con el dominio de unión al ADN (DBD, del inglés DNA binding domain).

Los elementos de respuesta de los receptores de estrógeno, T₃, la vitamina D₃, el ATRA, el 9-*cis*-RA y varios receptores huérfanos comparten dos secuencias (medio-sitios) en forma de repeticiones directas (DR), repeticiones invertidas (IR) o repeticiones de adentro hacia afuera (ER) de secuencias similares al consenso (AGGTCA) separadas por una secuencia pequeña de bases (espaciamiento entre medio-sitios)⁶:



Una parte de la proteína, conocida como "dedos de zinc" participa en el reconocimiento de los HRE en el ADN. Cada uno de los dos "dedos de zinc" tiene una función específica. El primero es responsable del reconocimiento de

las secuencias de los medios sitios mientras que el segundo participa discriminando según el espaciamiento entre ellos.⁶

Los receptores de la hormona T₃, el RAR y el RXR tienen un alto grado de similitud en sus dominios de unión al ADN, por lo que pueden interactuar con HRE comunes y efectuar una regulación doble de genes.⁶ La similitud de los DBD permite que diferentes homodímeros y heterodímeros puedan interactuar con las regiones promotoras de varios genes, posibilitando la regulación por dos hormonas distintas.

Se han caracterizado varios RARE y RXRE en muchas configuraciones. La mayoría de los RARE presentan la configuración DR-5 (ver tabla 1), con la secuencia consenso AGGTCA separada en repetición directa por cinco pares de bases: AGGTCA/5bp/AGGTCA. Además existen RARE con configuraciones DR-2, DR-3 y DR-4. En los RXRE identificados hasta el momento se encuentra principalmente la configuración DR-1. Se han encontrado HRE palindrómicos, constituidos por repeticiones invertidas (IR-1, IR-3) y repeticiones de adentro hacia afuera (ER-8).²⁵

Tabla 1: Secuencias de RARE⁶

tipo	gen	secuencia
DR-5	hRAR β 2	5'-AGGTCAC <u>CCGAA</u> AGGTCA-3'
DR-2	mCRABP-II	5'-AGGTCAC <u>C</u> AGGTCA-3'
DR-1	mCRABP-II	5'-AGGGCAG <u>A</u> AGGGCA-3'
ER-8	hMCAD	5'-TGACCTTTCTCCCTGGTCA-3'

La especificidad y la potencia transcripcional relativa de los RARE dependen tanto del tamaño como de la secuencia de nucleótidos. La secuencia más común (DR-5) ha demostrado ser más potente que DR-2 y ER-8. Además los

HRE que contienen las secuencias AGGTCA o GGGTCA son más potentes que los que presentan secuencias que se alejan del consenso.⁶ Las secuencias DR-5 tienen una respuesta selectiva hacia RAR, mientras que las DR-2, IR-1 y ER-8 presentan respuesta hacia RAR y TR. Los DR-1 responden a varios receptores huérfanos además de los RXR.⁶

Un factor muy importante es la presencia de RARE y RXRE en varios genes que participan en varios pasos del metabolismo de los retinoides. Los genes de los tres RAR contienen RARE en una de sus dos regiones promotoras, generando un posible mecanismo de autoamplificación. Además CRBP-I y la alcohol deshidrogenasa ADH3 son activadas por ATRA y CRBP-II, y contienen RXRE y RARE en sus regiones promotoras⁶

Se ha demostrado que el RAR, el receptor de la hormona tiroidea (TR), el de la vitamina D (VDR), el receptor del activador del proliferador de peroxisomas (PPAR) y varios receptores huérfanos, deben formar dímeros con RXR para enlazarse a los respectivos HRE.³³

La configuración del HRE es muy importante porque actúa como discriminador de la especificidad de los heterodímeros. El RXR actúa formando homodímeros y se enlaza a HRE que contienen DR-1, al igual que los heterodímeros RXR-PPAR. El RAR-RXR actúa preferentemente a través de DR-2 y DR-5, mientras que los VDR y los TR lo hacen a través de DR-3 y DR-4 respectivamente.³³

La presencia de RXR en el dímero es necesaria para la formación de enlaces de alta afinidad entre los receptores RAR, TR y VDR. La actividad inducida por homodímeros RXR se pierde cuando está enlazado a otros receptores. En ciertas células la presencia de dímeros RAR/RXR que se unen a DR-1 reprime la actividad del homodímero RXR/RXR.²⁵

La formación de heterodímeros RXR/TR y RXR/RAR provoca que el RXR pierda su capacidad de enlazarse al 9-*cis*-RA, por lo que se dice que actúa como un "compañero silencioso". Sin embargo hay varios casos en los que se ha encontrado que el RXR es un "compañero activo", como el PPAR/RXR en el que los dos receptores responden independientemente y se activan sinérgicamente en presencia de los dos ligandos. RXR conserva su respuesta a 9-*cis*-RA con el receptor del farnesoide X (FXR) y con el receptor huérfano LXR.²⁵

No se ha elucidado el mecanismo mediante el cual los RAR y RXR activan la transcripción. La interacción ligando-receptor debe producir un cambio conformacional en la proteína que expone los dominios de interacción con otros miembros del complejo de transcripción.

Otro caso importante de acción del RXR se presenta al interactuar con el receptor huérfano NGFI-B, que actuando como monómero se enlaza al ADN e induce la apoptosis (muerte celular programada) de las células T. El dímero RXR/NGFI-B responde al 9-*cis*-RA.²⁵

El gran número de procesos fisiológicos afectados por el RA sugiere que cada una de las isoformas de los RAR y RXR tienen una función específica. Se han establecido los patrones de distribución de las isoformas en los diferentes tejidos y etapas de desarrollo del organismo. Aunque casi todos los tejidos son susceptibles a la acción del RA en el organismo, hay distintos homodímeros de RXR y heterodímeros RAR/RXR que modulan la acción de los retinoides en cada tejido.⁶

La administración de retinoides puede provocar efectos teratogénicos durante el desarrollo embrionario de los mamíferos y generar anomalías en las extremidades y el cráneo, defectos en el corazón y deformidades en el tubo

neuronal. Este efecto debe ser causado por la activación anormal de genes que responden a RAR y RXR.⁶

1.6 Receptores del ácido retinoico y enfermedades humanas

Existen varias evidencias de la relación entre mutaciones que implican genes que codifican RAR y ciertas enfermedades humanas. En primer lugar, se ha encontrado que el gen RAR β es el sitio de integración del virus de la hepatitis B en un carcinoma hepatocelular humano.^{6,29} Además células de algunos cánceres del pulmón no contienen una parte del cromosoma 3p en el que está presente el gen RAR β . Por otro lado, la activación de RAR β en células pequeñas epidermoides cancerosas presentó actividad antitumoral.⁶

La prueba definitiva de que la interrupción de los mecanismos que involucran a RAR puede conducir a carcinogénesis fue aportada por el descubrimiento de que la translocación [t(15:17)] en la leucemia aguda promielocítica (APL) se produce en la secuencia del gen RAR α . El resultado es la obtención de proteínas quiméricas que contienen fragmentos de RAR α y de otra proteína que presentan propiedades transcripcionales alteradas y conducen a la generación de las células leucémicas no diferenciadas.^{3,34}

Las células APL responden a la acción de ATRA, experimentando diferenciación y luego apoptosis. Se han hecho estudios en los que pacientes con APL han sido tratados con ATRA y se ha logrado un alto índice de remisión. Sin embargo, la mayoría de los pacientes han recaído en menos de un año.³⁴

Otras complicaciones, como disminución de las cantidades de ATRA en el plasma por la estimulación del metabolismo y los efectos secundarios serios

debidos a la toxicidad han hecho necesaria la búsqueda de alternativas para el tratamiento.³⁵

Se ha experimentado combinaciones de ATRA con Idarubicina, otro agente inductor de remisión, obteniendo mejores resultados clínicos.³⁶ A diferencia de ATRA, el 9-*cis*-RA no induce la activación de su propio catabolismo por lo que es efectivo cuando se tratan pacientes que no han sido expuestos previamente a retinoides.^{4,37} Por este motivo administración de 9-*cis*-RA a pacientes previamente tratados con ATRA no logró inducir la remisión.⁴

Los retinoides han demostrado limitar el crecimiento de células malignas, retardar la progresión de ciertos tumores y bloquear la acción de promotores de tumores debido a la acción antagonista que ejercen los RAR contra el factor de transcripción AP-1.

El dímero AP-1 está compuesto por las proteínas *c-jun* y *c-fos*, que son producto de la activación de protooncogenes por factores de crecimiento o ésteres de forbol promotores de tumores.¹

Se han encontrado dos mecanismos por medio de los cuales los RAR ejercen su acción anti-AP-1. En el gen humano osteocalcina, esta presente un promotor compuesto HRE/AP-1 que puede ser bloqueado por RAR impidiendo que sea activado por su receptor. La regulación negativa de los genes colagenasa y estromelina, sobreexpresados en células transformadas por TPA (10-tetradecanoilforbol-13-acetato, un éster de forbol), se debe a la formación de complejos entre RAR y *c-jun* que inhabilitan el complejo de transcripción.^{1,6}

Se ha documentado además la regulación negativa de AP-1 inducida por retinoides de genes *c-fos*, TGF- β 1, papilomavirus humano (HPV)-18 y transglutaminasa I (TGase-I).¹

Un ejemplo muy importante es la represión de IL-6, un gen inducible por TPA que actúa como mitógeno en células del sarcoma de Kaposi (KS) y está sobreexpresado en las células de artritis reumatoide y psoriasis. La sobreexpresión de estromelina, colagenasa y metaloproteinasas puede contribuir a la patogénesis de la artritis reumatoide y a la metástasis de tumores. La acción antagónica a la expresión de genes dependientes de AP-1 puede ser uno de los mecanismos para la acción terapéutica del RA en la piel dañada por la luz, la displasia cervical inducida por HPV, la psoriasis, el acné y la artritis reumatoide.¹

Los retinoides alteran los patrones de expresión genética culminando en alteraciones del crecimiento celular, la diferenciación y la muerte celular programada (apoptosis).¹

Los efectos que causan los retinoides endógenos o sintéticos pueden ser utilizados en tejidos malignos o premalignos y de esa manera controlar comportamientos celulares anormales como cáncer o problemas dermatológicos. Los efectos antiproliferativos de los retinoides son útiles en el tratamiento de cánceres de crecimiento rápido como leucemias y melanomas o en cánceres del epitelio escamoso. Las células cancerosas muestran anomalías en la diferenciación y retienen características primitivas de crecimiento rápido, conduciendo a una acumulación de células malignas.¹

La muerte celular programada, es una función importante regulada por los retinoides, que le permite al organismo renovar constantemente las células. La apoptosis es una secuencia de eventos, activada a nivel de expresión genética, que culminan en la muerte celular.¹ En contraste a la necrosis, las células se hinchan, la cromatina se floclula y se presenta una rápida pérdida de integridad en la membrana que produce la lisis.³⁵

En las células leucémicas HL-60 (leucemia aguda mielocítica) se puede inducir la diferenciación y apoptosis mediante tratamiento con retinoides.³⁸

La capacidad de los retinoides de regular el crecimiento, la diferenciación y la muerte programada de las células, así como su participación en la modulación de la respuesta inmune ha permitido su utilización en el tratamiento del acné, de lesiones relacionadas con la luz, neoplasias cutáneas, psoriasis, desordenes de queratinización, inflamación y varios cánceres.³⁹

Para el tratamiento de cánceres los retinoides pueden ser empleados como agentes quimioterapéuticos y quimiopreventivos. A diferencia de los compuestos quimioterapéuticos tradicionales, que implican mecanismos citotóxicos que afectan tanto a células saludables como anormales, los retinoides ejercen su acción estimulando procesos naturales que implican un menor número de efectos secundarios.¹

Los retinoides se han utilizado a nivel dermatológico para el tratamiento de desordenes malignos y no malignos de la piel. Varias formas de acné, que se produce por queratinización anormal de los folículos pilosos, han respondido al ATRA y a 13-*cis*-RA.¹

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria de la piel en la que se presenta hiperproliferación de la epidermis e infiltración de células de la función inmune. Eretrinate, solo o en combinación, ha mostrado ser efectivo para el tratamiento de esta enfermedad.¹

La exposición a radiación ultravioleta produce piel áspera, arrugada, hiperpigmentada y atrofiada, debido a la hipertrofia del tejido elástico y la disminución del colágeno de tipo I. La administración de ATRA genera una mejoría en la apariencia general y la desaparición de las arrugas y la hiperpigmentación.¹

ATRA ha resultado efectivo en casos de hiperpigmentación facial (melasma)⁴⁰ y de piel hiperpigmentada a causa del acné, foliculitis, eczema e irritación al afeitarse.¹

La administración de ATRA también se ha utilizado con éxito para el tratamiento la enfermedad de Darier, ictiosis, queratosis palmoplantar, pitiriasis rubra pilaris y dermatosis cutáneas. 13-*cis*-RA también ha sido efectivo en enfermedades relacionadas con desordenes de queratinización, la enfermedad de Darier e ictiosis.¹

Se han logrado buenos resultados utilizando 13-*cis*-RA en el tratamiento de pacientes con estados avanzados de carcinoma de las células escamosas (SCC). Los resultados mejoraron notablemente cuando se combinó el tratamiento con α -interferon (α -IFN), debido al efecto sinérgico en las propiedades antiproliferativas y diferenciativas de los dos agentes.¹

Al igual que SCC, el carcinoma de las células basales (BCC) responde al tratamiento combinado de 13-*cis*-RA y α -IFN. La micosis fungoide, un linfoma cutáneo de las células T que se propaga a los nodos linfáticos y a los órganos viscerales, ha sido clínicamente tratado con 13-*cis*-RA, Eretrinate y otros retinoides sintéticos. En este caso también se obtuvo una respuesta aumentada al combinar los retinoides con α -IFN.¹

El sarcoma de Kaposi es el tumor más comúnmente asociado a la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV). Se desarrolla predominantemente en la piel, pero puede existir desarrollo visceral. ATRA, Acitretin®, Eretrinate han sido usados efectivamente para su tratamiento.¹

Los resultados obtenidos hasta el momento con retinoides en el tratamiento y prevención de cánceres y problemas dermatológicos son prometedores. Sin embargo, las altas dosis requeridas para que sean eficaces y

los efectos secundarios generados por los tratamientos prolongados limitan su uso en la actualidad. Los efectos secundarios debidos a la hipervitaminosis incluyen toxicidad en el hígado, anormalidades en la estructura ósea, reacciones mucocutáneas, ceguera nocturna, teratogénesis y mal funcionamiento sináptico. Producen dolor de cabeza, irritación de la piel, resequedad en la boca, depresión y letargia. Además, están contraindicados en mujeres en edad fértil debido a sus efectos teratogénicos.¹

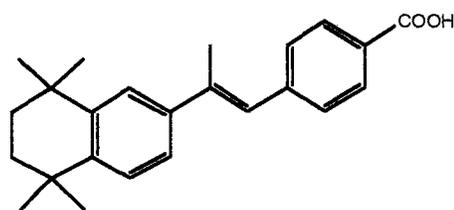
Los efectos secundarios de los retinoides deben estar asociados a la activación indiscriminada de los diferentes procesos celulares en los que están involucrados. La existencia de seis subtipos de receptores puede sugerir que cada uno de ellos está involucrado en procesos fisiológicos distintos y que el desarrollo de retinoides selectivos para cada receptor puede generar mayor especificidad y posiblemente menos efectos secundarios.

Se requieren además retinoides que sean selectivos en las respuestas biológicas que producen para disminuir sus efectos secundarios. Compuestos que activen los mecanismos de represión de AP-1 y no lo hagan con la transcripción podrían detener la proliferación de células cancerosas sin presentar teratogenicidad ni toxicidad.¹

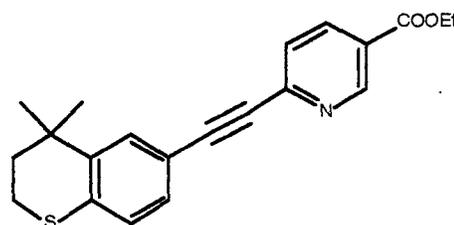
1.7 Retinoides sintéticos

En las últimas dos décadas se han preparado miles de retinoides análogos de ATRA con el objeto de establecer relaciones estructura/actividad (SAR) que permitan la obtención de compuestos con mejores índices terapéuticos. El descubrimiento en 1992 de la importancia del 9-*cis*-RA, marcó el inicio de la preparación de los análogos sintéticos de este isómero.

Los arotinoides son retinoides que poseen por lo menos un anillo aromático, como TTNPB. Los heteroarotinoides, como Tazarotene[®], presentan un anillo aromático y un heteroátomo (S, O, N) formando parte del ciclo parcialmente saturado.³⁹ La introducción de diferentes grupos funcionales inducen cambios conformacionales que afectan la interacción de los compuestos con los receptores, modifican su reactividad ante procesos degradativos o isomerizaciones, que resultan en variaciones en su estabilidad, actividad, toxicidad y propiedades farmaco-cinéticas.



TTNPB

Tazarotene[®]

Los ligandos interactúan con diferentes grados de afinidad con los receptores e inducen diferentes cambios conformacionales en las proteínas, particularmente la del dominio de unión al ligando (LBD) y a los subdominios que contiene, como el de dimerización y el de activación. Los retinoides con diferentes características estructurales y funcionales deben afectar en distintas formas a los receptores e inactivar o activar estos diferentes subdominios, generando selectividad en las respuestas biológicas.

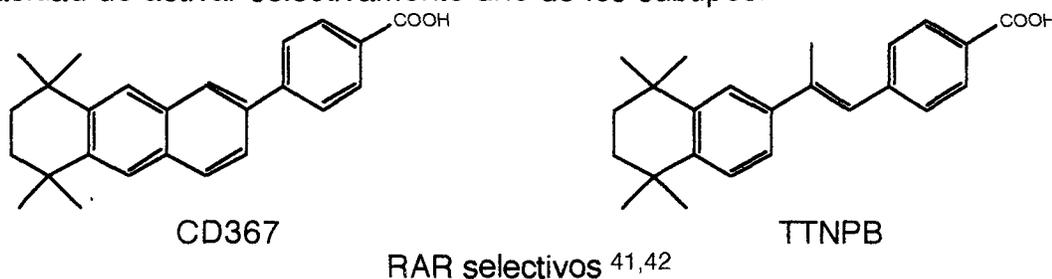
La actividad de los retinoides es evaluada inicialmente mediante ensayos en los que se mide la afinidad por receptores recombinantes al desplazar compuestos patrón (ATRA o 9-*cis*-RA marcados con ³H). Son

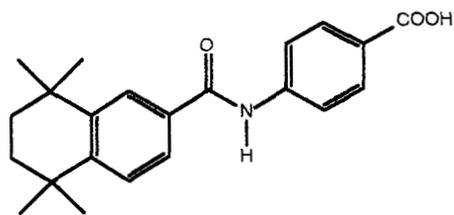
analizados por separado con cada uno de los seis subtipos, y se determinan constantes de inhibición.

Los ensayos de transactivación miden la capacidad de los retinoides de activar la transcripción a través de los RARE. Para ello son utilizadas líneas celulares transformadas en la que se ha insertado un plásmido que contiene uno de los seis receptores nucleares, una región promotora y el gen de una enzima cuantificable. Usualmente se emplean genes de CAT (cloranfenicol acil transferasa) o luciferasa. La presencia de los retinoides induce la expresión del gen y la enzima producida se cuantifica. Son efectuados ensayos diferentes para los seis receptores nucleares y los resultados se comparan con los obtenidos para ATRA y 9-cis-RA.

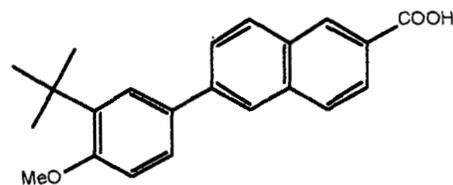
La información obtenida de los ensayos de afinidad ha permitido seleccionar compuestos con alta afinidad por los receptores y correlacionar los datos obtenidos con los resultados de los ensayos de activación. Los compuestos que presentan afinidad por un receptor y producen la activación de la transcripción se denominan agonistas. Los retinoides afines a los receptores que no activan la transcripción se denominan antagonistas, porque compiten con los agonistas por los LBD y neutralizan su efecto.

Hasta el momento se han alcanzado más avances en la obtención de retinoides con selectividad por los RAR. Se han obtenido compuestos con actividad por los tres receptores RAR al mismo tiempo y otros que tienen la capacidad de activar selectivamente uno de los subtipos:

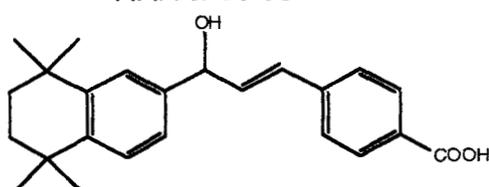




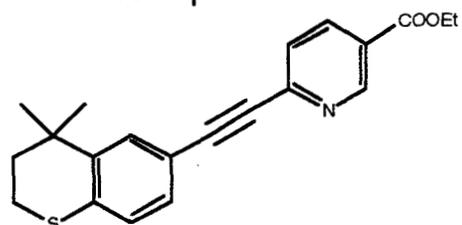
AM580
RAR α selectivo⁴³



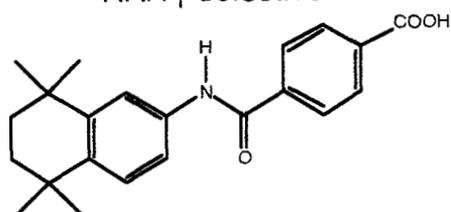
CD417
RAR β selectivo⁴⁴



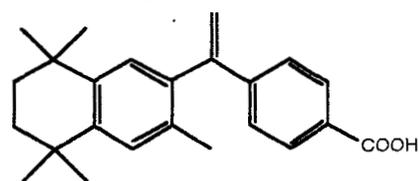
CD666
RAR γ selectivo⁴³



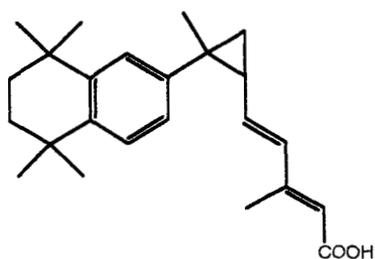
AGN190168 (Tazarotene[®])
RAR β, γ selectivo⁴⁵



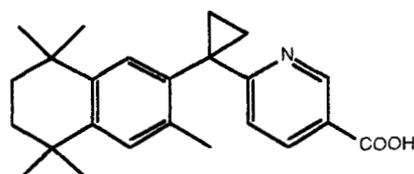
AM80
RAR α, β selectivo⁴²



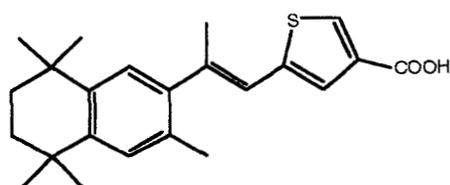
LGD1069
RXR α, β, γ selectivo⁴²



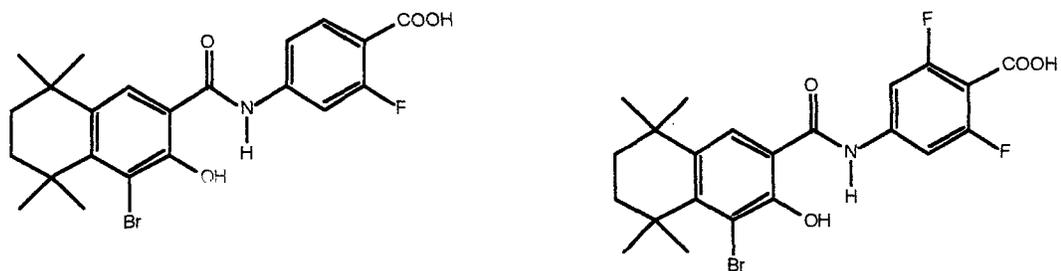
RXR α, β, γ selectivo⁴⁶



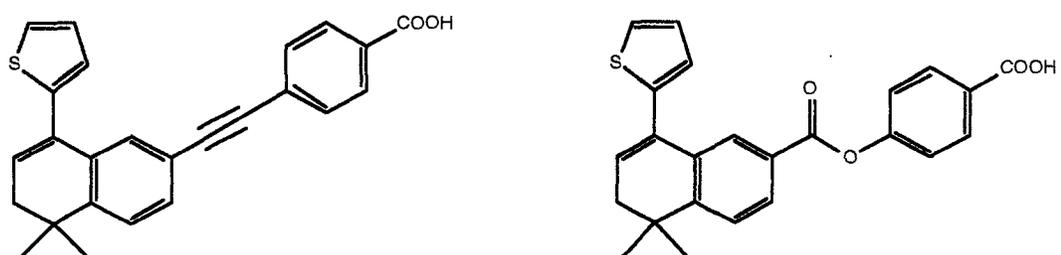
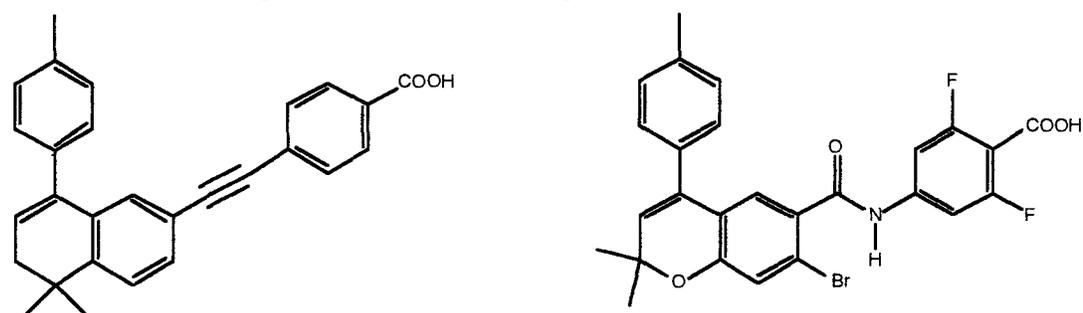
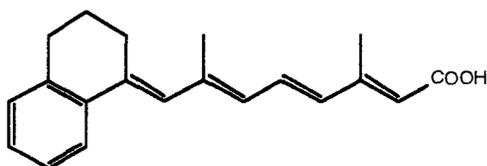
LGD100268
RXR α, β, γ selectivo⁴⁶



RXR α, β, γ selectivo³⁸

Específicos RAR α ⁴⁷

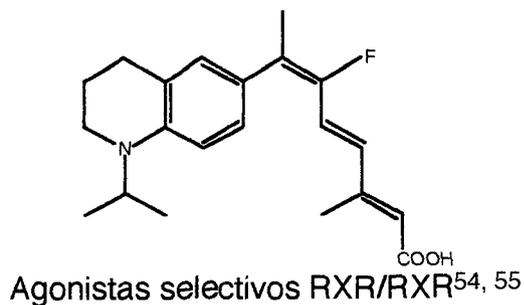
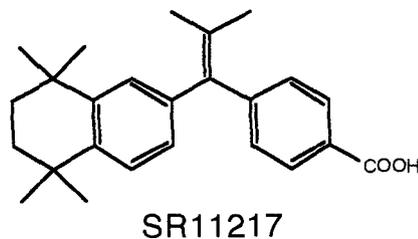
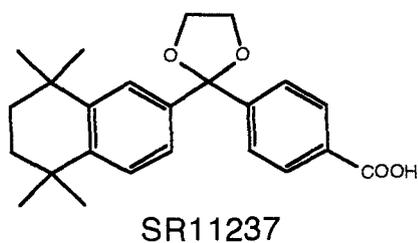
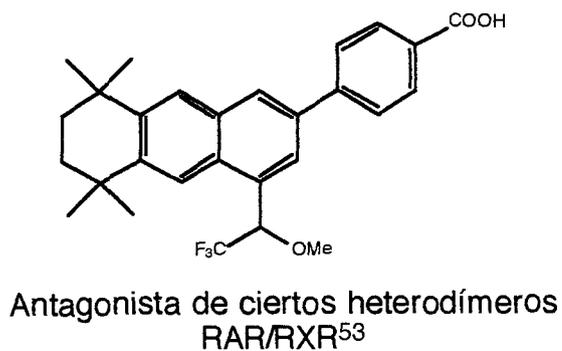
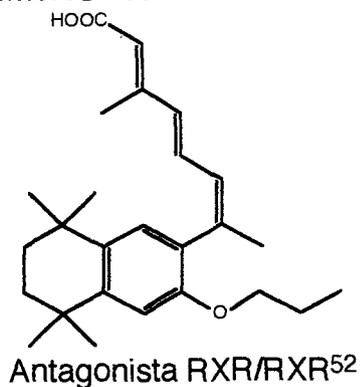
Otro grupo de compuestos importantes son los que presentan actividad como antagonistas selectivos de los diferentes receptores nucleares:

Agonistas RAR β , antagonistas RAR α, γ ⁴⁸Antagonista RAR α, β, γ ⁴⁹Antagonista RAR α ⁵⁰

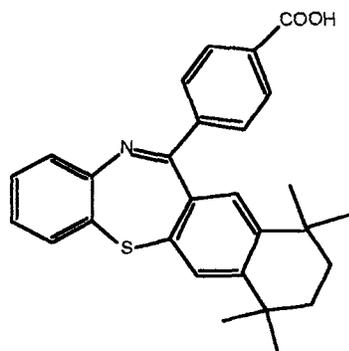
AT-UAB30

agonista RAR β, γ , antagonista RAR α ⁵¹

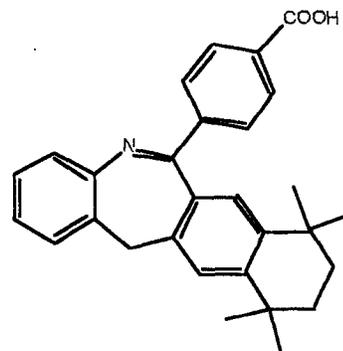
Se han descubierto también compuestos que actúan como antagonistas de los homodímeros RXR/RXR o de los heterodímeros RXR/RAR y compuestos que son agonistas de los homodímeros RXR/RXR pero no activan los heterodímeros RXR/RAR:



Un grupo interesante de retinoides lo componen HX630 y HX640, que son inactivos cuando están solos, pero se enlazan al RXR de un heterodímero RXR/RAR en presencia de un ligando RAR agonista y producen un efecto sinérgico en la inducción de la diferenciación celular:⁵⁶

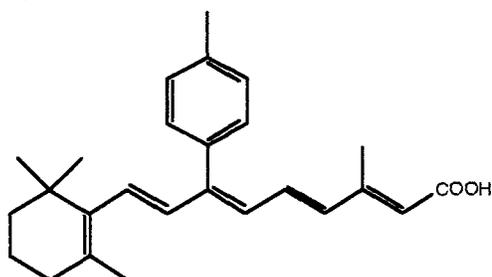


HX630

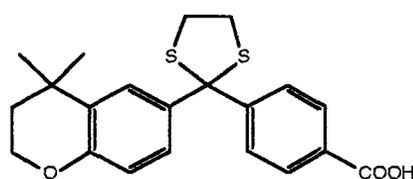


HX640

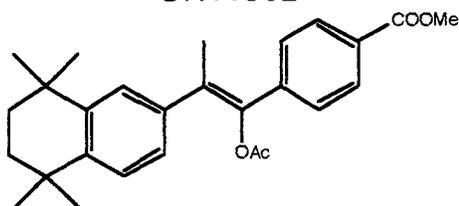
Los retinoides SR11238, SR11220 y SR11302 presentan actividad anti-AP-1 pero no tienen efecto en la inducción de diferenciación en diferentes tipos de célula. SR11235 induce diferenciación y presenta poca actividad anti AP-1. Estas observaciones sugieren que se pueden obtener retinoides que ejercen su influencia selectivamente en los dos mecanismos que involucran la acción de los receptores nucleares.⁵⁷⁻⁵⁹



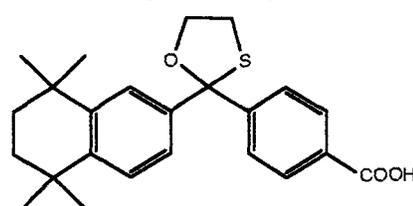
SR11302



SR11238



SR11220



SR11235

1.8 Evaluación de la actividad biológica de los retinoides

Existen bioensayos que evalúan el potencial terapéutico de los retinoides al medir la capacidad de promover la diferenciación de células cancerosas *in vitro*. Algunos retinoides como AM80, AM580, CH55 son capaces de inducir la diferenciación de células leucémicas HL-60.⁶⁰

La combinación de retinoides RAR y RXR selectivos dio como resultado en un aumento sinérgico en la muerte por apoptosis de células. Aquellos experimentos que combinaron TTNPB (RAR selectivo) con LGD100269 y SR11237 (RXR selectivos) en células leucémicas HL-60⁶¹⁻⁶² o AM80 (RAR selectivo) con AGN191701 (RXR selectivo) en células de carcinoma embrional,⁶³ parecen indicar que es necesaria la diferenciación inducida por RAR α para que la apoptosis mediada por RXR se produzca.⁶³ Un estudio posterior con células HL-60 comprobó que es necesaria la selectividad RAR α para la inducción de diferenciación previa a la apoptosis.⁶⁴

La diferenciación de células de carcinoma embrional P19 o F9 también es inducida sinérgicamente mediante combinaciones de AM80 o CD666 (RAR selectivos) con SR11237 (RXR selectivo).⁶⁵

Varios tipos de células epiteliales cervicales pierden la capacidad de proliferar normalmente debido a la acción del papilomavirus humano (HPV). La hiperproliferación de estas células cancerosas es controlada con ligandos RAR selectivos y no con ligandos RXR selectivos.⁶⁶ La combinación de los dos tipos de retinoides selectivos aumentó la eficacia de una manera sinérgica. Además se obtuvo un aumento significativo en la actividad al utilizar combinaciones con α -interferon.⁶⁷

También se han empleado retinoides RAR β/γ selectivos y anti AP-1 en combinación con α -Interferon para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama.⁶⁸ Además se ha reportado que compuestos con alta selectividad RAR γ inhiben el crecimiento de células de melanoma.⁶⁹

Existen dos ejemplos que demuestran los efectos *in vitro* de los retinoides en procesos regulados por heterodímeros con RXR. El empleo combinado de retinoides y análogos de vitamina D3 ha permitido obtener un efecto permanente y sinérgico en la promoción de diferenciación y apoptosis de células leucémicas HL-60 que no responden al uso exclusivo de ATRA.^{70,71}

Por otro lado, la activación del heterodímero RXR/PPAR γ con retinoides RXR selectivos y agonistas PPAR γ permitió la disminución de hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia en ratones diabéticos.⁷²

Existen varios bioensayos diseñados para evaluar el potencial terapéutico de los retinoides en enfermedades de la piel. Los efectos antiproliferativos son evaluados mediante la inhibición de expresión de la ornitina-decarboxilasa (ODC) en hiperplasia inducida por ésteres de forbol. La utilización de ensayos *in vitro* con queratinocitos transformados permiten evaluar directamente el efecto de los retinoides en células de la piel. Se evalúa la presencia de transglutaminasa (Tgase I) que es una enzima característica de corneocitos, que son queratinocitos terminalmente diferenciados.²

A diferencia de la piel psoriática, la piel normal contiene corneocitos sin núcleo. En la cola de los ratones se presentan alternadamente corneocitos con y sin núcleos. De esta forma, se puede evaluar la actividad anti-psoriática de los retinoides por su capacidad de inducir la diferenciación de los corneocitos con núcleo.²

El acné se produce por hiperproliferación de los corneocitos dentro de los folículos pilosos que produce obstrucción y acumulación de grasa generando comedones (puntos negros). Los ratones "rhino" son una variante mutante que pierde el pelo y sufren acumulación de queratina dentro de los folículos, generando lesiones similares a la del acné. La aplicación de retinoides a los ratones "rhino" produce reducción del tamaño de las lesiones, lo que permite evaluar su actividad comedolítica y su potencial uso como agentes contra acné.²

1.9 Retinoides en ensayos clínicos

La información obtenida a través de los bioensayos disponibles ha permitido seleccionar nuevos retinoides selectivos para etapas de desarrollo clínica y preclínica. Drogas como Adapalene® y Tazarotene® fueron aprobados recientemente para su comercialización.⁷³

Adapalene® es un retinoide RAR β,γ selectivo que demostró poseer actividad anti-acné, anti-psoriática y anti-inflamatoria.^{2,74} Su actividad comedolítica fue confirmada en el bioensayo con ratones rhino² y al evaluarlo en ensayos clínicos demostró tener actividad comparable a ATRA con una disminución significativa en la magnitud de los efectos secundarios. En 1996 fue aprobado por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos) para su uso como agente anti-acné.⁷³

Tazarotene® es un retinoide RAR β,γ selectivo que fue aprobado por la FDA en 1997 para su uso contra psoriasis y acné. En estudios clínicos se demostró su efectividad, se encontró que provoca menos efectos secundarios que ATRA o 13-*cis*-RA y además que es eliminado rápidamente por el organismo.^{1,75}

9-*cis*-RA está siendo evaluado clínicamente para el tratamiento de SCC, linfomas y sarcoma de Kaposi. Como se mencionó anteriormente, este compuesto induce la remisión en pacientes con APL y no estimula su propio catabolismo, como lo hace ATRA.¹

El LGD1069 es un retinoide RXR selectivo que induce la apoptosis de células cuando se administra con retinoides RAR selectivos. Se han obtenido resultados prometedores en ensayos de SCC de cabeza y cuello. Actualmente está en evaluación en fase clínica para el tratamiento de cánceres entre los que se encuentran SCC y el sarcoma de Kaposi. No se notan efectos secundarios significativos en los pacientes tratados y a diferencia de los compuestos RAR selectivos LGD1069 no produce cambios en los niveles de triglicéridos, colesterol y lípidos de alta densidad.¹

Acitretin[®], la forma ácida de Etreinate[®] fue aprobada para su uso en pacientes con formas severas de psoriasis. También, se ha evaluado para el tratamiento de desordenes de queratinización, lupus eritematoso cutáneo y el síndrome de Papillon-Lefevre. Ha demostrado tener eficacia y toxicidad similares a Etreinate[®] para el tratamiento de psoriasis y la enfermedad de Darier. Se ha evaluado clínicamente para su uso en el tratamiento de pacientes con sarcoma de Kaposi, aunque presenta los efectos secundarios típicos de los retinoides.¹

El AM80, RAR α,β selectivo, es evaluado en Japón para el tratamiento de varios desordenes dermatológicos, cánceres y poliartritis primaria crónica. También demostró poseer actividad antiangiogénica por lo que puede tener utilidad para desordenes dependientes de angiogénesis como tumores sólidos, psoriasis, artritis reumatoide y retinopatía diabética.¹

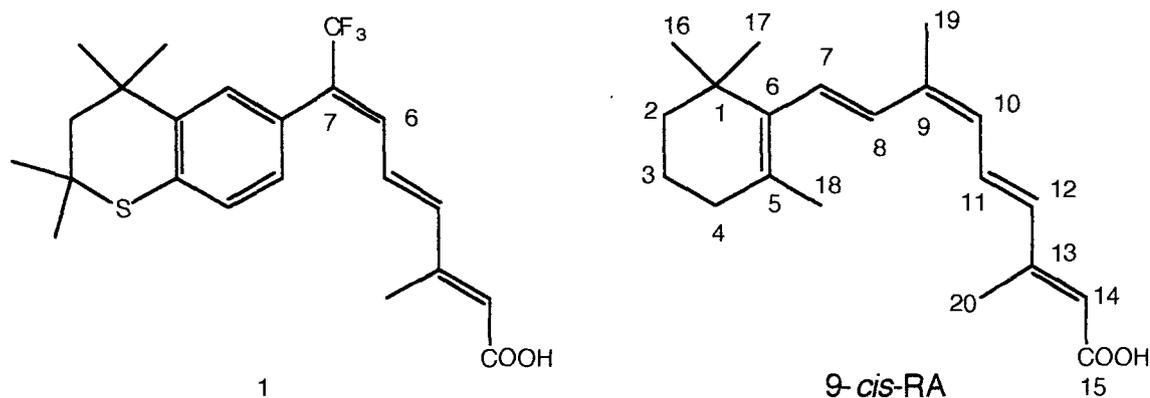
El ATRA encapsulado en liposomas se ha empleado en ensayos clínicos para el tratamiento de sarcoma de Kaposi y APL. En ensayos *in vitro* esta formulación ejerció los mismos efectos antiproliferativos que ATRA¹ y en estudios preclínicos se obtuvo menores índices de toxicidad y resistencia.^{76,77}

DISCUSIÓN

2.1 Justificación

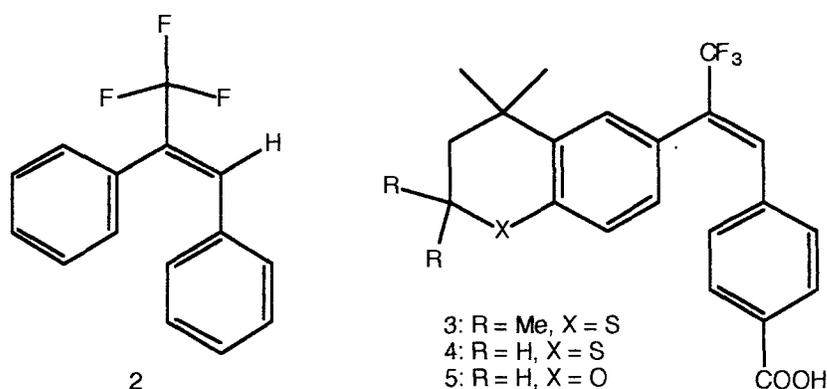
Hasta el momento se han sintetizado miles de retinoides, pero únicamente se han logrado mayores avances en la obtención de compuestos con selectividad por los receptores RAR. Después del descubrimiento del 9-*cis*-RA como ligando de los RXR, ha habido un mayor interés en la obtención de compuestos que activen este tipo de receptores nucleares (RXR). Se han obtenido pocos retinoides RXR-selectivos y no se ha logrado encontrar compuestos RXR subtipo-selectivos.

En este trabajo se propone desarrollar una estrategia sintética para la obtención de un heteroarotinoide análogo al 9-*cis*-RA, el ácido (2*E*,4*E*,6*E*)-3-metil-8,8,8-trifluoro-7-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2,4,6-octatrienoico (**1**):



La evaluación de los perfiles de toxicidad/actividad anticáncer en análogos de ATRA sugieren que los compuestos azufrados presentan alta actividad y baja toxicidad en comparación con sus análogos oxigenados o sin heteroátomos.⁷⁸⁻⁸⁴

La introducción de un anillo aromático tiene la intención de proteger al compuesto de los mecanismos de oxidación que involucran hidroxilación del carbono 18 y epoxidación del enlace 5-6 de los retinoides en el organismo.⁸⁰ Los dos grupos metilo unidos al carbono adyacente al átomo de azufre, suponen protección adicional en la posición 4, retardando la oxidación del heteroátomo por su naturaleza lipofílica y su volumen. Como resultado adicional de la presencia del anillo aromático se logra la restricción de la conformación 6-*s-cis*.



El grupo trifluorometilo en la posición 7 favorecería la obtención de estereoquímica *cis* entre los dos grupos más voluminosos en el enlace 6-7 (equivalente al 9-10 en el ácido retinoico). Esta suposición se basa en la evidencia obtenida por Ruban y colaboradores,⁸⁵ que al sintetizar el α -trifluorometilstilbeno (**2**) obtuvieron el isómero *cis* en una mayor proporción (86%), pese a la proximidad entre los dos grupos fenilo. Mediante cristalografía de rayos X se demostró que existe una interacción H-F de tipo puente de hidrógeno que le da mayor estabilidad a la molécula.⁸⁵ Los resultados obtenidos por Spruce y colaboradores,⁸⁶⁻⁸⁷ al sintetizar heteroarotinoides trifluorometilados análogos del estilbeno con configuración *cis* (**3-5**), concuerdan con las observaciones anteriores. Se propone entonces, que la introducción del grupo

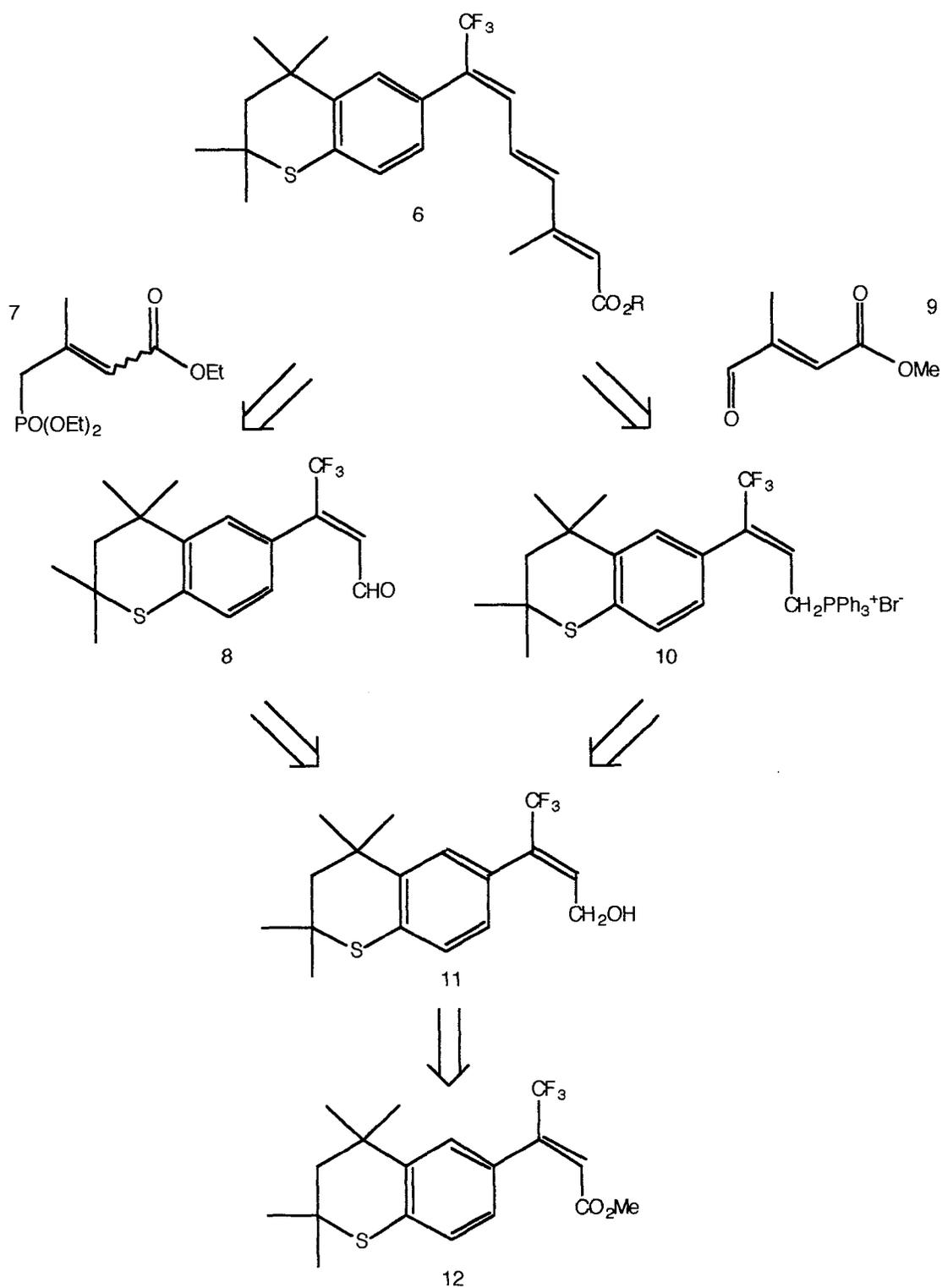
trifluorometilo en la posición 7 va a estabilizar y permitirá obtener en una mayor proporción isómeros con conformación 6*E*, la cuál es la característica que hace al compuesto meta similar al 9-*cis*-RA.

2.2 Estrategia sintética

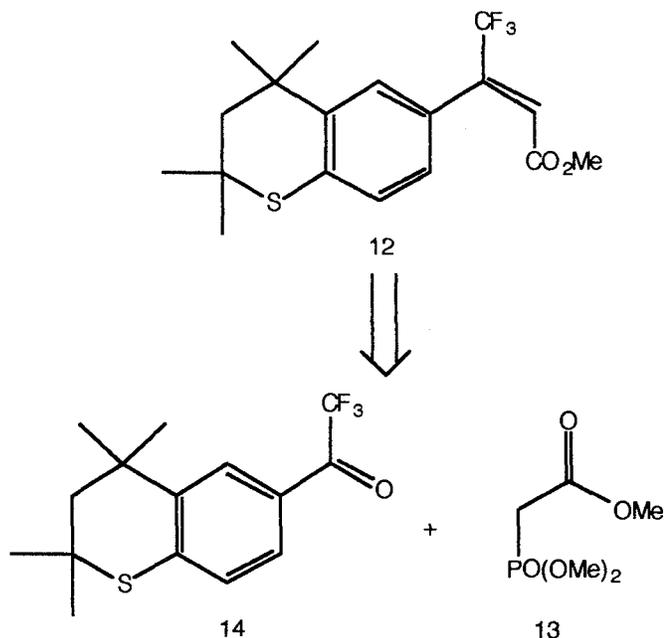
La estrategia sintética escogida contempla dos aproximaciones que involucran acoplamientos del tipo Wittig o Horner-Emmons. Se contempla la obtención del éster **6** mediante la reacción del fosfono-éster **7** con el aldehído **8** (ver Esquema 1). Por otro lado se podría obtener **6** haciendo reaccionar el aldehído **9** con la sal de fosfonio **10**.

Los compuestos **8** y **10** pueden ser obtenidos en un paso a partir del alcohol **11** (mediante reacciones con un oxidante apropiado o trifenilfosfina, respectivamente), que a su vez puede provenir de la reducción del isómero *E* del éster metílico **12**.

Los dos isómeros del éster metílico **12** pueden ser obtenidos de la reacción Horner-Emmons entre el fosfonoacetato de trimetilo **13** y la trifluorometilcetona **13** (ver Esquema 2). Para la obtención de este último compuesto se adaptó la secuencia descrita por Spruce y colaboradores.⁸⁶⁻⁸⁷ Los compuestos **7** y **9** son muy comúnmente empleados en la síntesis de retinoides. Para su obtención se exploraron las secuencias descritas por Igal y colaboradores⁸⁸ y por Solladié y Geradin.⁸⁹

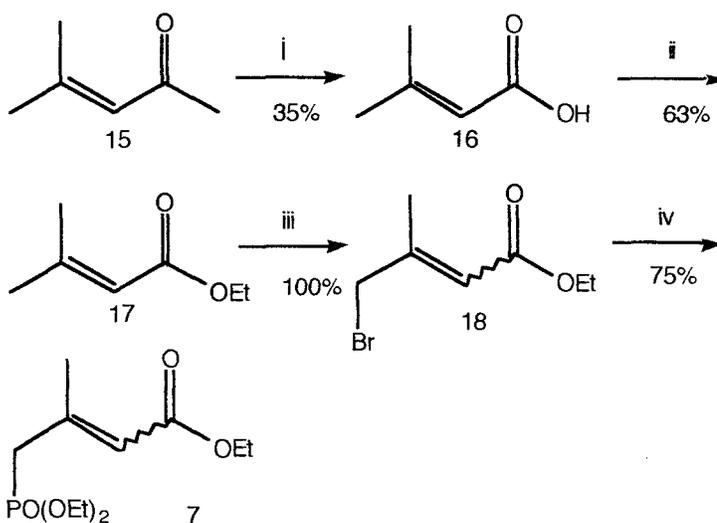


Esquema 1: Estrategia sintética para la obtención de 6



Esquema 2: Estrategia sintética propuesta para la obtención de 12

2.3 Obtención de (*E/Z*) 3-etoxicarbonil-2-metilpropen-2-enilfosfonato de dietilo (7)



Esquema 3. i) dioxano, KOCl ii) EtOH, H₂SO₄, reflujo iii) NBS, AIBN, CCl₄, reflujo iv) P(OEt)₃, reflujo

Varias rutas sintéticas para la obtención de retinoides requieren la síntesis de ésteres del ácido 3-metil-2-butenoico (**16**) funcionalizados en la posición 4 para los acoplamientos en reacciones tipo Wittig. Tanto la obtención del carbaldehído-éster (**9**) o del éster-fosfonato (**7**) pueden lograrse, en varios pasos, partiendo del ácido 3-metil-2-butenoico (**16**) (Esquema 3).

La reacción de oxidación con hipoclorito de sodio comercial (3%) del óxido de mesitilo (**15**), siguiendo el procedimiento descrito por Vogel,⁹⁰ permitió obtener el ácido 3-metil-2-butenoico (**16**) con rendimientos cercanos al 10%, muy inferiores al reportado.

La búsqueda de las condiciones ideales para la reacción tipo haloformo con el óxido de mesitilo condujo a la escogencia de hipoclorito de potasio concentrado recién preparado como agente oxidante, utilizando el procedimiento descrito por el Vogel.⁹⁰ La preparación de esta disolución se efectuó mediante la reacción de doble desplazamiento entre hipoclorito de calcio y carbonato de potasio en presencia de hidróxido de potasio. La precipitación del carbonato de calcio permitió obtener por filtración una disolución básica y concentrada de hipoclorito de potasio, idónea para una reacción de tipo haloformo. En la oxidación se obtuvo un rendimiento de 35 % que superó significativamente a las reacciones con hipoclorito de sodio comercial pero no alcanzó el 60 % reportado.

La causa del bajo rendimiento podría ser atribuida al control de la temperatura al inicio de la reacción de oxidación. En esta reacción no se usan fuentes externas de calentamiento, debido a que al mezclar los reactivos se produce un gran aumento en la temperatura. Es necesario enfriar la mezcla para regular el reflujo del cloroformo producido, y un enfriamiento excesivo podría influir significativamente en el éxito de la reacción. El producto fue purificado por

recristalización con agua y se empleó el punto de fusión para determinar su pureza. Se obtuvo un ámbito, sin corregir, entre 64 y 65°C cercano al valor reportado de 68°C.⁹⁰

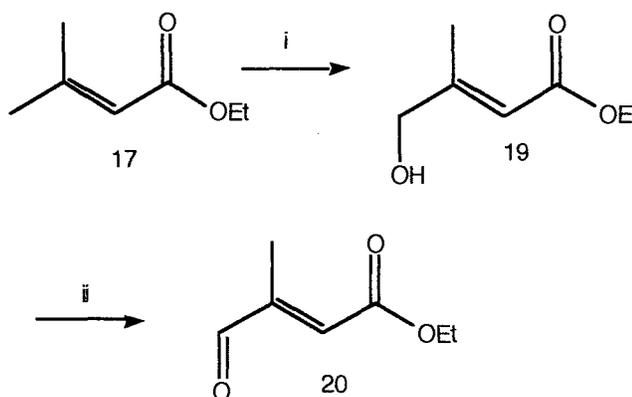
En la síntesis de 3-metil-2-butenato de etilo (**17**) se escogió la esterificación catalizada por ácido sulfúrico con un exceso de etanol empleándose tamices moleculares (4Å) para eliminar el agua producida del medio de reacción. La destilación a presión reducida, permitió obtener el éster en un 63% de rendimiento y se confirmó su obtención mediante el análisis del espectro de ¹H-RMN (ver Figura 5), en el que no se aprecian señales correspondientes al ácido carboxílico.

La bromación con NBS y AIBN del 3-metil-2-butenato de etilo produjo de manera cuantitativa (sin purificación) los dos isómeros del 4-bromo-3-metil-2-butenato de etilo (**18**) en una proporción *Z/E* de 55:45. No se requería separación de los dos compuestos para el siguiente paso y el espectro de RMN comprobó la presencia de la mezcla (ver Figura 6).

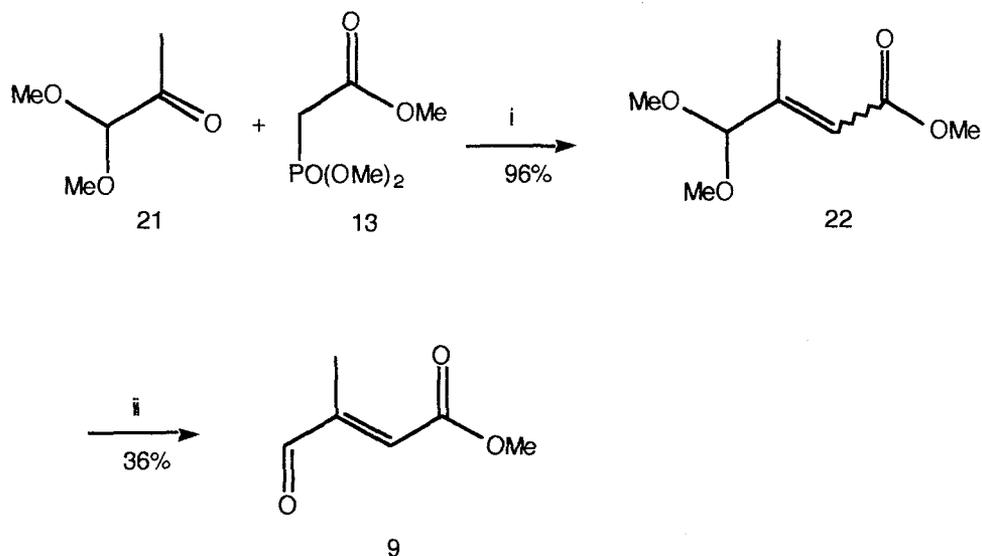
El tratamiento de la mezcla de los dos γ -bromoésteres con trietilfosfito permitió obtener la mezcla de los isómeros (*E/Z*)-3-etoxicarbonil-2-metilpropen-2-enilfosfonato de dietilo (**7**). En la reacción de Arbuzov, al igual que en la bromación alílica, se atendieron las recomendaciones de Igbal y colaboradores,⁸⁸ por lo que no se efectuó purificación. El espectro ¹H-RMN obtenido verificó la obtención de los dos fosfonatos en una proporción de 50:50 (ver Figura 7). En los dos casos se comparó los espectros con los datos obtenidos por Pattenden y Weedon,⁹¹ que sintetizaron y separaron los γ -bromoésteres y los dietilfosfonatos de metilo análogos.

2.4 Obtención de (*E*)-3-metil-4-oxo-2-butenato de metilo (9)

Para la obtención del éster etílico **20** (análogo al aldehído **9**) se escogió originalmente la ruta descrita por Curley y Ticoras⁹² (ver Esquema 4), que involucra una oxidación del 3-metil-2-butenato de etilo (**17**) con dióxido de selenio para obtener estereoespecíficamente el (*E*)-3-hidroximetil-2-butenato de etilo (**19**). En general, se obtuvo muy bajos rendimientos (35%) por lo que se decidió intentar la oxidación catalítica con hidroperóxido de *tert*-butilo y SeO_2 .⁹³ La presencia de las señales del reactivo y del alcohol en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ prático evidenció una conversión incompleta con un rendimiento similar al obtenido con las condiciones anteriores (ver Figura 8), por lo que se decidió evaluar otra opción para la obtención del compuesto.



Esquema 4. i) SeO_2 , EtOH, hidroperóxido de *tert*-butilo/diperóxido de *tert*-butilo ii) MnO_2 activado, CH_2Cl_2



Esquema 5. i) MeO-Na^+ , MeOH/benceno ii) $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$, Et_2O

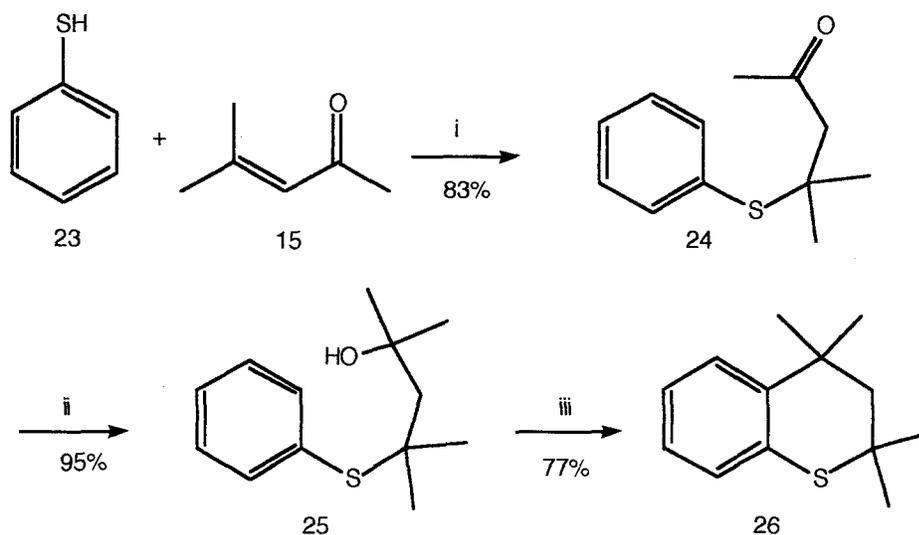
Se adaptó el método descrito por Solladié y Girardin,⁸⁹ para la reacción Horner-Emmons entre el 3,3-dimetilacetal de piruvaldehído (**21**) y fosfonoacetato de trimetilo (**13**) utilizando metóxido de sodio como base (ver Esquema 5).

La reacción generó la mezcla de (*E/Z*)-4,4-dimetoxi-3-metil-2-butenato de metilo (**22**) en un 96% de rendimiento. El espectro IR del producto demostró la presencia de una sola absorción para carbonilo a 1710 cm^{-1} , la aparición de las bandas que sugieren la presencia del doble enlace a 1660 y 3000 cm^{-1} y además varias absorciones en la región de los enlaces C-O (ver Figura 9). La hidrólisis de los acetales se llevó a cabo con H_2SO_4 al 35%, obteniéndose un rendimiento de 36%, inferior al 70% reportado. El espectro infrarrojo del aceite amarillo obtenido mostró dos absorciones en la región del carbonilo, a 1701 y 1725 cm^{-1} . Los autores reportan que esta reacción produce además la isomerización del doble enlace generando únicamente el (*E*)-3-metil-4-oxo-2-

butenoato de metilo (**9**). En el momento de la preparación de los compuestos **9** y **22** no estaba funcionando el espectrómetro de RMN, por lo no que se midieron espectros $^1\text{H-RMN}$.

El producto fue utilizado sin purificación adicional para evitar la descomposición, siguiendo las recomendaciones de Solladié y Girardin⁹⁰ que demostraron la pureza del producto mediante el espectro de $^1\text{H-RMN}$. Se encontraron reportes en la literatura que mencionan que la destilación de este aldehído lábil y volátil reduce significativamente el rendimiento.⁹² Además, Curley y Ticoras demostraron que la cromatografía de columna con gel de sílice también es poco eficiente.⁹⁴

2.5 Obtención de 2,2,4,4-tetrametiltiocromano (**26**)



Esquema 6. i) trietilamina/ CHCl_3 ii) a. $\text{CH}_3\text{MgI}/\text{Et}_2\text{O}$, b. $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$
iii) $\text{P}_2\text{O}_5/\text{H}_3\text{PO}_4/\text{benceno}$

La ruta sintética escogida para la construcción del heteroarotinoide involucraba la formación del heterociclo azufrado **26** y su posterior trifluoroacetilación para generar la trifluorometilcetona **14** que serviría como sustrato para la extensión de la cadena carbonada. Se adaptó el procedimiento descrito por Spruce y colaboradores para esta serie de reacciones.^{86,87}

La primera reacción comprende la adición tipo Michael del tiofenol (**24**) al óxido de mesitilo (**15**) (ver Esquema 6). Se emplearon las mismas condiciones que las descritas en el procedimiento original, que involucra el empleo de trietilamina como catalítico.

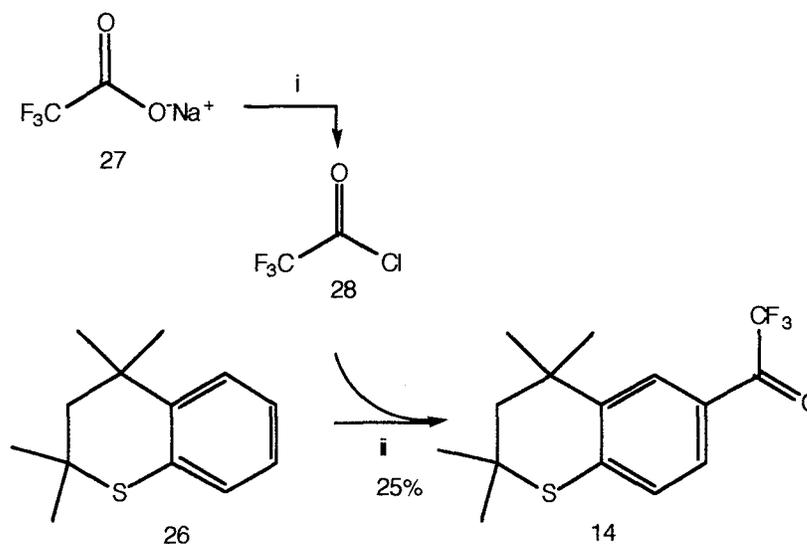
La 4-metil-4-tiofenil-2-pentanona (**24**) fue obtenida después de la purificación con un rendimiento similar al reportado y la pureza se comprobó al comparar el espectros de ¹H-RMN con el reportado (ver Figura 10).

En el caso de la reacción de Grignard de la 4-metil-4-tiofenil-2-pentanona (**24**), se utilizó un exceso de un equivalente de yoduro de metilmagnesio, generando la obtención de 2,4-dimetil-4-tiofenil-2-pentanol (**25**) con un alto rendimiento de reacción (95%). Al intentar efectuar la purificación por destilación al vacío se produjo la descomposición del alcohol terciario debido al calentamiento. El espectro infrarrojo del producto obtenido evidenció la aparición de dobles enlaces carbono-carbono, presentes en un posible producto de deshidratación. El análisis del producto crudo por infrarrojo generó un espectro idéntico al reportado en el procedimiento original por lo que se decidió omitir el paso de destilación.

Inicialmente se intentó la formación del 2,2,4,4-tetrametiltiocromano (**26**) mediante la reacción intramolecular Friedel-Crafts que fue descrita por Spruce utilizando condiciones típicas, con tricloruro de aluminio como ácido de Lewis y disulfuro de carbono como disolvente. La obtención de un bajo rendimiento y de

una mezcla de reacción compleja (según el análisis por IR), condujo a la búsqueda de otras condiciones para llevar a y cabo la conversión. Al seguir el método descrito por Waugh y colaboradores,⁸³ en el que se emplea pentóxido de fósforo y ácido fosfórico como catalítico. La purificación de la mezcla de reacción obtenida se efectuó de una manera rápida y eficiente empleando la técnica de VLC (cromatografía líquida al vacío)⁹⁵ y el rendimiento obtenido fue de 77%. Pese a que es inferior al reportado por Spruce, los reactivos empleados son más fáciles de manipular y no se requieren las condiciones anhidras de la reacción de Fiedel-Crafts. La pureza se comprobó al comparar el espectro ¹H-RMN con el reportado (ver Figura 11).

2.6 Obtención de la (2,2,4,4-tetrametil-tiocroman-6-il)-trifluorometilcetona (14)



Esquema 7. i) POCl_3 ii) AlCl_3 , CS_2

La reacción de acilación Friedel-Crafts en la que se introduce el grupo trifluoroacetilo fue uno de los pasos más complicados que se efectuaron (ver Esquema 7). La reacción de acilación involucra la adición de cloruro de trifluoroacetilo, gas a temperatura ambiente, al medio de reacción. Este compuesto se preparó haciendo reaccionar trifluoroacetato de sodio anhidro con oxicluro de fósforo. El cloruro de trifluoroacetilo es destilado a otro recipiente, reflujiendo y condensándolo mediante trampas de hielo seco/isopropanol (-78°C). Posteriormente, se destila al balón de reacción arrastrándolo con una corriente de nitrógeno y se emplea un condensador grande de hielo seco/isopropanol para minimizar su escape (ver figura 1).

El crudo obtenido fue separado mediante cromatografía de columna empleando gel de sílice y mezclas de hexano/acetato de etilo con polaridad creciente. Se obtuvo un rendimiento de 25%, similar al reportado por Spruce, de 24% y la pureza se comprobó por comparación del espectros $^1\text{H-RMN}$ (ver Figura 12).

Spruce y colaboradores,^{86,87} sintetizaron también 4,4-tetrametiltiocromano y 4,4-tetrametilcromano y los sometieron a las mismas condiciones de trifluoroacetilación, con rendimientos de 31 y 53% respectivamente. Es importante señalar que obtuvieron los más bajos rendimientos en los casos en los que el heterociclo contenía azufre y que también tuvieron problemas para obtener el derivado con cloruro de acetilo en las condiciones similares. El sistema $\text{CS}_2/\text{AlCl}_3/\text{cloruro de ácido}$ provee posiblemente las condiciones para la obtención de productos de descomposición en los que se rompen enlaces carbono-azufre. El bajo rendimiento podría ser atribuido a la descomposición del producto acetilado o trifluoroacetilado.

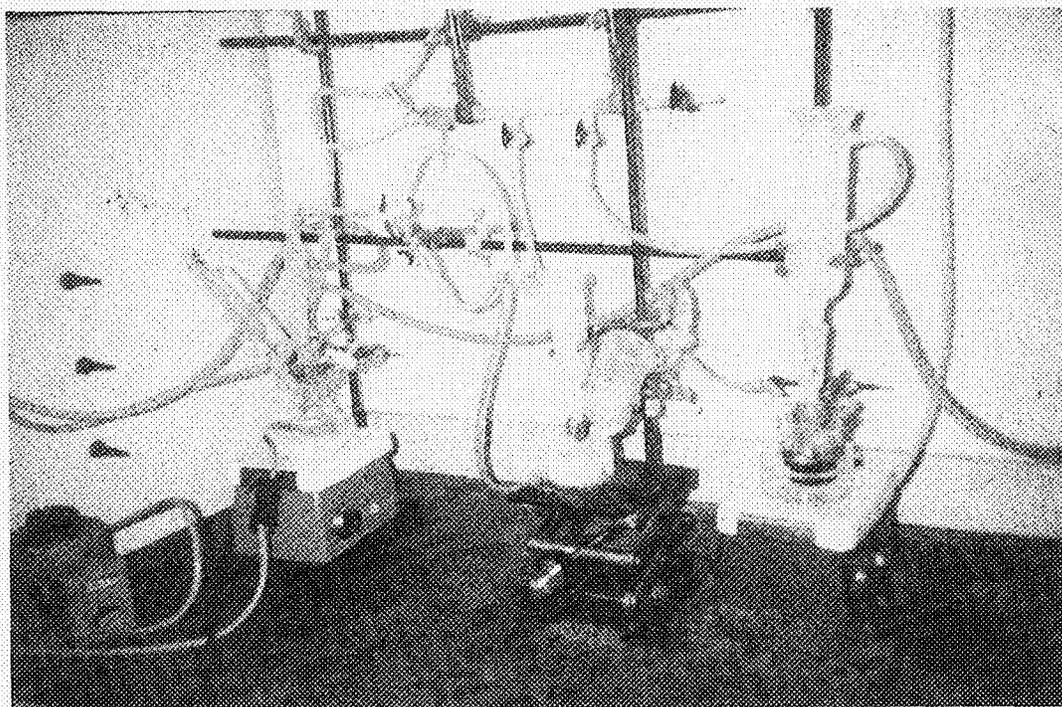
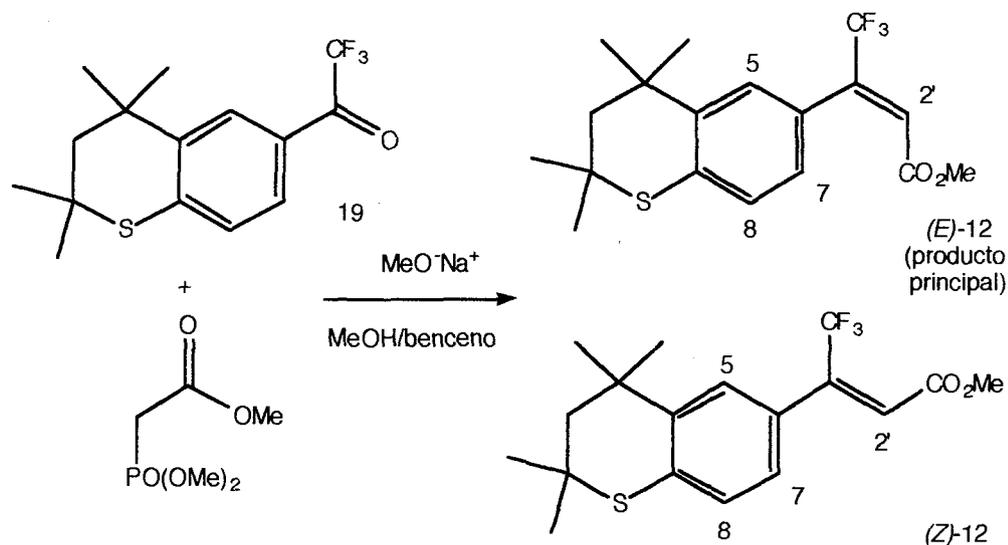


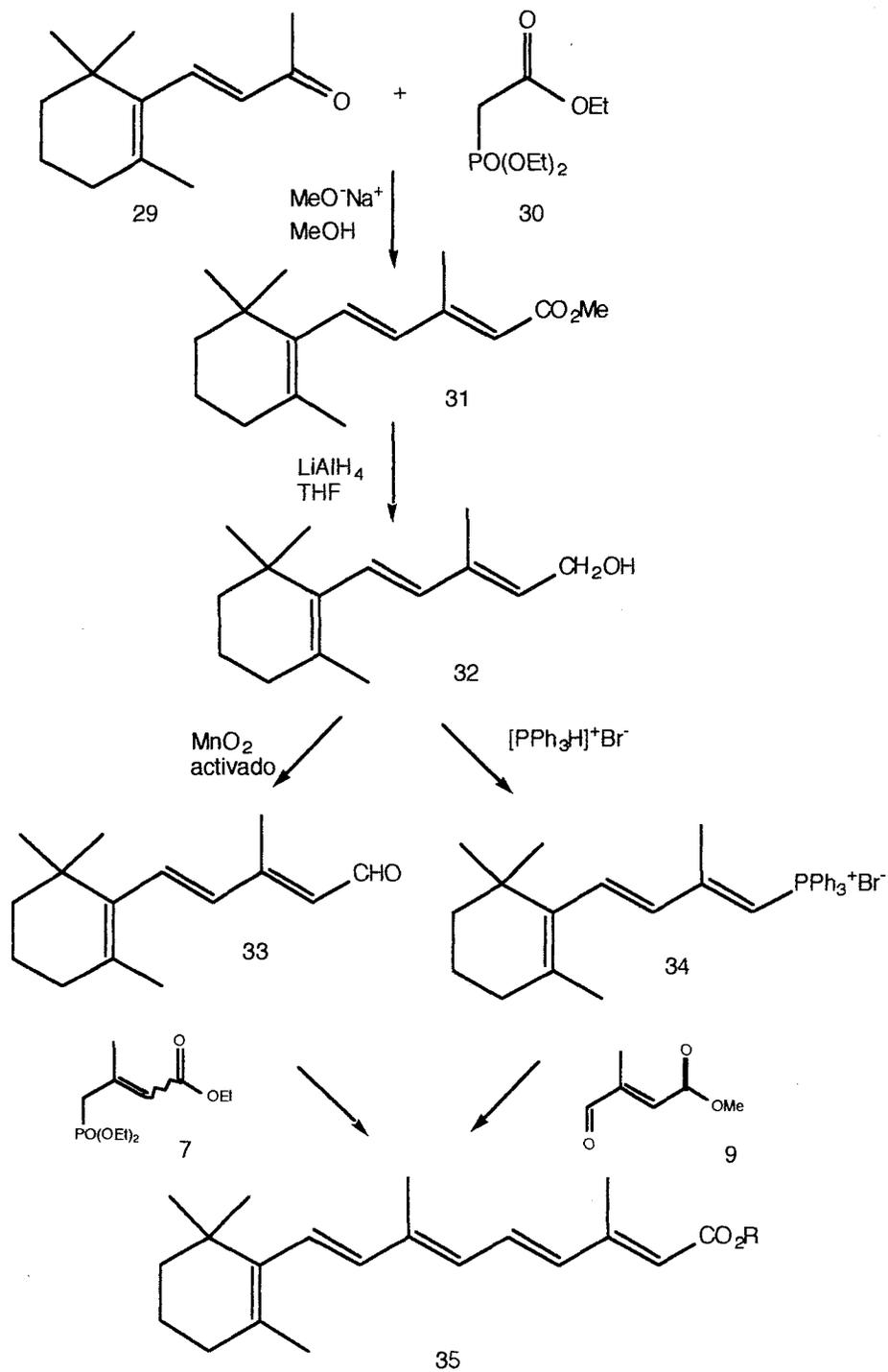
Figura 1. Equipo empleado en la reacción de trifluoroacetilación

2.6 Obtención de (*E/Z*) 4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenoato de metilo (**12**)



Esquema 8. Reacción de obtención de *E* y *Z* (12**)**

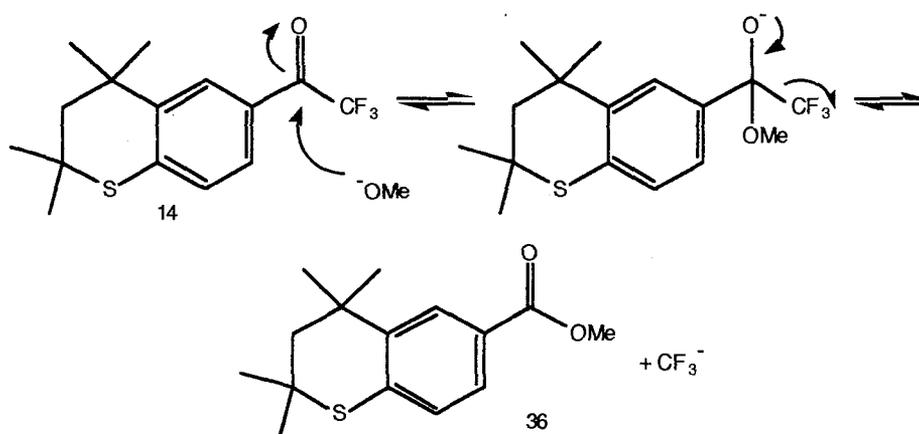
Uno de los métodos tradicionales para la síntesis de el éster metílico del ácido retinoico, involucra la reacción Horner-Emmons entre la β -ionona (**29**) y el fosfonoacetato de trietilo (**30**) (ver Esquema 9). Se adaptaron las condiciones de reacción descritas por Tietze⁹⁶ para emplear (2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-trifluorometilcetona (**14**) como sustrato (ver Esquema 8). El iluro se formó empleando metóxido de sodio como base y los disolventes de la reacción fueron benceno y metanol. La mezcla obtenida se separó mediante cromatografía de columna con gel de sílice y el producto principal de la reacción fue un aceite amarillo, que, como se discutirá posteriormente, corresponde a (*E*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenoato de metilo (**12**).



Esquema 9. Rutas sintéticas descritas por Tietze y Eicher⁹⁶ para la obtención de ésteres del ácido retinoico.

De el crudo de reacción se aisló inicialmente un segundo componente que no presentó hidrógenos vinílicos en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ (ver Figura 13). Se propone que la estructura del compuesto aislado es el éster metílico **36**, producido por la reacción de adición-eliminación sobre el carbonilo de la cetona (ver Esquema 10). El ataque nucleofílico del ion metóxido sobre el carbonilo de la cetona

produce la sustitución del grupo trifluorometilo, que actúa como grupo saliente en una reacción de tipo haloformo:⁹⁷



Esquema 10. Mecanismo propuesto para la obtención de 36

En reacciones posteriores la separación cromatográfica del crudo permitió el aislamiento de un sólido amarillo claro que demostró ser el isómero *Z* del éster **12**. Aparentemente este compuesto no está presente en la mezcla de reacción en cantidades apreciables y se produce por la isomerización del doble enlace al permanecer varios días en disolución.

Los espectros de $^1\text{H-RMN}$ prático confirmaron la obtención de los dos isómeros del éster metílico. Se pueden apreciar claramente dos singuletes a campo alto que corresponden a los dos grupos *gem*-dimetilo y un singulete producido por el metileno (ver figuras 14 y 15).

La obtención de los dos compuestos isoméricos se evidenció por la diferencia de desplazamientos químicos entre los metoxilos y los hidrógenos vinílicos. En el espectro del aceite a 90 MHz, el hidrógeno vinílico aparece como un singulete ancho a 6,54 ppm y el metoxilo como un singulete a 3,57 ppm. En el caso del sólido las señales corresponden a singuletes a 6,33 ppm y 3,88 ppm respectivamente.

Es importante señalar que en cada uno de los espectros se nota la presencia del otro isómero. Esto se debe a que transcurrieron muchos días entre el momento de la disolución en CDCl_3 y la realización del experimento, por lo que se produjo isomerización. Esta situación se presentó en un menor grado al medir los espectros $^1\text{H-RMN}$ a 500 MHz, porque se hicieron las mediciones poco tiempo después de preparar las disoluciones.

Con el espectrómetro Jeol de 90MHz no se hicieron experimentos de NOE, por lo que con los datos espectroscópicos obtenidos hasta ese momento no era posible la determinación de la estereoquímica de los dobles enlaces.

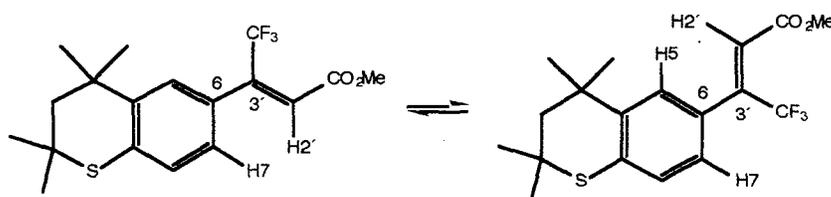
La asignación de los hidrógenos aromáticos se efectuó al obtener un espectro de 400 MHz (ver Figura 2), en el que se aprecian claramente los acoplamientos entre ellos. Se observa el acoplamiento *meta* (2,0 Hz) entre H5 (7,28 ppm) y H7 (6,99 ppm) y el acoplamiento *orto* (8,1 Hz) entre H7 y H8 (7,13 ppm).

En el caso del sólido, se observa el acoplamiento *meta* (2,0 Hz) entre H5 (7,38 ppm) y H7 (7,08 ppm) y el acoplamiento *orto* (8,2 Hz) entre H7 y H8 (7,13 ppm). Los valores de las constantes de acoplamiento están dentro de los ámbitos esperados (*orto* 7-9 Hz, *meta* 1-3 Hz).

Usualmente la constante de acoplamiento entre hidrógenos *para* es menor a 1 Hz. La presencia de acoplamientos H-F a larga distancia, que serán

discutidos más adelante, genera multipletes en los que es muy difícil apreciar los acoplamientos entre H5 y H8.

La identificación de la estereoquímica del doble enlace en cada uno de los isómeros obtenidos se efectuó mediante experimentos de efecto nuclear Overhauser (NOE) (ver Figuras 3 y 4). Gracias a que se cuenta con los dos isómeros es posible, mediante una medición del NOE, distinguir uno del otro. La irradiación de la señal de H2', correspondiente al hidrógeno vinílico, debe producir un efecto NOE en las señales de H5 y H7 únicamente en el caso del isómero Z.



En la primera conformación H2' y H7 pueden estar cerca, al igual que H2' y H5 en la segunda. En el otro isómero, debido a la configuración del doble enlace, el hidrógeno vinílico no puede estar cerca de los hidrógenos del anillo aromático, por lo que no debe ser posible observar un NOE.

De esta forma, al saturar la señal correspondiente al hidrógeno vinílico, sólo se observó un NOE en el caso del sólido (ver Figura 3): la saturación de la señal a 6,36 ppm produce un aumento en las señales a 7,10 (H7, 0,5%) y 7,41 (H5, 0,8%). En el caso del aceite la saturación de la señal a 6,60 no produce un efecto en las señales aromáticas. Esta información permite sugerir la estereoquímica del doble enlace para los dos compuestos. El aceite es el (*E*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenoato de metilo y el sólido el isómero (*Z*).

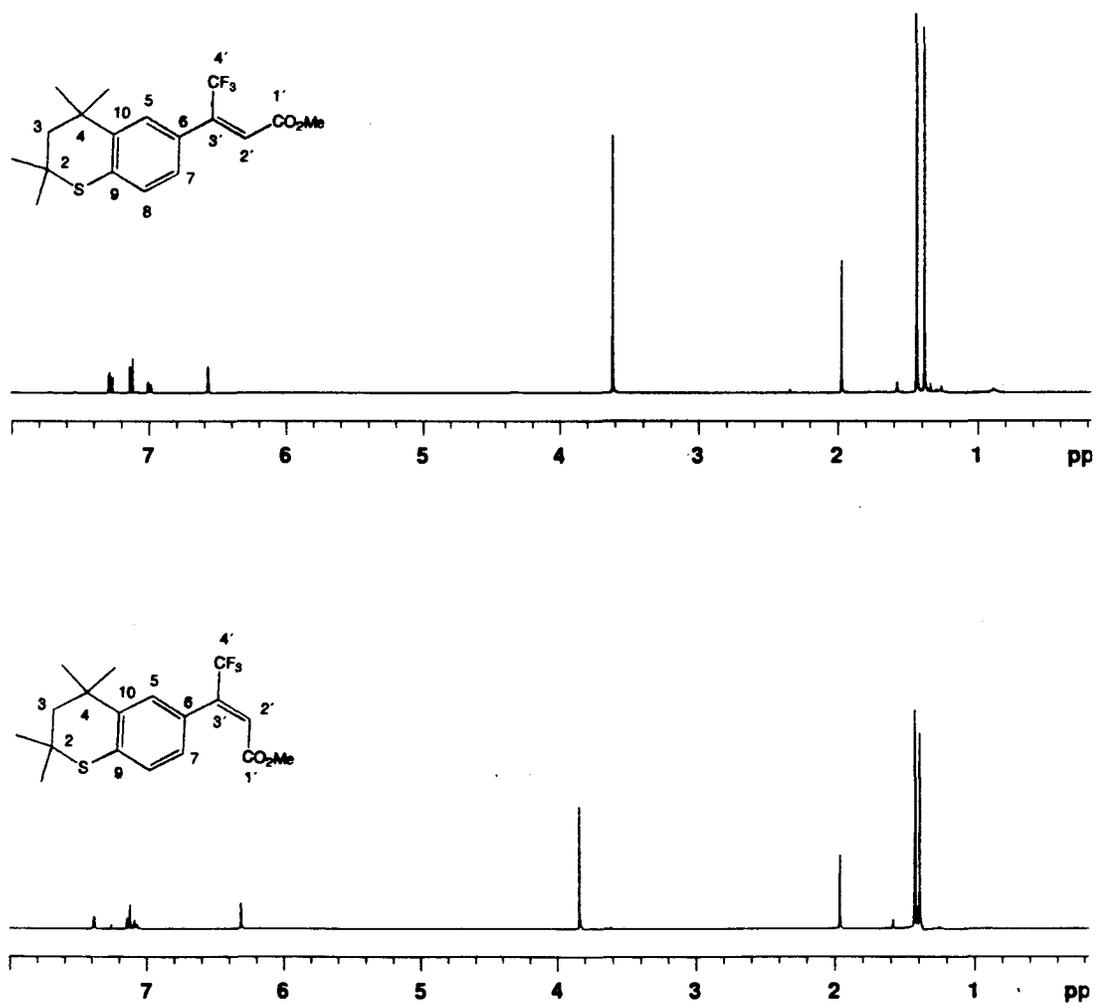


Figura 2. Espectros ¹H-RMN 400 MHz (CDCl₃) de E y Z-(12)

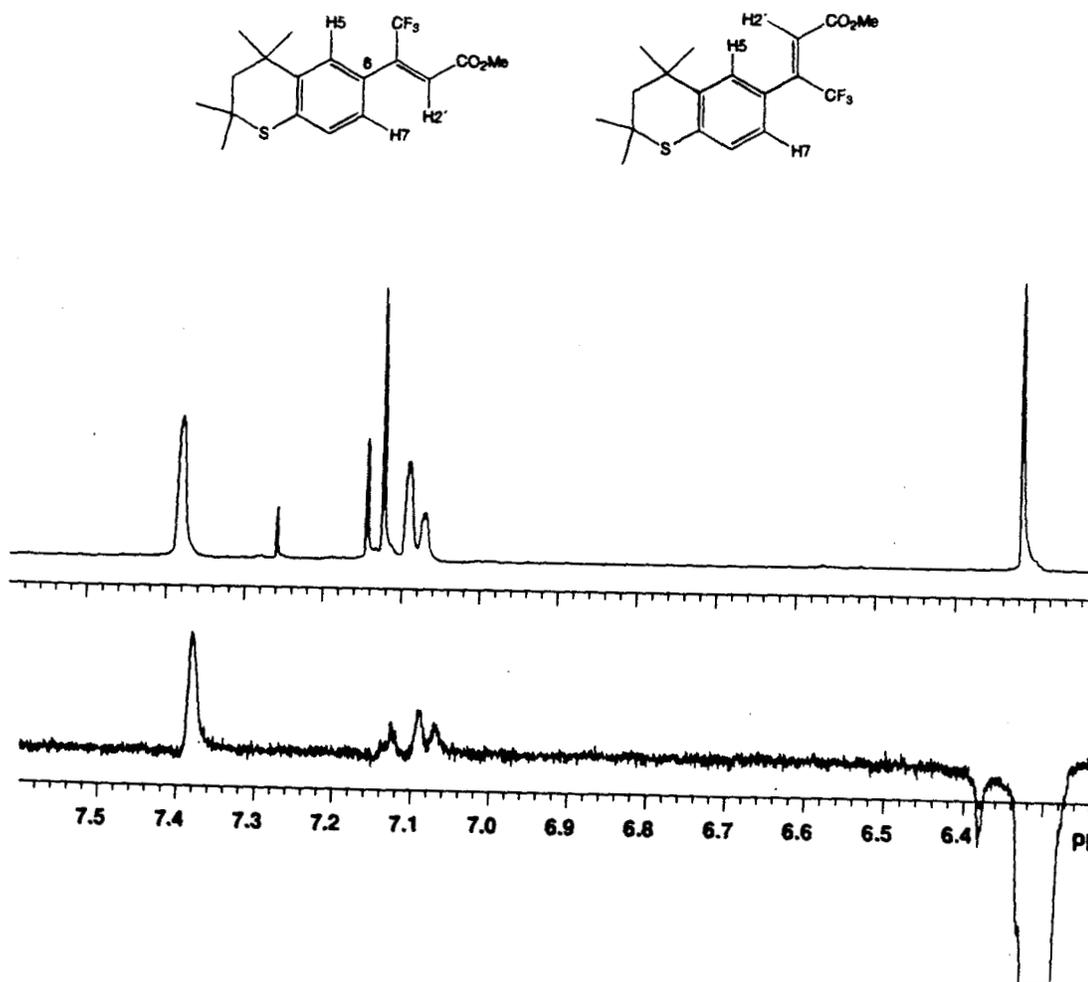


Figura 3. Espectro de ^1H -NOE diferencial 400 MHz de Z-(12)

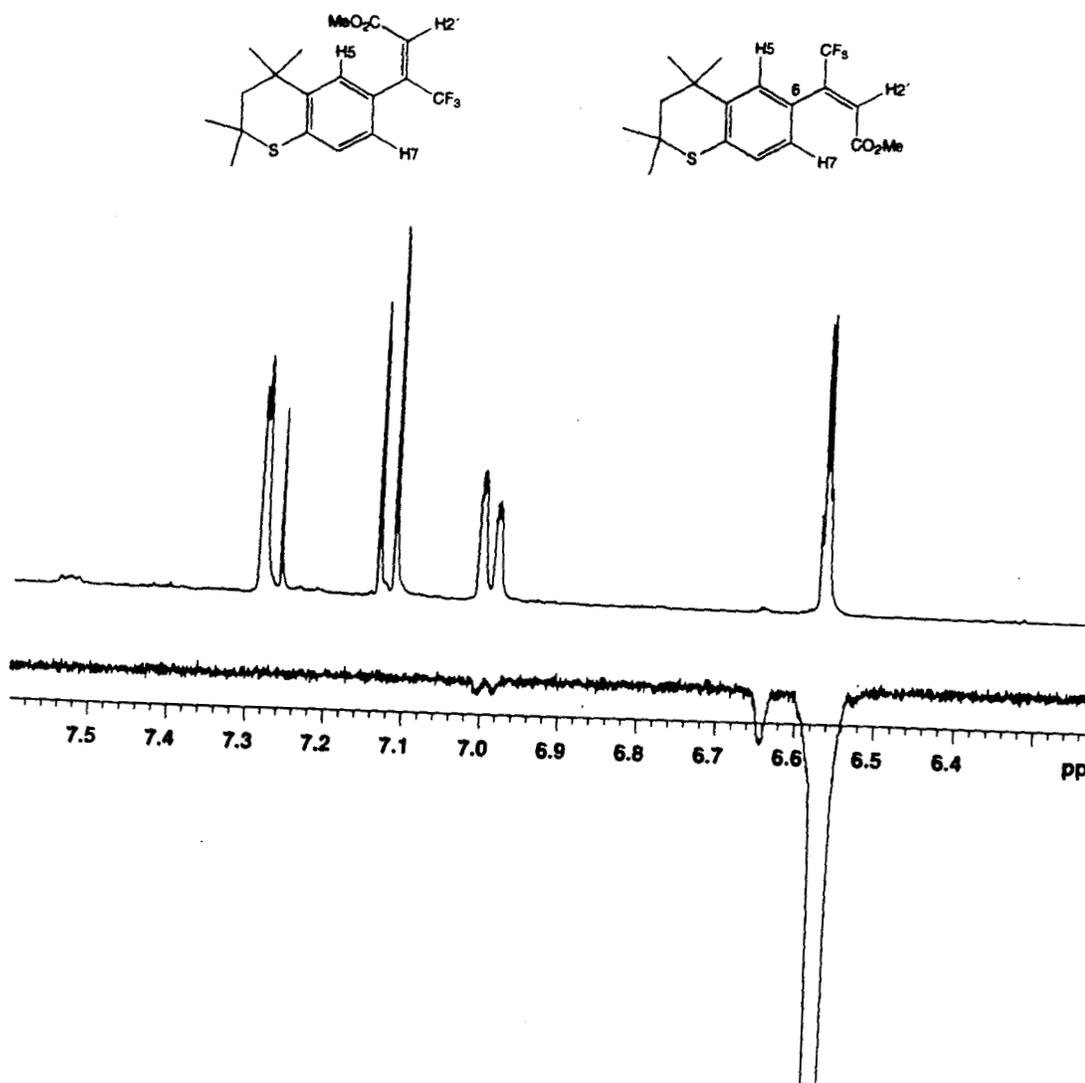


Figura 4. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ diferencial 400 MHz de *E*-(12)

En los espectros obtenidos a 400 MHz se comprobó que el la señal correspondiente al hidrógeno vinílico del isómero *E* es un cuartetos producido por el acoplamiento a larga distancia con el flúor (J^4) con una constante de 1,4 Hz. Además se observan acoplamientos J^5 con H7 (0,80 Hz) y H5 (br). En el caso del isómero *Z*, se observan las constantes observadas son de 0,8 y 0,6 Hz respectivamente.

En el caso del isómero *E*, se pueden distinguir fácilmente en el espectro las señales del carbonilo (1') a 165,06 ppm, el trifluorometilo (122,82 ppm; J^1 C-F = 276 Hz) y C3'(142,30 ppm; J^2 C-F = 31 Hz). Los desplazamientos de los carbonos 2', 3, 5, 7, 8 y del metoxilo fueron obtenidos por la correlación a un enlace de distancia con las señales de ^1H -RMN previamente asignadas (ver Tabla 2), mediante un experimento gHMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, ver Figuras 16 y 17).

Los desplazamientos de los carbonos restantes se determinaron mediante un experimento de gHMBC.(Heteronuclear Multiple Bond Correlation) (ver Figuras 18 y 19), que correlaciona a tres o dos enlaces de distancia las señales de ^1H y ^{13}C

Las señales a 42,48 y 35,75 ppm corresponden a los dos carbonos alifáticos cuaternarios. Se observa un acoplamiento J^3 entre H5 (7,31 ppm) y la señal a 35,75 ppm, por lo que esta corresponde a C4 y la de 42,48 ppm a C2.

Las señales a 127,25, 135,21 y 142,58 corresponden a los carbonos cuaternarios aromáticos. Se observa un acoplamiento entre la señal a 1,41 ppm y el carbono que aparece a 142,58, que se debe a la correlación J^3 entre el los hidrógenos de los metilos enlazados a C4 y C10. Con esta información, al observar los acoplamientos J^1 en el gHMQC, se puede asignar la señal a 32,58 a

Tabla 2. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C -RMN para *E* y *Z* (12)

Posición	^1H δ , ppm	^{13}C δ , ppm	^1H δ , ppm	^{13}C δ , ppm
1'		165,06 s (br)		165,34
2'	6,59 q (1,4 Hz)	126,03 s (br)	6,36 s (br)	126,23 q (2,9 Hz)
3'		142,30 q (31 Hz)		138,49 q (25 Hz)
4'		122,82 q (275 Hz)		122,41 q (276 Hz)
2		42,48		42,56
3	2,00	54,42	2,00	54,38
4		35,75		35,88
5	7,31 d (2,0 Hz)	127,78 s (br)	7,41 dq (2,0; 0,6 Hz)	126,37 q (1,0 Hz)
6		127,25 s (br)		130,06 s (br)
7	7,02 ddq (8,1; 2,0; 0,8 Hz)	126,03 s (br)	7,10 ddq (8,2; 2,0; 0,8 Hz)	125,34 q (1,0 Hz)
8	7,15 dd (8,10; 0,40 Hz)	127,88	7,16 dq (8,2; 0,6 Hz)	128,26
9		135,21		135,71
10		142,58		143,18
OCH ₃	3,64	52,21	3,84	52,66
C2(C H ₃) ₂	1,46	31,86	1,45	31,92
C4(C H ₃) ₂	1,41	32,85	1,40	32,74

los metilos enlazados a C4. Al otro grupo *gem*-dimetilo (enlazado a C2) se le asignan las señales a 1,46 y 31,86 ppm.

Para distinguir entre los carbonos cuaternarios 9 y 6, se observó el acoplamiento entre H2' (6,56 ppm) y la señal a 127,25 ppm, que corresponde a C6. La señal a 135,21 ppm fue asignada a C9 porque está acoplada con H5 (7,31 ppm) y H7 (7,02 ppm) y no muestra acoplamiento con H2'.

Se efectuó un análisis similar para asignar las señales correspondientes al isómero *Z*. En la tabla 2 se pueden comparar los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C -RMN para los dos isómeros. Las diferencias más visibles, discutidas anteriormente, se presentan en la señales de ^1H para el hidrógeno vinílico (H2') y el metoxilo.

Los átomos de flúor interactúan con otros núcleos por medio de un mecanismo directo a través del espacio. No se trata de una interacción dipolar, sino de un acoplamiento de espines que se produce por el traslape de los orbitales no enlazados.¹⁰² Por esta razón se observa, para el isómero *E*, un acoplamiento grande (q 1,4 Hz) entre los átomos de flúor y el hidrógeno vinílico, mientras que en el isómero *Z* sólo se observa un singulete ancho (ver Figura 20).

En el isómero *Z*, aunque están a 5 enlaces de distancia, se observan constantes de 0,6 y 0,8 Hz debidas a la interacción de los átomos de flúor con H5 y H7. En el isómero *E* únicamente es visible el acoplamiento entre H7 y F (0,8 Hz). Posiblemente esta situación se debe a la conformación que adquiere preferentemente este compuesto por las interacciones estéricas del grupo éster con los hidrógenos aromáticos.

El comportamiento las constantes de acoplamiento C-F observadas es similar al esperado para este tipo de sistema ($J^1 \sim 270$ Hz; $J^2 \sim 30$ Hz; $J^3 \sim 4$ Hz; $J^4 \sim 1$ Hz)¹⁰². En el caso del isómero *E* se obtuvo valores de 275 (C4') y 31 Hz

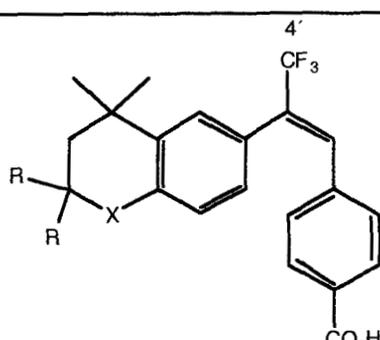
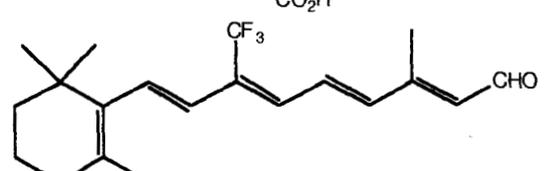
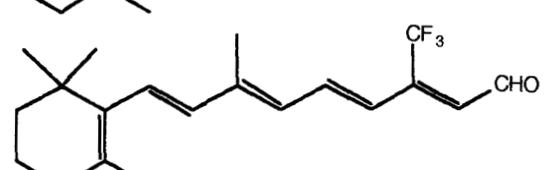
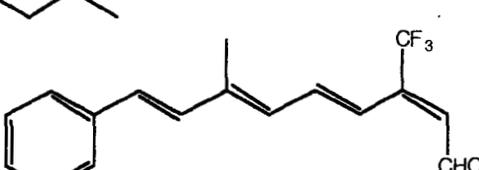
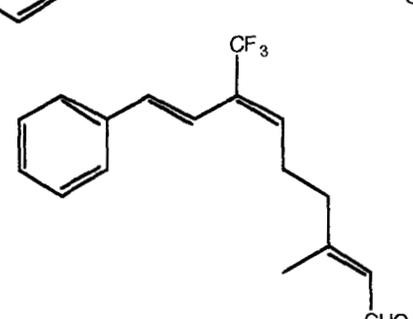
(C3') y se observaron acoplamiento débiles, evidenciados por singuletes anchos, con C2', C1, C5, C6 y C7. Con el isómero *Z* las constantes fueron de 276 (C4'), 25 (C3'), 2,9 (C2'), y 1,0 Hz (C5 y C7) y se observaron acoplamiento débiles con C1 y C6 (ver Figuras 22 y 23).

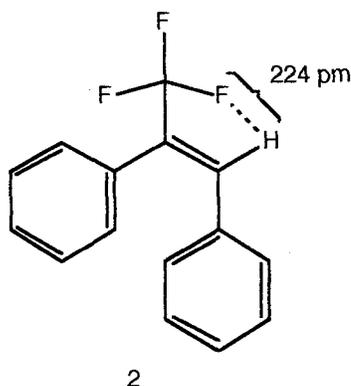
Al medir los espectros de ^{19}F se obtuvo desplazamientos químicos de -60,52 ppm para el isómero *Z* y de -67,29 ppm para el isómero *E* (empleando $\text{C}_6\text{H}_5\text{CF}_3$ disuelto en C_6D_6 como estándar externo, -60,82 ppm). Las señales obtenidas son multiplete producidos por los acoplamiento con H discutidos anteriormente (ver Figura 24) y en los dos casos se observó la presencia del otro compuesto, producido por isomerización. Los resultados son similares a los reportados por Spruce y colaboradores,⁸⁶⁻⁸⁷ que obtuvieron valores cercanos a -66,6 ppm para los compuestos 2, 3 y 4. Además, el valor obtenido para el isómero *Z* es cercano a datos obtenidos por Liu y colaboradores,¹⁰¹ que sintetizaron varios retinoides trifluorometilados (ver Tabla 3)

La estereoquímica obtenida en el producto principal, el isómero *E*, comprobó la influencia de el grupo trifluorometilo en la reacción. En las reacciones de Horner-Emmons se presenta una tendencia a la obtención de ésteres insaturados con los grupos más voluminosos de lados opuestos del doble enlace. Para revertir esta tendencia deben utilizarse fosfonatos modificados y sistemas básicos altamente disociados (bis-trifluoroetil fosfonoacetato de metilo y $\text{KN}(\text{TMS})_2/18\text{-corona-6}$).⁹⁸ La obtención predominante del isómero *E* en la reacción de obtención de **12** puede ser explicada únicamente basándose en la posible estabilidad conferida al compuesto por la interacción entre uno de los átomos de flúor y el hidrógeno vinílico. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por los grupos de

Ruban⁸⁵ y Spruce^{86,87} al someter trifluorometilcetonas a reacciones de olefinación Horner-Emmons.

Tabla 3. Desplazamientos de ¹⁹F de retinoides trifluorometilados⁸⁶

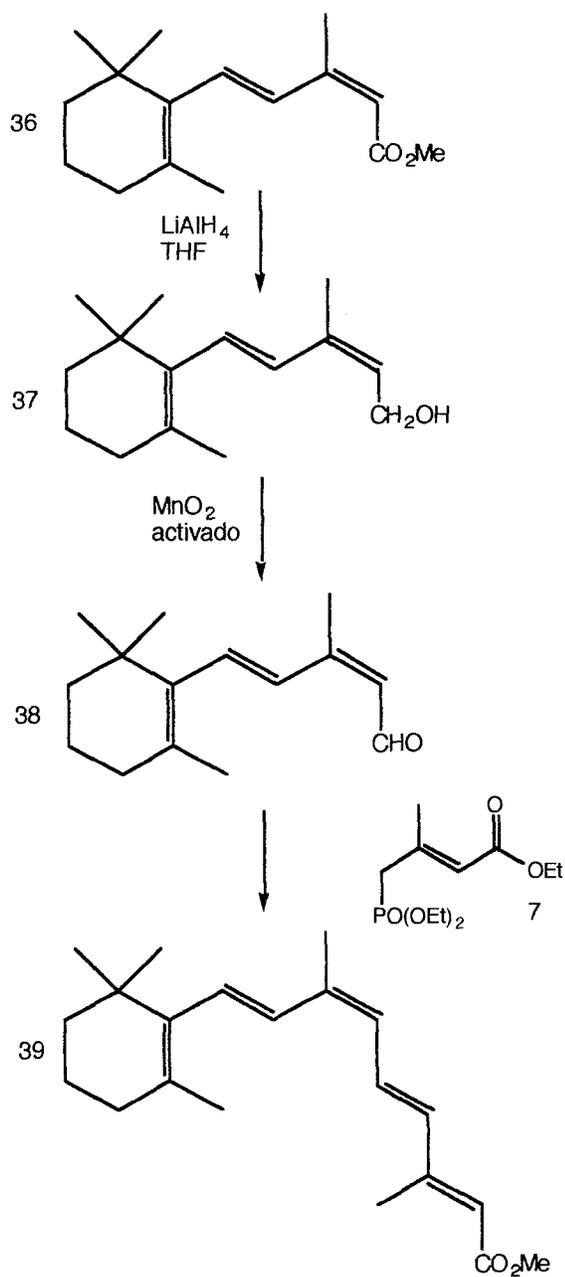
Retinoide	δ , ppm vs CFCI ₃
	R = Me X= S -66,60 R = H X= S -66,61 R = Me X= O -66,59 R = He X= O -66,61
	-58,1
	-59,3
	-65,3
	-64,3



El análisis del trifluorometilestilbeno (**2**) obtenido por Koβmehl mediante cristalografía de rayos X, comprobó la existencia de una interacción similar a la que ocurre en los puentes de hidrógeno, entre uno de los átomos de flúor y el hidrógeno vinílico. La distancia observada entre los dos núcleos (224 pm) es menor que la suma de los radios de Van der Waals (255 pm).⁸⁵

2.7 Aproximaciones a la síntesis de ácido (2*E*,4*E*,6*E*)-3-metil-8,8,8-trifluoro-7-(2,2,4,4-tetrametilcroman-6-il)-2,4,6-octatrienoico (**1**)

La síntesis del ácido 9-*cis*-retinoico reportada por Boehm y colaboradores,⁹⁹ involucra la reducción del (2*Z*,4*E*)-3-metil-5-(2,6,6-trimetilciclohexen-1-il)penta-2,4-dienoato de etilo (**36**) al alcohol alílico (**37**), el cual fue tratado posteriormente con dióxido de manganeso activado para la obtención del aldehído (**38**). El acoplamiento, en una reacción Horner-Emmons, de **38** con el fosfonato (**7**) dio como producto el éster metílico del 9-*cis*-RA (ver Esquema 12).



Esquema 12. Método descrito por Boehm y colaboradores⁹⁹ para la obtención del 9-cis-RA

Esta serie de reacciones se adaptó partiendo del (*E*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (**12**) para tratar de obtener el éster metílico del compuesto meta (**6**) (ver Esquema 11).

Para la obtención del alcohol alílico **40** se efectuó la reducción del éster (*E*)-12 con LiAlH₄. Se produjo un aceite incoloro que solo mostró una mancha en TLC. En ese momento, la identidad química de este compuesto no pudo ser verificada pues el producto demostró ser inestable, inclusive bajo almacenamiento a -20°C. Pocos días después el análisis por TLC presentaba varias manchas.

El producto de la reacción fue sometido inmediatamente a la oxidación con MnO₂ activado, generando mezclas que demostraron ser muy complejas al ser analizadas por TLC. El producto crudo no presentó señales características de un aldehído ni de hidrógenos vinílicos al ser analizado por ¹H-RMN (Ver Figura 25). El dióxido de manganeso activado fue preparado justo antes de efectuar la oxidación del producto de la reducción. Se siguió el método descrito por Hudlicky¹⁰⁰ y el reactivo fue probado oxidando alcohol cinámico antes de probarlo con el material sintético valioso. No hay suficientes datos para explicar con certeza la razón de la no obtención del aldehído **41**, se puede suponer, ante la falta de datos que confirmen la obtención del alcohol alílico **40**, que este no es el producto de la reacción de reducción. Otra posibilidad es la descomposición del alcohol en el medio de reacción durante la oxidación o la inestabilidad del aldehído **28**. Adicionalmente, se trató con PCC el producto de reducción de **22**. Se obtuvo una mezcla de reacción muy compleja, según el análisis por TLC, similar a la anterior.

Es posible que la reducción de ésteres α,β -insaturados, β -trifluorometilados requiera condiciones de reacción diferentes a las de los

análogos metilados. En una revisión de los métodos de obtención de retinoides trifluorometilados, se encontró que la reducción de este tipo de ésteres puede efectuarse con DIBALH o LiAlH₄, y no hay indicaciones específicas o limitaciones con respecto al agente reductor.¹⁰¹ Sin embargo no se encontró ningún caso en el que el grupo trifluorometilo estuviera α al anillo aromático.

Ante esta situación se decidió escoger otra aproximación para obtener el heteroarotinide, que involucra la formación de la sal de fosonio **42** a través de la reacción del alcohol alílico con hidrobromuro de trifenilfosfina. El producto de la reacción de reducción de (*E*)-**22** fue tratado inmediatamente con hidrobromuro de trifenilfosfina disuelto en metanol. Después de eliminar el disolvente, el sólido incoloro recuperado fue tratado con *n*-BuLi pero no se presentó el cambio de color característico de este tipo de reacciones, que se produce cuando se genera el iluro altamente conjugado. De todas formas se agregó el (*E*)-3-metil-4-oxo-2-butenato de metilo (**9**) pero el análisis de la mezcla de reacción por TLC no reveló la aparición de los productos esperados, con poca polaridad y visibles a 365 nm.

Además de la inestabilidad del producto de reducción de **22**, que puede haber influido significativamente en el poco éxito de las reacciones posteriores, los recursos espectroscópicos disponibles en ese momento no permitieron determinar las causas de los resultados obtenidos. Sin embargo, se cometió un error importante en la escogencia de las secuencias sintéticas, debido a que las dos requieren la obtención de un mismo compuesto (**40**) para ser completadas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se sintetizaron, aislaron e identificaron dos compuestos no reportados previamente en la literatura, el (*E*) y el (*Z*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (**12**). Se obtuvo un rendimiento del 8% en una secuencia de 5 pasos.

La hipótesis respecto a la estereoquímica de la reacción Horner-Emmons en la que participa la (2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-trifluorometilcetona (**14**) se confirmó. Contrario a lo esperado con las condiciones de reacción empleadas, el grupo trifluorometilo dirige la reacción hacia la obtención del producto *E*.

Se adaptaron las secuencias descritas por Igbal y colaboradores⁸⁸ y por Solladié y Girardin,⁸⁹ para la obtención de (*E/Z*)-3-etoxicarbonil-2-metilpropen-2-enilfosfonato de dietilo (**7**) y (*E*)-3-metil-4-oxo-2-butenato de metilo (**9**), dos reactivos muy importantes para la preparación de retinoides.

No se logró alcanzar la síntesis de ácido (*2E,4E,6E*)-3-metil-8,8,8-trifluoro-7-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2,4,6-octatrienoico utilizando dos rutas sintéticas. La inestabilidad del producto de reducción de (*E*)-**12** es la causa probable del fracaso de las reacciones posteriores. Debe verificarse la identidad química del producto obtenido y evaluar otras posibilidades, que involucren química de grupos protectores, como alternativa para la construcción de la cadena poliénica.

PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión se reportan sin corregir y fueron medidos en un aparato Fisher-Johns. Para la medición de espectros UV se empleó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 PC. Los espectros IR fueron medidos en un espectrómetro FT-IR 8101 Shimadzu. Los espectros de RMN de 90 MHz fueron medidos en un espectrómetro Jeol FQ-90, los de 300 MHz en un Bruker ARX-300, los de 400 MHz en un Varian-Mercury 400, los de 500 MHz en un Varian-Unity 500 y los de 600 MHz en un Bruker AMX-600.

El éter etílico se destiló de KOH y se reflujo de sodio/benzofenona en atmósfera de nitrógeno y se destiló antes de usar. El THF se destiló de LiAlH_4 y se reflujo de sodio/benzofenona en atmósfera de nitrógeno y se destiló antes de usar. El MeOH, EtOH y las mezclas benceno/MeOH fueron secadas con tamices moleculares de 4Å.

Obtención de ácido 3-metil-2-butenoico (16)⁹⁰

En un balón de fondo redondo (1 L) se disolvió 125 g (0,57 mol) de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 65% (cloro para piscina) en 500 mL de H_2O y se añadió una disolución compuesta por 87,5 g (0,63 mol) de K_2CO_3 y 25 g (0,45 mol) de KOH en 250 mL de H_2O . Se formó un gel, el cual se agitó hasta que desapareció. Se filtró la disolución al vacío, directamente hacia un balón de tres bocas (1 L), colocado dentro de un baño H_2O /hielo sobre un agitador magnético. El balón estaba provisto de pastilla de agitación, adaptador con termómetro, condensador de espiral enfriado con H_2O a 0°C y un embudo de adición. Cuando la disolución

alcanzó 10°C se adicionaron 30 mL (0,26 mol) de óxido de mesitilo (**15**) y 50 mL de dioxano. Se retiró el H₂O/hielo del baño y la mezcla comenzó a reflujar 10 minutos después. Se adicionó H₂O al baño para disminuir la temperatura y regular la intensidad del reflujo. Se retiró el H₂O y se agitó hasta que la mezcla llegó hasta temperatura ambiente (4,5 h). Se enfrió a 0°C la mezcla de reacción y se adicionaron 1 g de Na₂S₂O₅ y 50 mL de H₂SO₄ 50%. La disolución resultante fue extraída con éter etílico (8 x 50 mL). La disolución orgánica se secó sobre CaSO₄ anhidro. Luego de la filtración concentró al vacío mediante un evaporador rotatorio y el residuo se destiló (103°C/20 mmHg) para obtener un sólido amarillo (10.70 g 0,11 mol, 43 %). Este sólido se recristalizó de H₂O, obteniéndose 9.0 g (0,09 mol, 35%) de **16** como un sólido blanco cristalino, p.f. = 64-65°C, (lit.⁸⁶ 68°C).

Obtención de 3-metil-2-butenato de etilo (17)

En un balón de fondo redondo (250 mL) provisto con una pastilla de agitación, un extractor soxhlet con 12 g de tamices moleculares 4Å y un condensador de espiral con entrada de N₂, se colocaron 5,1 g (50 mmol) de ácido 3-metil-3-butenóico (**16**), 75 mL de EtOH y 0,5 mL de H₂SO₄ 98%. La mezcla se calentó a reflujo utilizando una manta de calentamiento por 24 h. Al enfriar, se añadió una disolución saturada de NaHCO₃ hasta lograr un pH ≈7 (papel indicador). La disolución se concentró al vacío hasta un volumen de 25 mL. Luego se agregó H₂O (25 mL) y éter de petróleo 60-80 (25 mL). La fase acuosa se extrajo con éter de petróleo 60-80 (4 x 25 mL). Las fase orgánica combinada se lavó con NaHCO₃ saturado (25 mL), H₂O (25 mL) y NaCl saturado (25 mL). La disolución orgánica resultante se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío

hasta un volumen de 10 mL. La destilación del residuo generó 4.00 g (32 mmol) 63% de **17** como un aceite amarillo (116-118°C/54 mmHg), IR (película) 1710 cm^{-1} (ν C=O); $^1\text{H-RMN}$, 90 MHz (CDCl_3 , δ ppm): 1,2 (3H, t, CH_2CH_3), 1,8 (3H, s, $=\text{CCH}_3$), 2,1 (3H, s, $=\text{CCH}_3$), 4,1 (2H, q, CH_2CH_3), 5,6 (1H, s, $\text{CH}=\text{}$)

Obtención de (*E/Z*)-4-bromo-3-metil-2-butenoato de etilo (18**)⁸⁸**

En un balón de fondo redondo de 25 mL, provisto con pastilla de agitación y un condensador con entrada de N_2 , se colocaron 1,02 g (8 mmol) de 3-metil-2-butenoato de etilo, 1,45 g (8 mmol) de *N*-bromosuccinimida, 3 cristales de AIBN, 8 mL de CCl_4 . La mezcla se calentó a reflujo utilizando una manta de calentamiento por 3 h. Se suspendió el calentamiento y la mezcla a temperatura ambiente se filtró al vacío para eliminar la succinimida. Se concentró al vacío para obtener 1,53 g (8 mmol, 100%) de un aceite incoloro que corresponde a una mezcla 45:55 de (*E*) y (*Z*) 4-bromo-3-metil-2-butenoato de etilo (**18**). $^1\text{H-RMN}$, 90 MHz (CDCl_3 , δ ppm): 1,3 (3H, t, CH_2CH_3), 2,0 ; 2,3 (3H, d, $=\text{CCH}_3$), 4,0 ; 4,6 (2H, s, $=\text{CCH}_2\text{Br}$), 4,1 (2H, q(superpuestos), CH_2CH_3), 5,7 ; 5,9 (1H, br s, $\text{CH}=\text{}$). El aceite se utilizó en el siguiente paso sin ninguna purificación.

Obtención de (*E/Z*) 3-etoxicarbonil-2-metilpropen-2-enilfosfonato de dietilo (7**)⁸⁸**

En un balón aperado de dos bocas (5 mL), provisto de pastilla de agitación, un septum y un condensador con entrada de N_2 , se colocaron 1,35 g (8 mmol) de trietilfosfito. El balón fue puesto dentro de un baño de glicerina a 90°C y se adicionaron 1,43 g (7 mmol) de (*E/Z*) 4-bromo-3-metil-2-butenoato de etilo (**18**)

utilizando una jeringa a través del septum. La mezcla se calentó a reflujo con agitación por 3 h, se enfrió a temperatura ambiente y se aplicó vacío (1 mmHg) para eliminar el bromuro de etilo y la trietilfosfito sin reaccionar. Se obtuvo 1,68g (6 mmol, 75%) de un aceite amarillo que corresponde a una mezcla 50:50 de (*E*) y (*Z*) 3-etoxicarbonil-2-metilpropen-2-enilfosfonato de dietilo (**7**) con un tercer componente no identificado (ver integraciones de los grupos etilo). ¹H-RMN, 90 MHz (CDCl₃, δ ppm): 1,3 (12H, m, CH₂CH₃), 2,0 ; 2,3 (3H, dd, =CCH₃), 2,7 ; 3,5 (2H, d, =CCH₂P), 4,1 (8H, q(superpuestos), CH₂CH₃), 5,8 (1H, s(superpuestos), CH=). El aceite se utilizó en el siguiente paso sin ninguna purificación.

Obtención de (*E/Z*)-4,4-dimetoxi-3-metil-2-butenato de metilo (22**)⁹⁰**

En un balón de tres bocas (100 mL), provisto de pastilla de agitación, un tapón de vidrio, un embudo de adición con igualador de presión y un condensador con entrada de N₂, se colocaron 3,0 g (90 mmol) de sodio metálico. Se adicionó una En una hora se adicionó 40 mL de mezcla MeOH/benceno 3:2 gota a gota. Se agitó hasta que se disolvió todo el sodio. Se colocó en el embudo de adición una mezcla de 1,1-dimetilacetal de piruvaldehído (**21**) (10,0 g 80 mmol) y fosfonoacetato de trimetilo (**13**) (17,0 g, 90 mmol). Se adicionó gota a gota por 45 minutos y se agitó la mezcla por 48 horas bajo atmósfera de N₂. Se adicionó H₂O (25 mL) y se extrajo con éter etílico (3 x 25 mL). La fase orgánica se lavó con NaCl saturado y se dejó sobre Na₂SO₄ anhidro. Se concentró al vacío para obtener 13,50 g (77 mmol, 96%) de un aceite incoloro que corresponde a una mezcla de (*E*) y (*Z*)-4,4-dimetoxi-3-metil-2-butenato de metilo. IR(película) 1710 cm⁻¹ (ν C=O) El aceite se utilizó en el siguiente paso sin ninguna purificación.

Obtención de (*E*)-3-metil-4-oxo-2-butenato de metilo (**9**)⁹⁰

En un balón de tres bocas (200 mL), provisto de pastilla de agitación, un tapón de vidrio, un embudo de adición con igualador de presión y un condensador con entrada de N₂, se colocaron 50 mL de H₂SO₄ 35%. Se enfrió en un baño a 0°C y se añadieron 50 mL de éter etílico. Se añadieron gota a gota 6,75g (0,038 mol) de (*E/Z*)-4,4-dimetoxi-3-metil-2-butenato de etilo (**22**) (30 minutos). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 36 horas. La fase acuosa se extrajo con éter (3 x 25 mL) y la fase orgánica combinada se lavó con NaHCO₃ saturado (3 x 25 mL), NaCl saturado (50 mL) y agua (50 mL). Se concentró al vacío par obtener **9** (2,10g, 0,014 mol, 36%) como un aceite amarillo, IR(película) 1701 cm⁻¹, 1725 cm⁻¹ (ν C=O).

Síntesis de 4-metil-4-tiofenil-2-pentanona (**24**)⁸⁶

En un balón de tres bocas (500 mL), provisto de condensador de espiral con entrada de N₂, pastilla de agitación y colocado dentro de un baño H₂O/hielo, se preparó una disolución de 30 mL (32,19g, 0.29 mol) de tiofenol (**23**), 28,04 g (0.28 mol) de óxido de mesitilo (**15**) y 100 mL de CHCl₃. Se añadieron 2 mL de trietilamina, se agitó mezcla por 1h y se retiró el baño Se calentó a reflujo utilizando una manta de calentamiento por 24 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar, se transfirió a un embudo separador (500 mL) y se lavó el balón con éter etílico (25 mL). La fase etérea se lavó con NaOH 10% (2 x 50 mL) y la fase acuosa se extrajo con éter (3 x 50 mL). Los extractos etéreos fueron combinados, lavados con H₂O (2 x 50 mL), NaCl saturado (2 x 50 mL) y secados sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración, se concentró al vacío para obtener **24**

como un líquido incoloro (46,7g, 83%). p.e.: 134-135°C/5 mmHg), IR(película) 1713 cm^{-1} (ν C=O); ^1H -RMN, 90 MHz (CDCl_3 , δ ppm): 1,4 (6H, s, $(\text{CH}_3)_2$), 2,1 (3H, s, COCH_3), 2,7 (2H, s, CH_2), 7,5 (5H, m, ArH)

Síntesis de 2,4-dimetil-4-tiofenil-2-pentanol (**25**)⁸⁶

En un balón de tres bocas (500 mL) provisto con embudo de adición con igualador de presión, condensador de espiral con entrada de N_2 , septum y una pastilla de agitación, se colocaron 12,0 g (0,50 mol) de Mg y 50 mL de éter anhidro. En el embudo de adición se preparó una disolución de CH_3I (30 mL, 68 g, 0,48 mol) en éter seco (125 mL). Se adicionaron 10 mL gota a gota hasta que se notó turbidez en la disolución. El resto se añadió durante dos horas y al final se agregaron 3 mL adicionales de CH_3I por el embudo de adición. Se adicionó una disolución de **24** (46,0g, 0,22 mol) éter anhidro (100 mL) durante 30 minutos. La solución fue agitada por 48 h y vertida sobre 300 g de hielo. La disolución resultante fue neutralizada con H_2SO_4 5%. La fase etérea fue separada y la acuosa extraída con éter (6 x 50 mL). Las fase orgánica combinada se secó con Na_2SO_4 anhidro y los disolventes removidos al vacío. Se obtuvo **14** (47,10 g, 0,21 mol, 95%) como un líquido incoloro que se usó sin ninguna purificación. IR (película) 3588 cm^{-1} (ν O-H)

Síntesis de 2,2,4,4-tetrametil-2-tiocromano (26)

En un balón de fondo redondo (1L) provisto de condensador Graham con entrada para N₂ y dos tapones de vidrio y pastilla de agitación, se mezclaron 300 mL de benceno, 46,5g (0,21 mol) de 2,4-dimetil-4-tiofenil-2-pentanol (**25**), 34,0 g (0,24 mol) de P₂O₅ y 25 mL de H₃PO₄ 85%. La mezcla se calentó a reflujo utilizando una manta de calentamiento por 24 h. La fase orgánica fue decantada a un embudo separador (1L) y el residuo viscoso lavado con éter (4 x 100 mL). Las fases orgánicas fueron combinadas, lavadas con NaHCO₃ saturado (4 x 100 mL), H₂O (4 x 100 mL), NaCl saturado (4 x 100 mL) y secados sobre Na₂SO₄ anhidro. Mediante filtración y evaporación al vacío se obtuvo 49,7 g de un líquido amarillento. Se empacó una columna VLC (cromatografía líquida al vacío)⁹⁵ con 80g de gel de sílice Merck 60 GF₂₅₄ y se eluyó con 5 fracciones de 100 mL de hexano. Al concentrar al vacío se obtuvo **26** (35,73 g, 0,17 mol, 77%) como un aceite amarillo en las fracciones 2 y 3. R_f = 0,6 (hexano/EtOAc 1:1); IR (película): 3030 cm⁻¹ (δ C-H); ¹H-RMN, 90 MHz (CDCl₃, δ ppm): 1,4 (12H, s(superpuestos), CH₃), 2,0 (2H, s, CH₂), 7,0-7,5 (4H, m, ArH)

Síntesis de (2,2,4,4-tetrametil-2-tiocroman-6-il)-trifluorometilcetona (**14**)⁸⁶

En un balón de tres bocas (50 mL) se pesaron 12,50 g de trifluoroacetato de sodio. Se añadió una pastilla de agitación, se conectó al balón a un embudo de adición con igualador de presión, una llave de entrada de N₂ y un condensador de tipo Friedrichs. La salida del condensador estaba conectada, por medio de una manguera Tygon[®], a la salida de uno de los dos condensadores de hielo

seco unidos a un balón aperado de dos bocas de 10 mL. La salida del segundo condensador estaba conectada a un burbujeador con glicerina.

Se hizo pasar N_2 a través del sistema, se colocó hielo seco e isopropanol ($-80^\circ C$) en los condensadores y se adicionaron 15 mL de $POCl_3$ durante 15 minutos. Se calentó a reflujo la mezcla durante 30 minutos y se obtuvo aproximadamente 8 mL de cloruro de trifluoroacetilo en el balón de dos bocas.

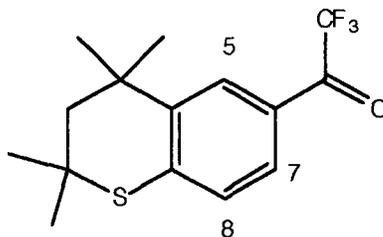
Se conectó la salida del segundo condensador a un balón de tres bocas de 250 mL, en el que se habían colocado 8,00 g (0,060 mol) de $AlCl_3$, 5,00 g (0,024 mol) de **26** y 40 mL de CS_2 . El balón estaba provisto de un condensador de hielo seco grande, que a su vez estaba conectado a un burbujeador con glicerina.

Desde el balón aperado de dos bocas de 10 mL se destilaron 8 mL de cloruro de trifluoroacetilo, al retirar el hielo seco/isopropanol del segundo condensador. y haciendo pasar una corriente de N_2 . Se agitó la mezcla por 2 h y se vertió en un beaker con hielo. La fase acuosa fue extraída con éter (3 x 25 mL) y las fases orgánicas se lavó con una disolución de NaCl saturado y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro.

Mediante filtración y evaporación de los disolventes al vacío se obtuvo 6,84 g de un aceite café. Se empacó una columna de 88 cm de alto y 1,6 cm de diámetro con 100g de gel de sílice 40 (70-230 mallas) y hexano/EtOAc 40:1(175 mL). Se eluyó con hexano/EtOAc 40:1(300 mL), hasta que se confirmó la salida del producto de partida $R_f = 0,6$ (hexano/EtOAc 1:1). Se continuó la elución con hexano/EtOAc 30:1.

Se obtuvo 1,82g (0,006 mol, 25%) de (2,2,4,4-tetrametilcroman-6-il)-trifluorometilcetona (**14**) como un aceite amarillo. $R_f = 0,65$ (hexano/EtOAc 40:1); IR (película) 1715 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$), 1H -RMN, 90 MHz ($CDCl_3$, δ ppm): 1,4 (12H, s

(superpuestos) CH_3), 2,0 (2H, s, CH_2), 7,2 (1H, d, **H 8**), 7.8(1H, br d, **H 7**), 8.1 (1H, br s, **H 8**)



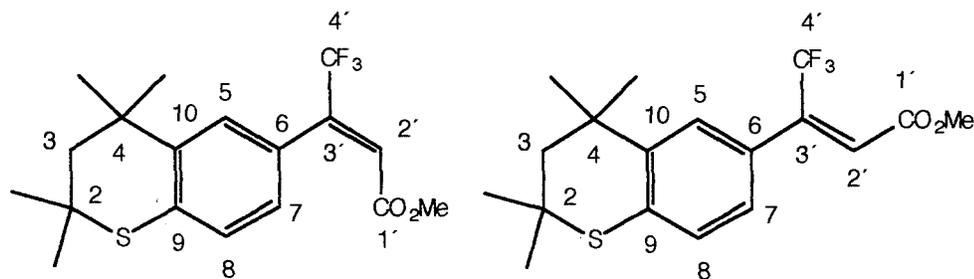
14

Síntesis de 3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-4,4,4-trifluoro-2-butenato de metilo (12)

En un balón aperado de dos bocas de 10 mL, provisto de una pastilla de agitación, un condensador con entrada de N_2 y un embudo de adición con igualador de presión, se colocaron 0,45 g (0,0025 mol) de fosfonoacetato de trimetilo, 0,50 g (0,0017 mol) de (2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-trifluorometilcetona (**14**) y 2 mL de benceno seco. Utilizando una jeringa se transfirieron 3 mL (0,002 mol) de una suspensión de MeO^-Na^+ / MeOH /benceno (0,25g de Na en 15mL de benceno/ MeOH 3:2 (reflujado por 5h en un soxhlet con tamices moleculares 3Å) al embudo separador. Se adicionó el metóxido de sodio gota a gota durante 1h. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 h, se vertió sobre un beaker con 30 g de hielo. La fase acuosa fue extraída con éter (3 x 20 mL) las fases orgánicas combinadas, lavadas con H_2O (2 x 30 mL) y secadas sobre Na_2SO_4 anhidro. Mediante filtración y evaporación al vacío se obtuvo 0,53 g de un aceite café que fue separado por cromatografía de columna. Se eluyó con hexano/ EtOAc 40:1 hasta que salió el producto de

partida ($R_f = 0,65$, hexano/EtOAc 40:1), y luego con hexano/EtOAc 30:1). El producto principal, (*E*)-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-4,4,4-trifluoro-2-butenoato de metilo, (0,242 g, 40%) fue un aceite café. $R_f=0,42$ (hexano/EtOAc 10:1); UV(λ_{max}): 306 nm (hexano); $^1\text{H-RMN}$, 500 MHz (CDCl_3 , δ ppm): 1,41 (6H, s, $\text{C4}(\text{CH}_3)_2$), 1,46 (6H, s, $\text{C2}(\text{CH}_3)_2$), 2,00 (2H, s, CH_2), 3,64 (3H, s, COCH_3), 6,59 (1H, q, $\text{C}=\text{CH}$), 7,02 (1H, dd, 8Hz, 2 Hz, **H(7)**) 7,15 (1H, d 8Hz, **H(8)**), 7,31 (1H, d, 2 Hz, **H(5)**)

$^{13}\text{C-RMN}$, 500 MHz (CDCl_3 , δ ppm): 31,57 (s, $(\text{CH}_3)_2\text{C}(2)$), 32,58 (s, $(\text{CH}_3)_2\text{C}(4)$), 35,46 (s, $\text{C}(4)(\text{CH}_3)_2$), 42,19 (s, $\text{C}(2)(\text{CH}_3)_2$), 51,95 (s, COCH_3), 54,13 (s, CH_2), 121,51 (s, **C(6)**), 123,62 (q, **C(2')**), 125,80 (s, **C(7)**), 127,59 (s, **C(5)**), 127,66 (s, **C(8)**), 134,99 (s, **C(9)**), 141,95 (q, **C(3')**), 142,35 (s, **C(10)**), 164,86 (s, **C(1')**)



Además se obtuvo (*Z*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenoato de metilo (0,078 g, 13%) como un sólido crema. $R_f=0,33$ (hexano/EtOAc 10:1); UV(λ_{max}): 306 nm (hexano); $^1\text{H-RMN}$, 500 MHz (CDCl_3 , δ ppm): 1,40 (6H, s, $\text{C4}(\text{CH}_3)_2$), 1,45 (6H, s, $\text{C2}(\text{CH}_3)_2$), 2,00 (2H, s, CH_2), 3,84 (3H, s, COCH_3), 6,36 (1H, q, $\text{C}=\text{CH}$), 7,10 (1H, dd, 8Hz, 2 Hz, **H(7)**) 7,16 (1H, d 8Hz, **H(8)**), 7,41 (1H, d, 2 Hz, **H(5)**)

$^{13}\text{C-RMN}$, 500 MHz (CDCl_3 , δ ppm): 31,63 (s, $(\text{CH}_3)_2\text{C}(2)$), 32,49 (s, $(\text{CH}_3)_2\text{C}(4)$), 35,58 (s, $\text{C}(4)(\text{CH}_3)_2$), 42,29 (s, $\text{C}(2)(\text{CH}_3)_2$), 52,45 (s, COCH_3), 54,06 (s, CH_2),

129,72(s, **C(6)**), 126,05 (q, **C(2')**), 125,11 (s, **C(7)**), 126,17 (s, **C(5)**), 128,04 (s, **C(8)**), 135,46 (s, **C(9)**), 138,00 (q, **C(3')**), 142,93 (s, **C(10)**), 165,19 (s, **C(1')**)

Reducción de (*E*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (12)

En un balón de dos bocas (10 mL) provisto de una pastilla de agitación, una entrada de nitrógeno y un tubo de adición de sólidos con 25 mg de LiAlH_4 , se colocaron 50 mg de (*E*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (**22**), 4 mL de THF anhidro. Se colocó el balón dentro de un baño hielo seco/acetona, el LiAlH_4 se adicionó lentamente y se agitó hasta el baño llegó a temperatura ambiente (2 h). Se añadieron gota a gota 4 mL de agua. Cuando cesó la evolución de hidrógeno se transfirió la mezcla a un embudo separador. La fase acuosa fue lavada con éter (3 x 5 mL) y las fases orgánicas combinadas, lavadas con agua (2 x 5 mL) y secadas sobre MgSO_4 anhidro. Mediante filtración y evaporación de los disolventes (evaporador rotatorio) se obtuvo 41 mg un aceite amarillo que se usó en el siguiente paso sin ninguna purificación. En TLC se observaron dos manchas hexano/EtOAc 4:1. La mancha de mayor intensidad presentó un $R_f = 0,5$ y la de menor intensidad un $R_f = 0,2$. El reactivo de partida no estaba presente.

Oxidación del producto de reducción de (*E*)-4,4,4-trifluoro-2-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-butenoato de metilo (12)

El crudo obtenido en el paso anterior se disolvió en CH_2Cl_2 en un balón de 10 mL. Se añadieron 300 mg de MnO_2 activado y una pastilla de agitación, se

colocó una entrada de N₂ y se agitó la mezcla a temperatura ambiente por 8 horas. Se efectuó una filtración al vacío a través de Kieselghur y se evaporó el disolvente al vacío. El análisis por RMN del producto obtenido no presentó señales características de un aldehído ni del hidrógeno vinílico (ver figura 25).

Reacción del producto de reducción de (*E*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametilcroman-6-il)-2-butenoato de metilo (12) con hidrobromuro de trifenilfosfina.

En un balón de tres bocas se colocaron 111 mg del producto de reducción de (*E*)-22, 125 mg de hidrobromuro de trifenilfosfina y 5 mL de MeOH. Se añadió una pastilla de agitación y se agitó la mezcla bajo atmósfera de N₂ por 24h. Se evaporó el disolvente en el evaporador rotatorio y se obtuvo un sólido blanco amorfo. Se adicionaron 15 mL de éter anhidro y se agitó bajo atmósfera de N₂ por 30 minutos. Se filtró el sólido rápidamente, se lavó con éter anhidro (2x5 mL) y se colocó en una desecadora al vacío. Se obtuvo 98 mg (0.16 mmol) de un sólido blanco que se usó directamente en el siguiente paso.

Se añadió una pastilla de agitación, se evacuó el sistema por 30 minutos. Se conectó al sistema una entrada de N₂ y se añadió con jeringa éter seco (3 mL). Se enfrió en un baño acetona/CO₂ y se adicionaron 0.15 mL de n-BuLi 1.58M (0.24 mmol) y la mezcla presentó turbidez pero no hubo cambio de color. Se tapó el balón con papel aluminio y se añadieron 26 mg de **11** disueltos en 2 mL de éter anhidro (0.20 mmol). Después de 48h el análisis por TLC de la mezcla no reveló la presencia de productos menos polares que el producto de la reducción de (*E*)-22.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boehm, M.F.; Heyman, R.A.; Patel, S.; Stein, R.B.; Nagpal, S. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **1995**, *4*, 593.
2. Shroot, B.; Michel, S. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30(supp.)*, 487s.
3. Cornic, M.; Agadir, A.; Degos, L.; Chomienne, C. *Anticanc. Res.* **1994**, *14*, 2339.
4. Miller, W.H., Jr.; Jakubosky, A.; Tong, W.P.; Miller, V.A.; Rigas, J.R. Benedetti, F.; Gill, G.M, Truglia, J.A.; Ulm, E.; Shirley, M. Warrel, R.P., Jr. *Blood* **1995**, *85*, 3021.
5. Blomhoff, R.; Green, M.H.; Berg, T. Norum, K.R. *Science* **1990**, *250*, 399.
6. Guiguère, V. *Endocr. Rev.* **1994**, *15*, 61.
7. Horst, L.R.; Reinhardt, T.A.; Goff, J.P.; Nonnecke, B.J.; Gambhir, V.K.; Fiorella, P.D.; Napoli, *Biochemistry* **1995**, *34*, 1203.
8. Heyman, R.A.; Mangelsdorf, D.J.; Dyck, J.A.; Stein, R.B.; Eichelle, G.; Evans, R.M.; Thaller, C. *Cell* **1992**, *68*, 397.
9. Wolf, G. *Physiol. Rev.* **1984**, *64*, 873.
10. Saas, J.O.; Tzimas, G.; Nau, H. *Life Sci.* **1994**, *54*, 69.
11. Pijnapple, W.W.; Hendriks, H.F.; Folkers, G.E.; Van den Brink, C.E.; Dekker, E.J. ; Edelenbosch, C.; Van Der Saag, P.T.; Durston, A.J. *Nature* **1993**, *366*, 340.
12. Blumberg, B.; Bolado, J.Jr.; Derguini, F.; Craig, A.G.; Moreno, T.A.; Chakravarti, D.; Heyman, R.A.; Buck, J.; Evans, R.M. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 4873.
13. Achkar, C.C.; Derguini, F.; Blumberg, B.; Langston, A.; Levin, A.A.; Speck, J.; Evans, R.M.; Bolado, J.Jr.; Nakanishi, K.; Buck, J. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 4879.
14. Sietsema, W.K.; DeLuca, M.F. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4265.

15. Napoli, J.M.; Khalil, H.; McCormick, A.M. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1942.
16. Skare, K.L.; Schnoes, H.K.; DeLuca, H.F. *Biochemistry* **1982**, *21*, 3308.
17. Tzimas, G.; Collins, M.D.; Nau, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1301*, 1.
18. Buck, J. Grün, F.; Derguini, F.; Chen, Y.; Kimura, S.; Noy, N.; Hämmerling, U. *J. Exp. Med.* **1993**, *178*, 675.
19. Allenby, G.; Bocquel, M.T.; Saunders, M.; Kazmer, S. Speck, J.; Rosenberger, M.; Lovey, A.; Kastner, P.; Grippo, J.F.; Chambon, P.; Levin, A.A. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 30.
20. Petkovich, M.; Brand, N.J.; Krust, A.; Chambon, P. *Nature* **1987**, *330*, 444.
21. De Thé, H.; Marchio, A.; Tiollais, P.; Dejean, A. *Nature* **1987**, *330*, 667.
22. Guiguère, V.; Ong, E.S.; Segui, P.; Evans, R.M. *Nature* **1987**, *330*, 625.
23. Benbrook, D.; Lernhart, E.; Pfahl, M. *Nature* **1988**, *331*, 669.
24. Mangelsdorf, D.J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schütz, G.; Umesomo, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; Evans, R.M. *Cell* **1995**, *83*, 835.
25. Mangelsdorf, D.J.; Evans, R.M. *Cell* **1995**, *83*, 841.
26. La Vista-Picard, N.; Hobbs, M.P.D.; Pfahl, M.; Dawson, M.I.; Pfahl, M. *Moll. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 4137.
27. Krust, A.; Kastner, P.; Petkovich, M.; Zelent, A.; Chambon, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5310.
28. Zelent, A.; Krust, A.; Petkovich, M.; Kastner, P.; Chambon, P. *Nature* **1989**, *339*, 715.
29. Brand, N.; Petkovich, M.; Krust, A.; Chambon, P.; De Thé, H.; Marchio, A.; Tiollais, P.; Dejean, A. *Nature* **1988**, *332*, 850.
30. Hallembeck, P.L.; Minucci, S.; Lippoldt, R.; Phyllaier, M.; Horn, V.; Ozato, K.; Nikkodem, V.M. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 10503.

31. Zhang, X.; Hoffmann, B.; Tran, P.B-V.; Graupner, G.; Pfahl, M. *Nature* **1992**, *355*, 441.
32. Kliewer, S.A.; Umesomo, K.; Mangelsdorf, D.A.; Evans, R.M.; *Nature* **1992**, *355*, 446.
33. Perlmann, T.; Umesomo, K.; Rangarajan, P.N.; Forman, B.M.; Evans, R.M. *Mol. Endo.* **1996**, *10*, 958.
34. Grignani, F.; Fagioli, M.; Alcalá, M.; Longo, L.; Pandolfi, P.P.; Donti, E.; Biondi, A.; Lo Cocco, F.; Grignani, F. Pelicci, P.G. *Blood* **1994**, *83*, 10.
35. Parkinson, D.; Smith, M.A. *Ann. Intern. Med.* **1992**, *117*, 338.
36. Avvisati, G.; Lo Coco, F.; Diverio, D.; Falda, M.; Ferrara, F.; Lazzarino, M.; Russo, D.; Petti, M.C.; Mandelli, F. *Blood* **1996**, *88*, 1390.
37. Benedetti, F.; Miller, W.H.; Rigas, J.; Tong, W.; Ulm, E.; Truglia, J.; Gill, G.; Warrel, R.P.Jr. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1995**, *36*, 1445.
38. Nagy, L.; Thomázy, V.A.; Shipley, G.L.; Fésüs, L.; Lamph, W.; Heyman, R.A.; Chandraratna, R.; Davies, P.J.A. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 3540.
39. Benbrook, D.M.; Madler, M.M.; Spruce, L.W.; Birckbichler, P.J.; Nelson, E.C.; Subramanian, S.; Weerasekare, G.M.; Gale, J.B.; Patterson, M.K.Jr.; Wang, B.; Wang, W.; Lu, S.; Rowland, T.C.; DiSilvestro, P.; Lindamood III, C.; Hill, D.L.; Berlin, K.D. *J. Med. Chem.* **1997**, *39*, 3567.
40. Kimbrough-Green, C.K.; Griffiths, C.E.M.; Finkel, L.J.; Hamilton, T.A.; Bulengo-Ransby, S.M.; Ellis, C.N.; Voorhees, J. *J. Arch. Dermatol.* **1994**, *130*, 727.
41. Lehman, J.M.; Dawson, M.I.; Hobbs, P.D.; Hussmann, M.; Pfahl, M. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 4804.
42. Bernard, B.A.; Bernardon, J.M.; Delescluse, C.; Martin, M.; Lenoir, M.C.; Maignan, J.; Charpentier, B.; Pilgrim, W.R.; Reichert, U.; Shroot, B. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1992**, *186*, 977.

43. Apfel, C.; Bauer, F.; Crettaz, M.; Forni, L.; Kamber, M.; Kaufmann, F.; LeMotte, P.; Pirson, W.; Klaus, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7129.
44. Charpentier, B.; Benardon, J.M.; Eustache, J.; Millois, C.; Martin, B.; Michel, C.; Shroot, B. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4993.
45. Nagpal, S.; Athanikar, J.; Chandraratna, R.A.S. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 923.
46. Vuligonda, V.; Lin, Y.; Chandraratna, R.A.S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 213.
47. Teng, M.; Duong, T.T.; Klein, E.S.; Pino, M.E.; Chandraratna, R.A.S. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3035.
48. Johnson, A.T.; Klein, E.S.; Wang, L.; Pino, M.E.; Chandraratna, R.A.S. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 5027.
49. Johnson, A.T.; Klein, E.S.; Gillet, S.J.; Wang, L.; Song, T.K.; Pino, M.E.; Chandraratna, R.A.S. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4764.
50. Teng, M.; Duong, T.T.; Johnson, A.T.; Klein, E.S.; Wang, L.; Khalifa, B.; Chandraratna, R.A.S. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2445.
51. Muccio, D. D.; Brouillette, W.J.; Breitman, T.R.; Taimi, M.; Emanuel, P.D.; Zhang, X.; Cheng, G.; Sani, B.P.; Venepally, P.; Reddy, L.; Alam, M.; Simpson-Herren, L.; Hill, D.L. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1679.
52. Canan Koch, S.S.; Dardashti, L.J.; Hebert, J.J.; White, S.K.; Croston, G.E.; Flatten, K.S.; Heyman, R.A.; Nazdan, A.M. *J. Med. Chem.* **1997**, *39*, 3229.
53. Lee, M.O.; Hobbs, P.D.; Zhang, X.K.; Dawson, M.I.; Pfahl, M. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1994**, *91*, 5632.
54. Lehman, J.M.; Jong, L.; Fanjul, A.; Cameron, J.F.; Lu, X.P.; Haefner, P.; Dawson, M.I.; Pfahl, M. *Science* **1992**, *258*, 1944.
55. Hibi, S.; Kikuchi, K.; Yoshimura, H.; Nagai, M.; Tai, H.; Hida, T. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3245.
56. Umemiya, H.; Fukaswa, H.; Ebisawa, M.; Eyrolles, L.; Kawachi, E.; Eisenmann, G.; Gronemeyer, H.; Hashimoto, Y.; Shudo, K.; Kagechika, H. *J. Med. Chem.* **1997**, *39*, 4222.

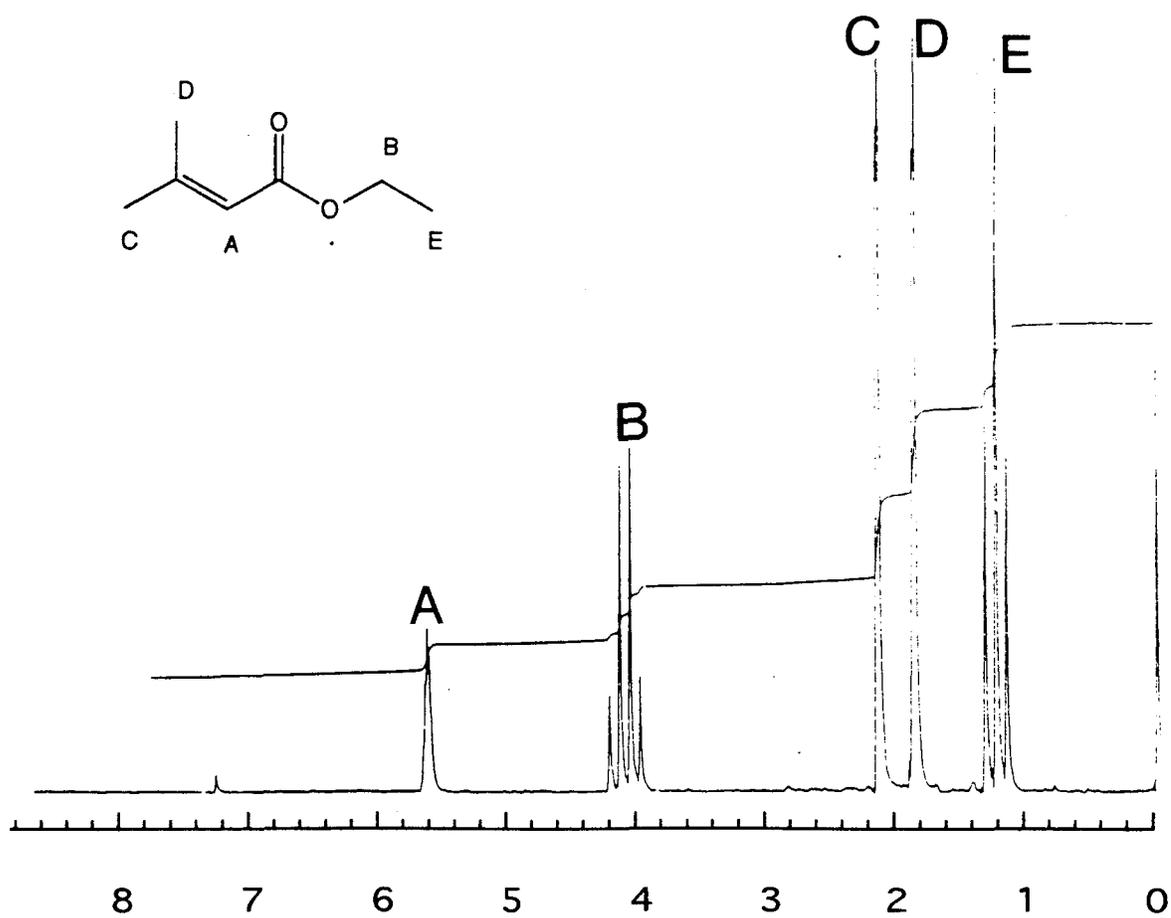
57. Li, J.J.; Dong, Z.; Dawson, M.I.; Colburn, N.H. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 483.
58. Lee, H.Y.; Dawson, M.I.; Walsh, G.L.; Nesbitt, J.C.; Eckert, R.L.; Fuchs, E.; Hong, W.K.; Lotan, R.; Kurie, J.M. *Cell Growth and Differentiation* **1996**, *7*, 997.
59. Fanjul, A.; Dawson, M.I.; Hobbs, P.D.; Jong, L.; Cameron, J.F.; Harlev, E.; Graupner, G.; Lu, X.P.; Pfahl, M. *Nature* **1994**, *372*, 107.
60. Hashimoto, Y.; Kagechika, H.; Kawachi, E.; Fukasawa, H.; Saito, G.; Shudo, K. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1995**, *121*, 696.
61. Nagy, L.; Thomazy, V.A.; Shipley, G.L.; Fésüs, L.; Lamph, W.; Heyman, R.A.; Chandraratna, R.A.S.; Davies, P.J. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 3540.
62. Boehm, M.F.; Zhang, L.; McClurg, M.R.; Berger, E.; Wagoner, M.; Mais, D.E.; Suto, C.M.; Davies, P.J.A.; Heyman, R.A.; Nazdan, A.M.J. *Med. Chem.* **1995**, *38*, 3146.
63. Horn, V.; Minucci, S.; Ogryzco, V.V.; Adamson, E.D.; Howard, B.H.; Levin, A.A.; Ozato, K. *FASEB* **1996**, *10*, 1071.
64. Chen, J.Y.; Clifford, J.; Zusi, C.; Starret, J.; Tortolani, D.; Ostrowski, J.; Reczek, P.R.; Chambon, P.; Gronemeyer, H. *Nature*, **1996**, *382*, 819.
65. Roy, B.; Taneja, R.; Chambon, P. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 6481.
66. Agarwal, C.; Chandraratna, R.A.S.; Teng, M.; Nagpal, S.; Rorke, E.A.; Eckert, R.L. *Cell Growth and Differentiation* **1996**, *7*, 521.
67. Lotan, R.; Dawson, M.I.; Zou, C.C.; Jong, L.; Lotan, D.; Zou, C.P. *Cancer. Res.* **1995**, *55*, 232.
68. Fanjul, A.N.; Bouterfa, H.; Dawson, M.; Pfahl, M. *Cancer. Res.* **1996**, *56*, 1571.
69. Schadendorf, D.; Worm, M.; Jurgovsky, K.; Dippel, E.; Michel, S.; Charpentier, B.; Bernardon, J.M.; Reichert, U.; Czarnetzky, B.B. *Intl. J. Oncol.* **1994**, *5*, 1325.
70. Bunce, C.M.; Wallington, L.A.; Harrison, P.; Williams, G.R.; Brown, G. *Leukemia* **1995**, *9*, 410.

71. Elsner, E.; Linker-Israeli, M.; Umiel, T.; Le, J.; Grillier, I.; Said, J.; Shintaku, I.P.; Krajewski, S.; Reed, J.C.; Binderup, L.; Koeffler, H.P. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3570.
72. Mukherjee, R.; Davies, P.J.A.; Crombie, D.L.; Bischoff, E.D.; Cesario, R.M.; Jow, L.; Hamann, L.G.; Boehm, M.F.; Mondon, C.E.; Nazdan, A.M.; Paterniti, J.R.; Heyman, R.A. *Nature* **1997**, *386*, 407.
73. *United States Pharmacopeia Dispensing Information, Approved Drug Products and Legal Requirements (Volume III)*, **1998**, United States Pharmacopeial Convention Inc., 27, 261
74. Hensby, C.; Cavey, D.; Bouclier, M.; Chatelus, A.; Algate, D.; Eustache, J.; Shroot, B. *Agents and Actions* **1990**, *29*, 56.
75. Esgleyes-Ribot, T.; Chandraratna, R.A.; Lew-Kaya, D.A.; Sefton, J.; Duvic, M. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1994**, *30*, 581.
76. Mehta, K.; Sadeghi, T.; McQueen, T.; Lopez-Berestein, G. *Leukemia Res.* **1994**, *8*, 587.
77. Mentha, K. *Cancer Watch* **1994**, *3*, 148.
78. Gale, J.B. *Progress in Medicinal Chemistry* **1993**, *30*, 1.
79. Schiff, L.J.; Okamura, W.H.; Dawson, M.I.; Hobbs P. D. *Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids* **1990**, CRC, Boca Raton: Florida, 307-364.
80. Spruce, L.W.; Rajadhyaksha, S.N.; Berlin, K.D.; Gale, J.B.; Miranda, E.T.; Ford, W.T.; Blossey, E.C.; Verma, A.K.; Hossain, M.B.; van der Helm, D.; Breitman, T.R. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1474.
81. Gale, J.B. (1988) Heteroarotinoids with a Five-Membered A-Ring (Tesis) **1990**, Oklahoma State University, Stillwater, OK. Chem. Abstr. 112, 235633.
82. Dawson, M.I.; Hobbs, P.D.; Derdzinski, K.; Chan, R. L.-S.; Gruber, J.; Chao, W.-R.; Smith, S.; Thies, R.W.; Schiff L.J. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1516.
83. Waugh, K.M.; Berlin, K.D.; Ford, W.T.; Holt, E.M.; Carrol, J.P.; Schomber, P.R.; Thompson, M.D.; Schiff, L.J. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 116.

84. Dawson, M. I.; Chao, W.-R.; Hobbs P. D.; Delair, T. *Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids* **1990**, 385-466, CRC, Boca Raton, Florida.
85. Ruban, G.; Zobel, D.; Koßmehl, G.; Nuck, R. *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 3384.
86. Spruce, L.W. *Syntheses, Structural Elucidation, an Biological Activity of New Heteroarotinoids (Tesis)* **1990**, Oklahoma State University, Stillwater, OK.
87. Spruce, L.W.; Gale, J.B.; Berlin, K.D.; Verma, A.K.; Breitman, T.R.; Ji, X. Van der Helm, D. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 430.
88. Igbal, M.; Copan, W.G.; Mucco, D.D.; Maatescu, G.D. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1985**, *8*, 807
89. Solladié, G.; Giardin, A.; Lang, G. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2620.
90. Vogel, A. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, **1959**, Longman: Londres, 3ra Edición, 460-461.
91. Pattenden, G.; Weendon, B.C.L. *J. Chem. Soc. (C)*, **1968**, 1984.
92. Curley, R.W., Jr.; Ticoras, C.J. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 256.
93. Umbreit, M.A.; Sharpless, K.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5526.
94. Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *43*, 2923.
95. Hostettmann, K. *Preparative chromatographic techniques* **1986**, Springer-Verlag: Berlin, 23.
96. Tietze, L.F.; Eicher, T. *Reactions and syntheses in the organic chemistry laboratory* **1991**, University Science Books: Mill Valley, 1era edición, 463-468.
97. March, J. *Advanced organic chemistry*, **1992**, Wiley Interscience, New York, 4ta edición, 632-633.
98. Still, W. C.; Gennari, C. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *41*, 4405.
99. Boehm, M.F.; McClurg, M.R.; Pathirana, C.; Mangelsdorf, D.; White, S.K.; Hebert, J.H.; Winn, D.; Goldman, M.E.; Heyman, R.A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 408.

100. Hundlicky, M. *Oxidations in organic chemistry* **1990**, American Chemical Society: Estados Unidos, 1era Edición, 225.
101. Asato, A.E.; Mead, D.; Denny, M.; Bopp, T.T. ; Liu, R.S.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1504.
102. Wehrli, F.W.; Wirthlin, T. *NMR Spectroscopy* **1978**, Heyden, Londres, 1era edición, 115.
103. Günther, H. *NMR Spectroscopy* **1980**, Wiley, Malta, 1era edición, 343-354

APÉNDICE

Figura 5: Espectro ¹H-RMN 90 MHz (CDCl₃) del 3-metil-2-butenoato de etilo

(17)

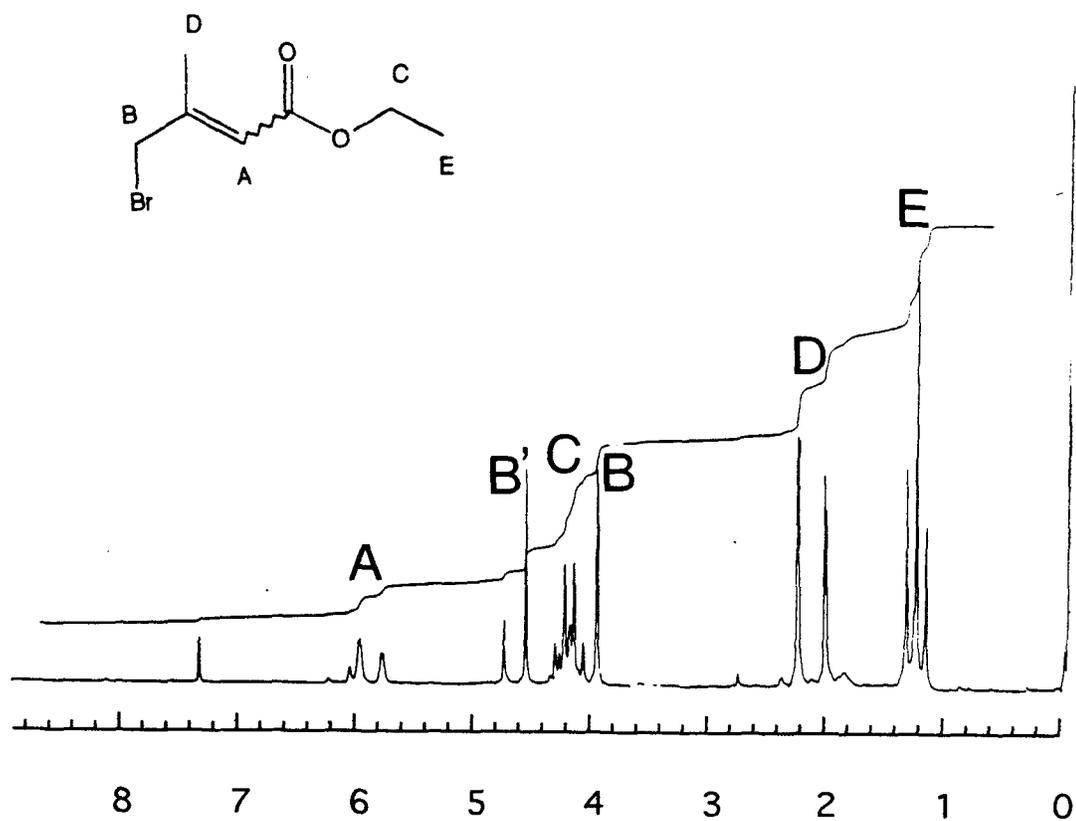


Figura 6: Espectro ¹H-RMN 90 MHz (CDCl₃) del (*E/Z*)-4-bromo-3-metil-2-butenato de etilo (**18**)

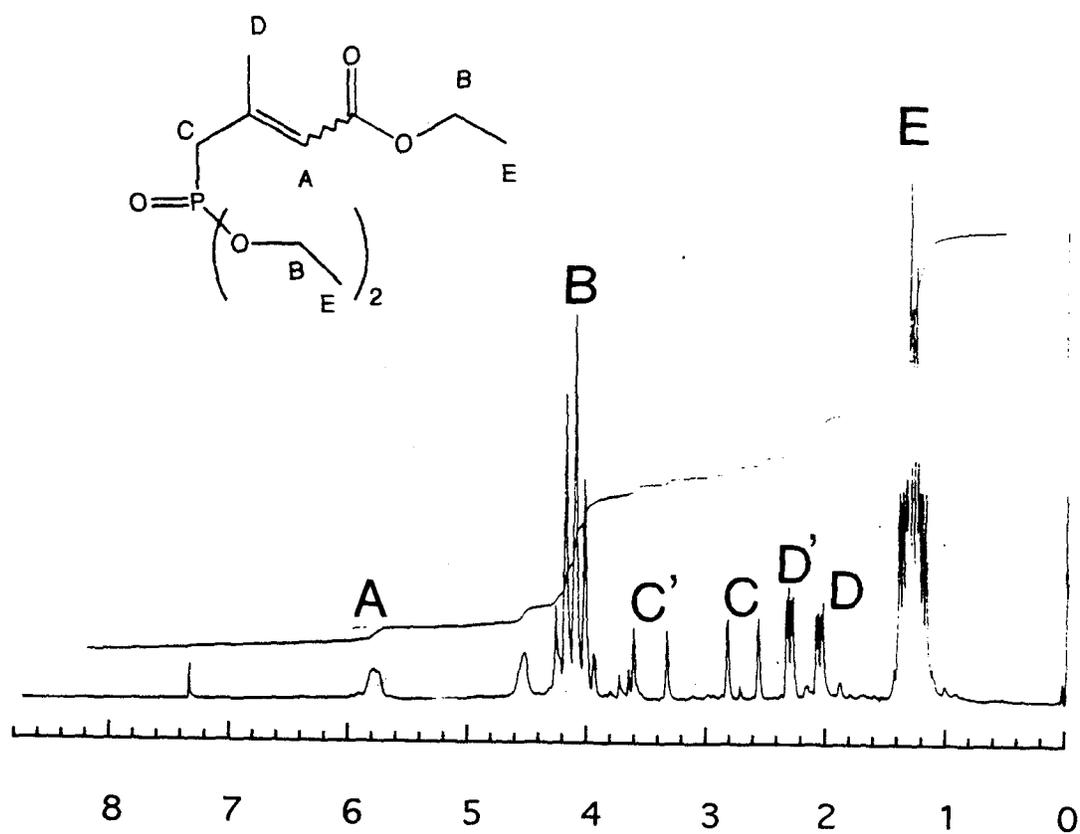


Figura 7: Espectro ¹H-RMN 90 MHz (CDCl₃) del (E/Z)-3-etoxicarbonil-2-metilpropen-2-enilfosfonato de dietilo (7)

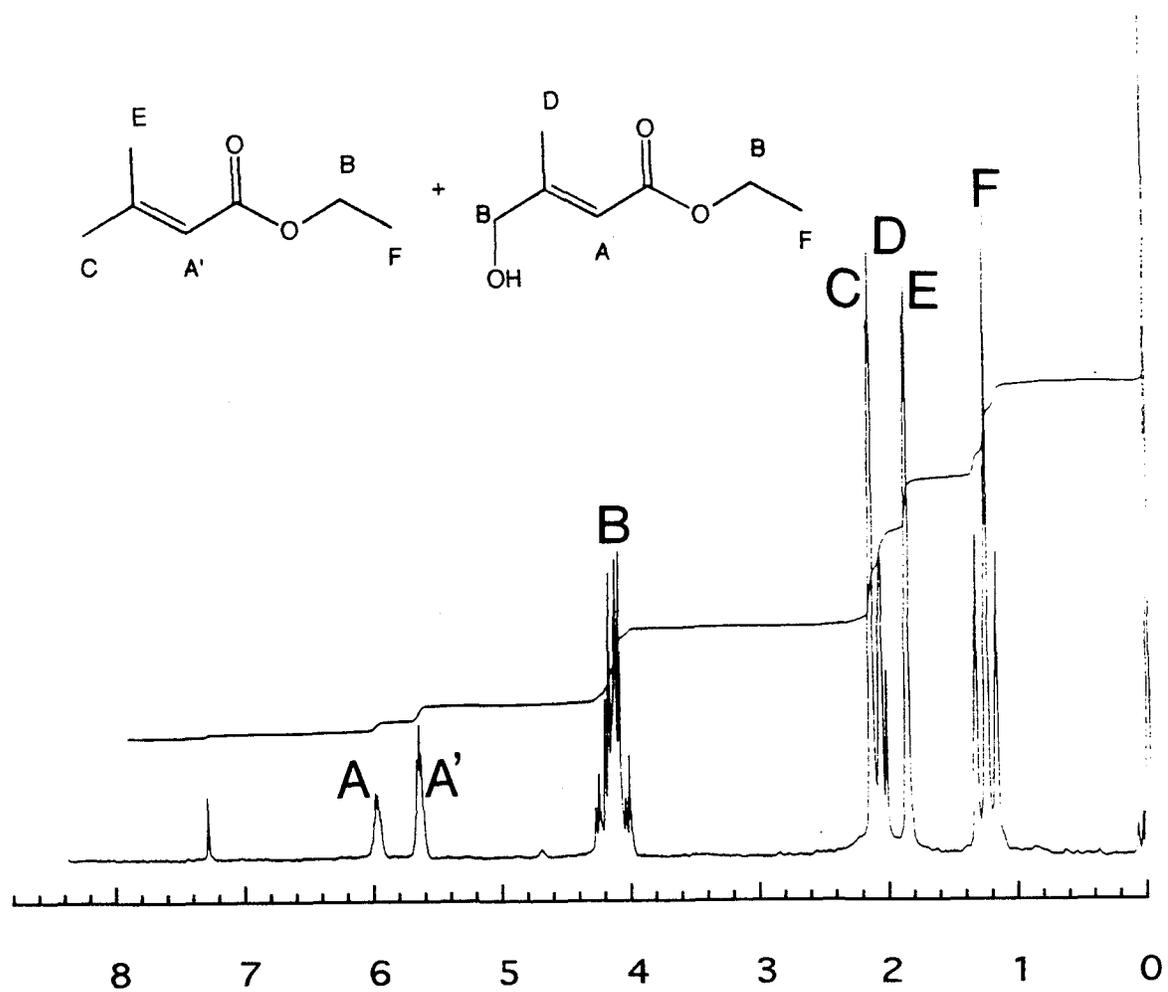


Figura 8: Espectro ¹H-RMN 90 MHz (CDCl₃) de la mezcla de 3-metil-2-butenoato de etilo (17) y (*E*)-4-hidroxi-3-metil-2-butenoato de etilo (19)

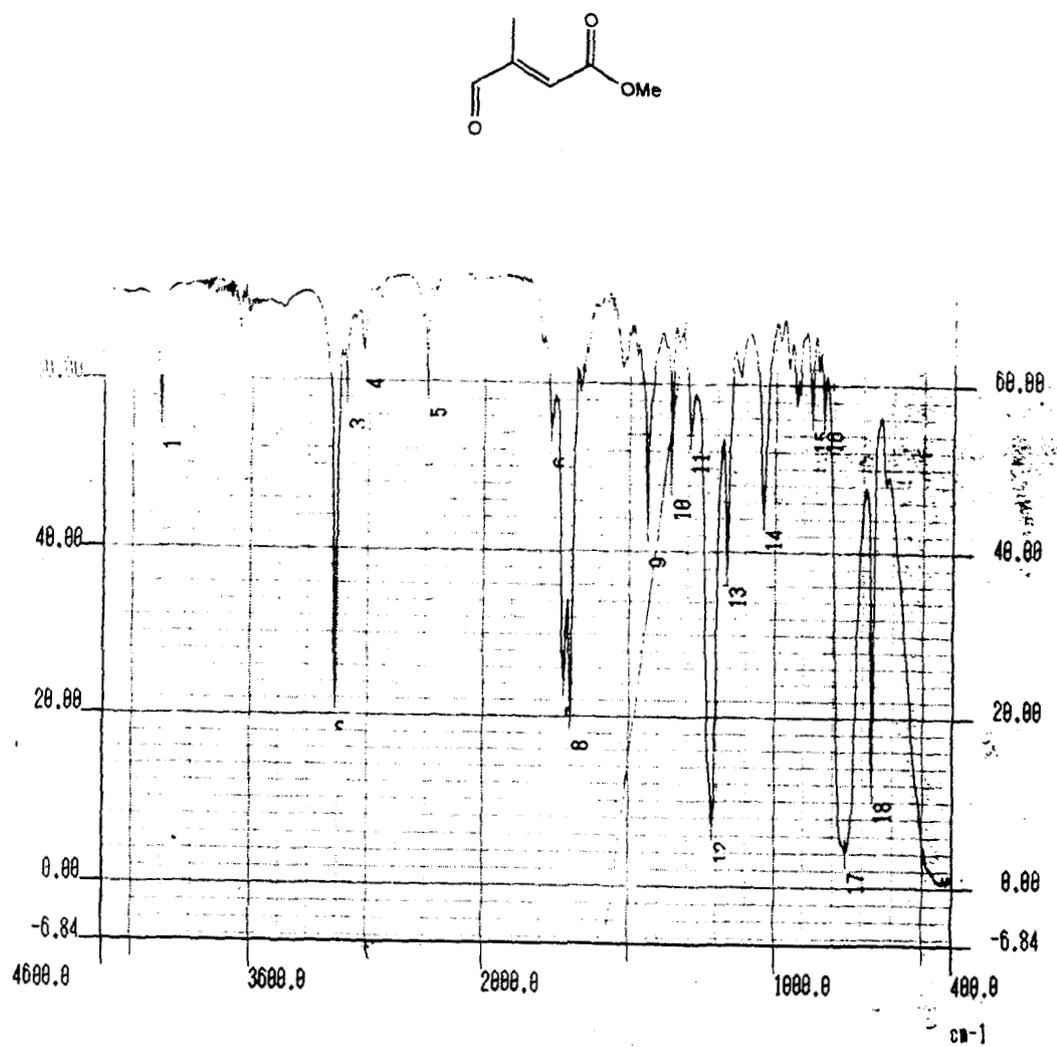


Figura 9: Espectro IR (película) del (E)-3-metil-4-oxo-2-butenato de metilo (9)

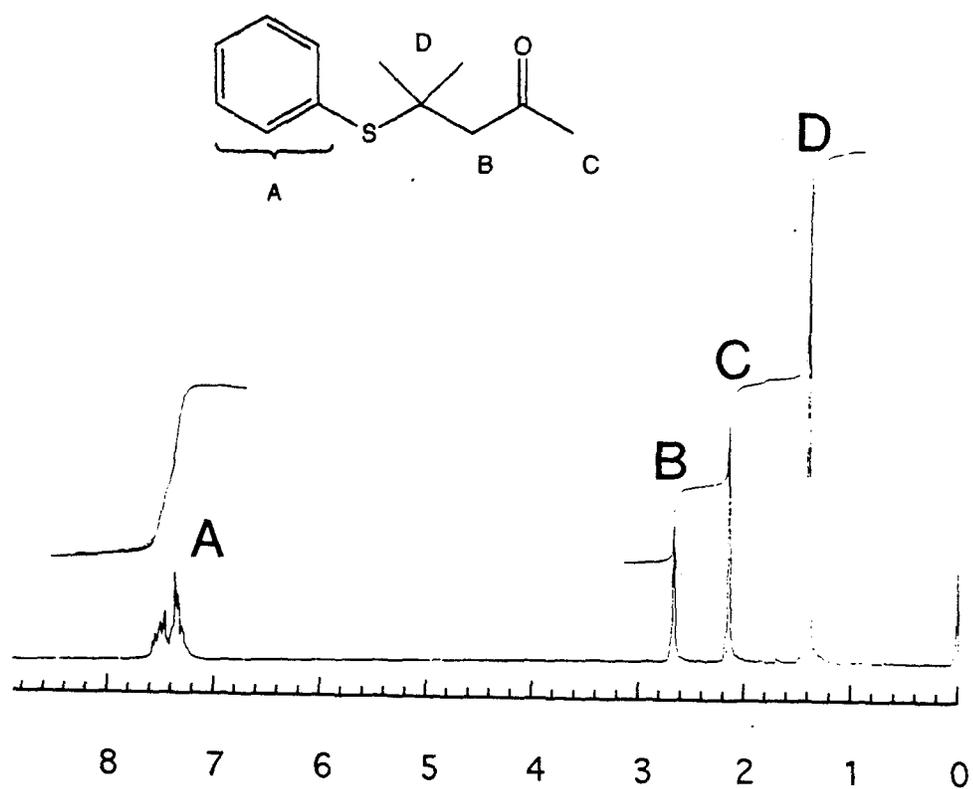


Figura 10: Espectro RMN ^1H 90 MHz (CDCl_3) de la 4-metil-4-tiofenil-2-pentanona
(24)

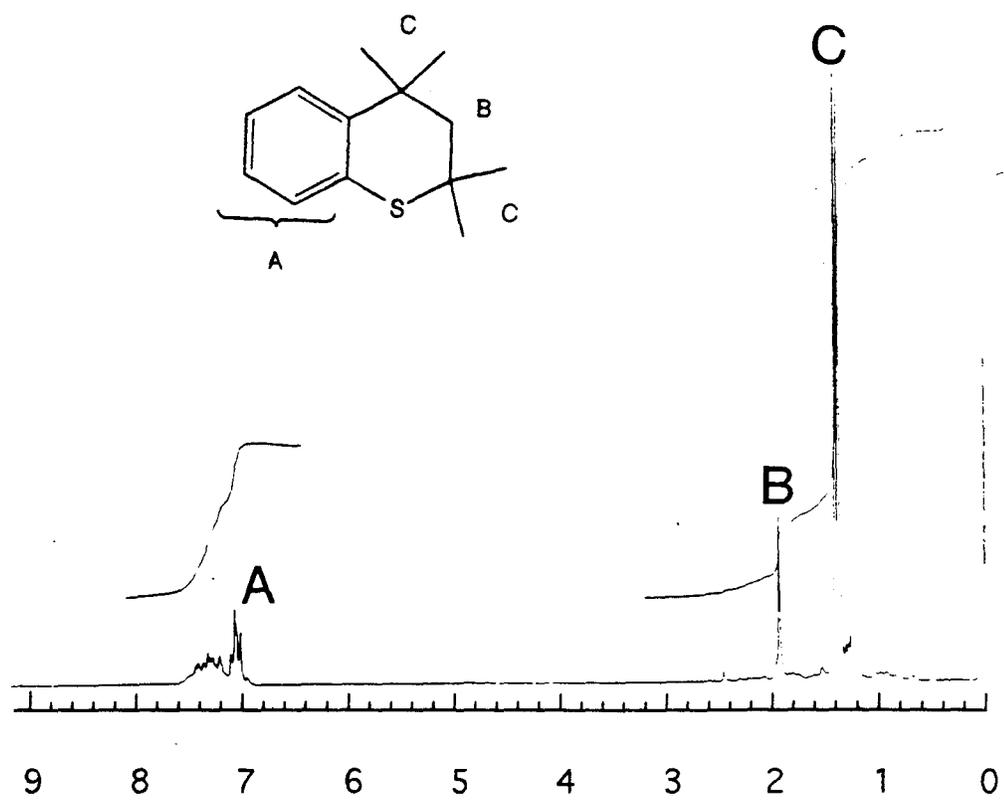


Figura 11: Espectro ¹H-RMN 90 MHz (CDCl₃) del 2,2,4,4-tetrametiltiocromano

(26)

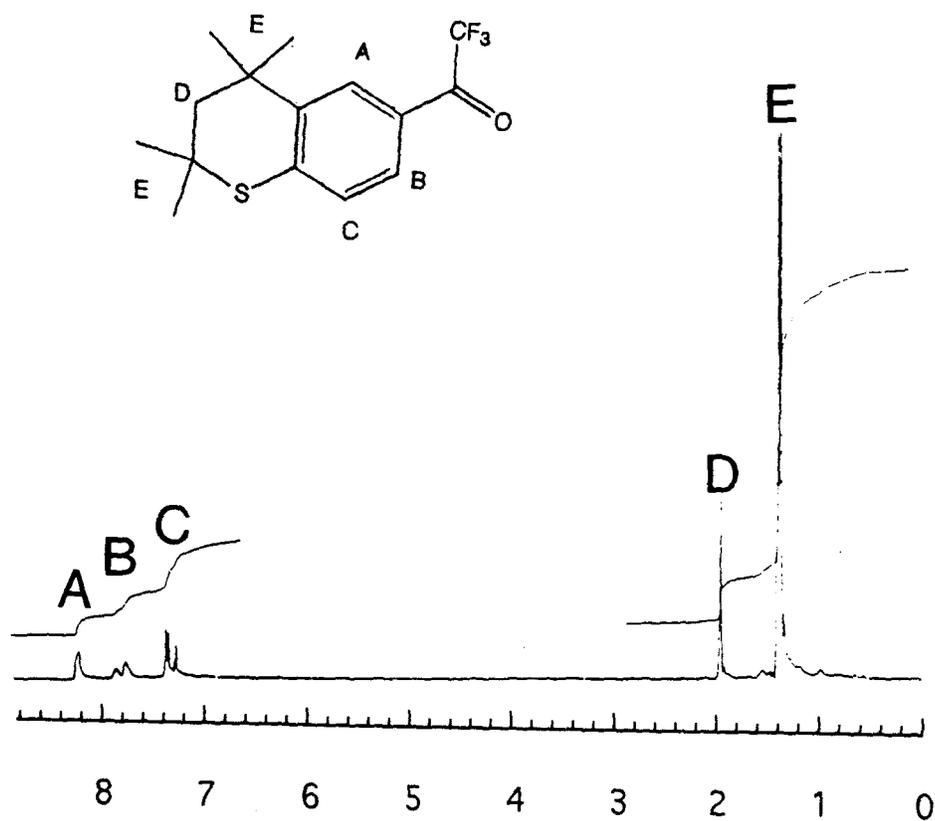


Figura 12: Espectro ¹H-RMN 90 MHz (CDCl₃) de la (2,2,4,4-tetrametilcroman-6-il)-trifluorometilcetona (**14**)

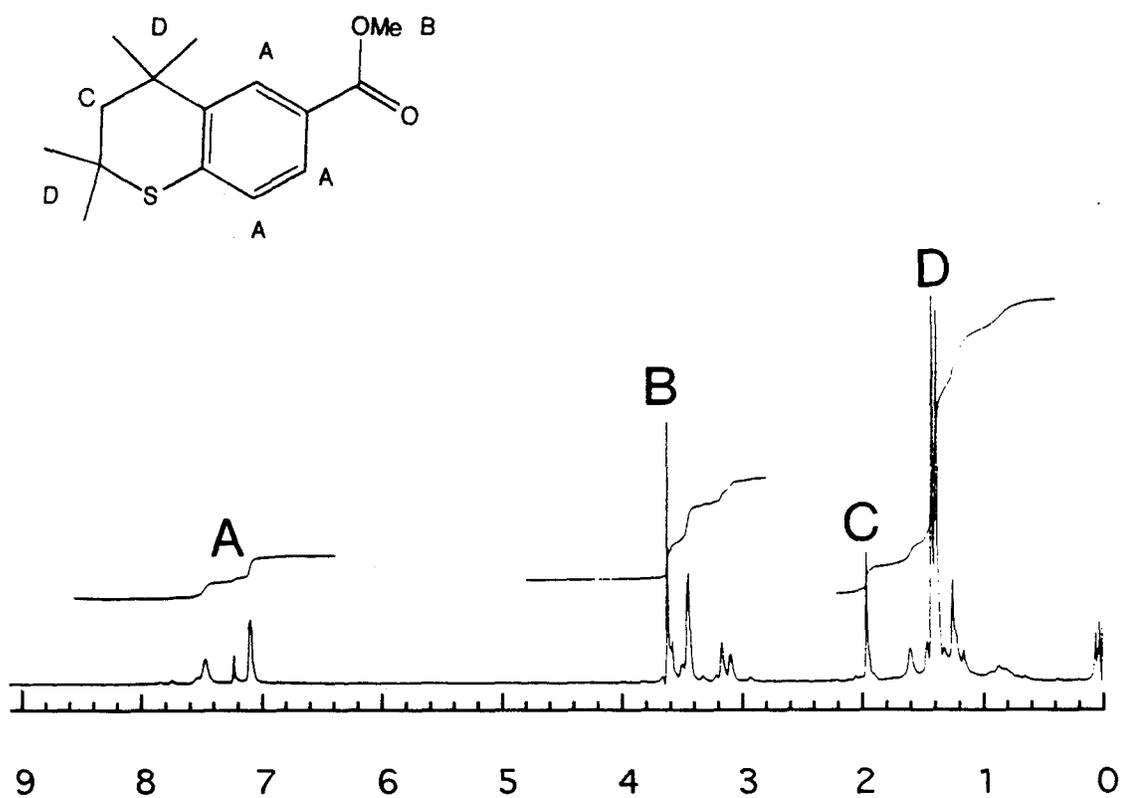


Figura 13: Espectro $^1\text{H-RMN}$ 90 MHz (CDCl_3) del (2,2,4,4-tetrametilthiocroman-6-il)-carboxilato de metilo (**36**)

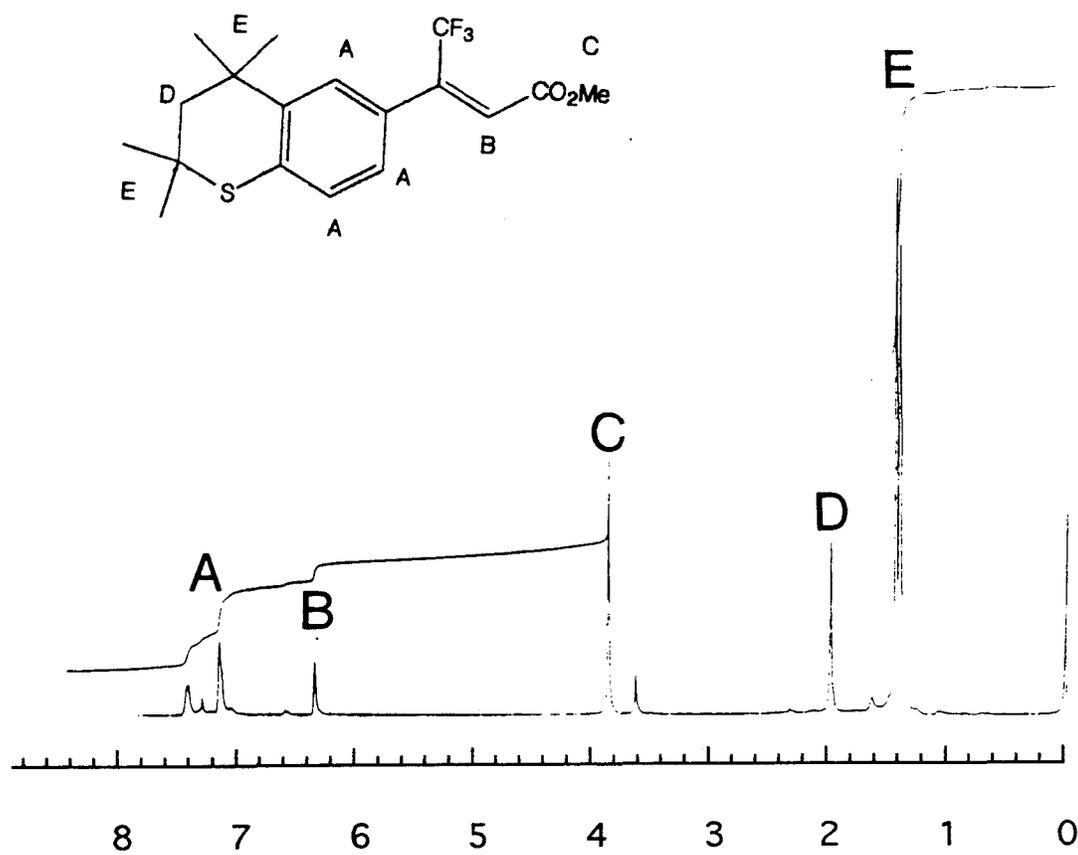


Figura 14: Espectro ¹H-RMN 90 MHz (CDCl₃) del (Z)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-buteniato de metilo (12)

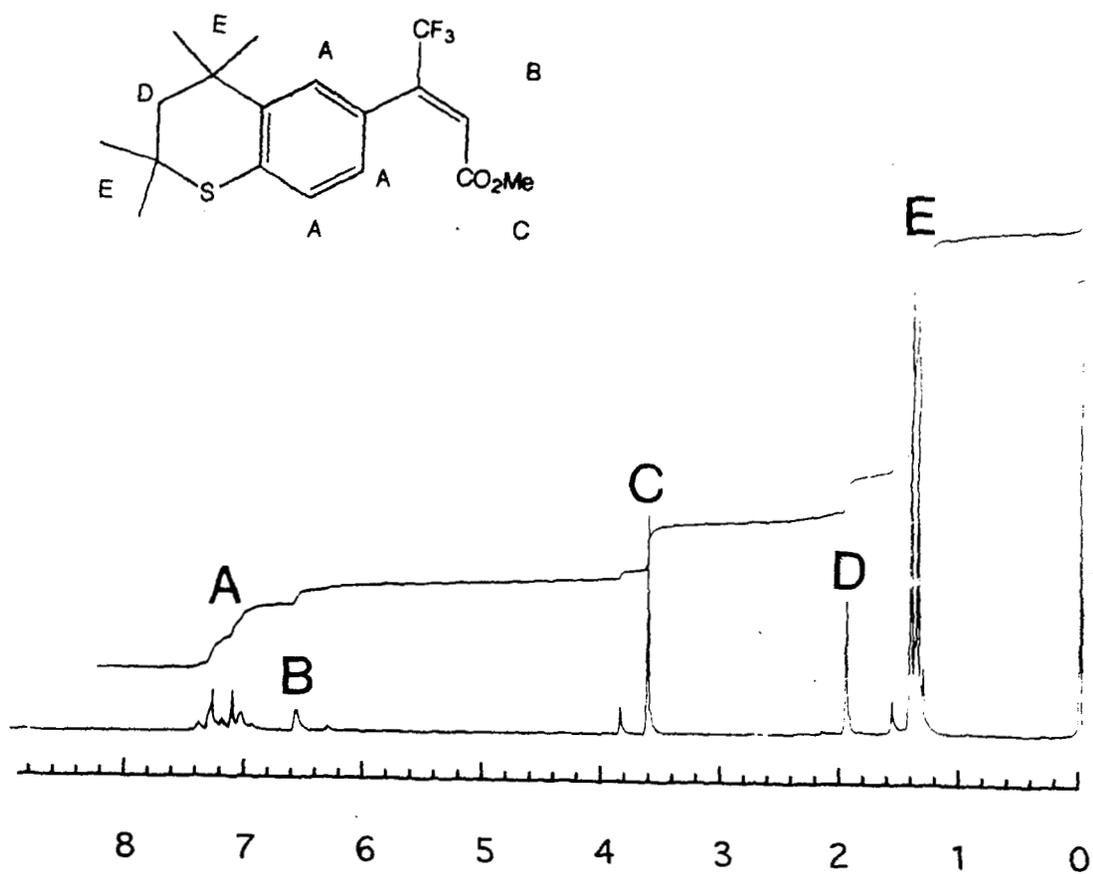


Figura 15: Espectro ¹H-RMN 90 MHz (CDCl₃) del (*E*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenoato de metilo (12)

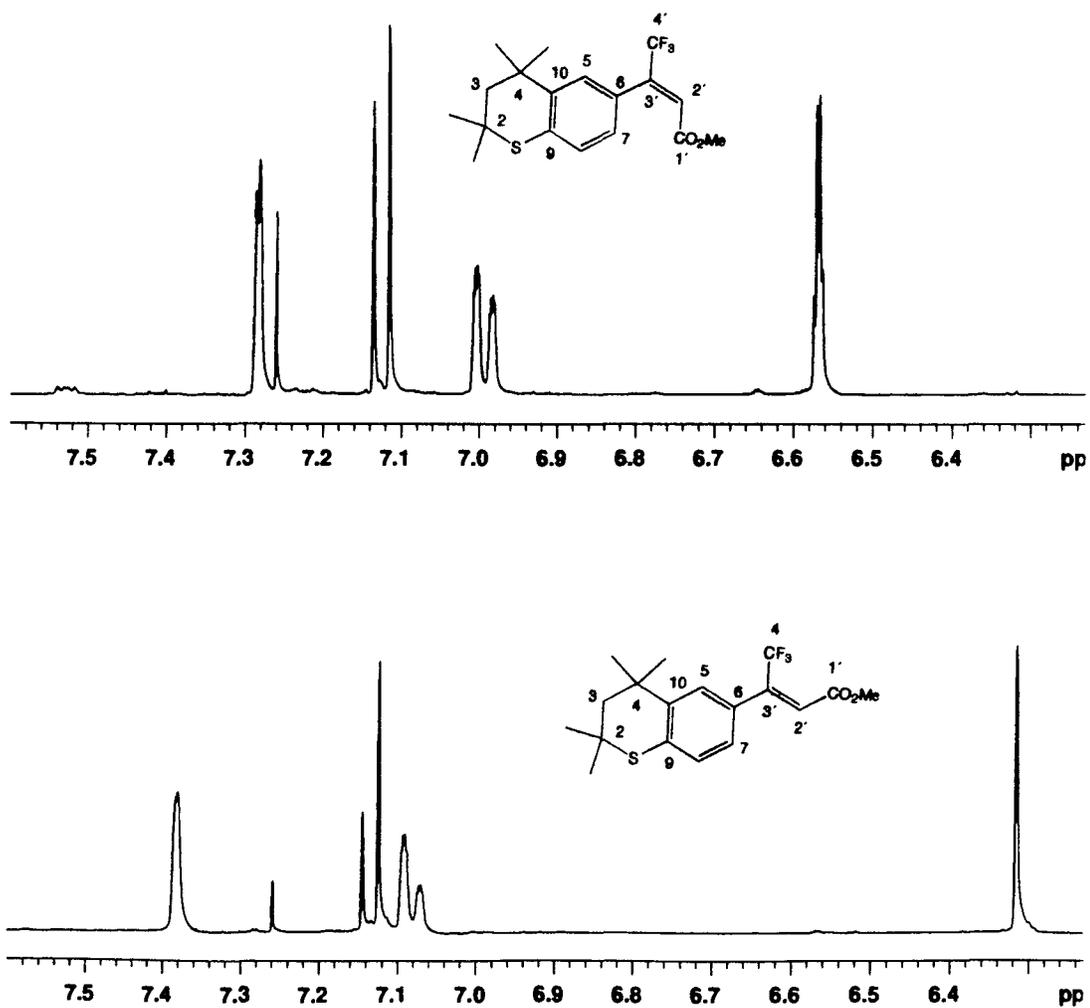


Figura 20: Espectros $^1\text{H-RMN}$ 400 MHz (CDCl_3) del (E) y (Z)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenoato de metilo (**12**) (ampliación)

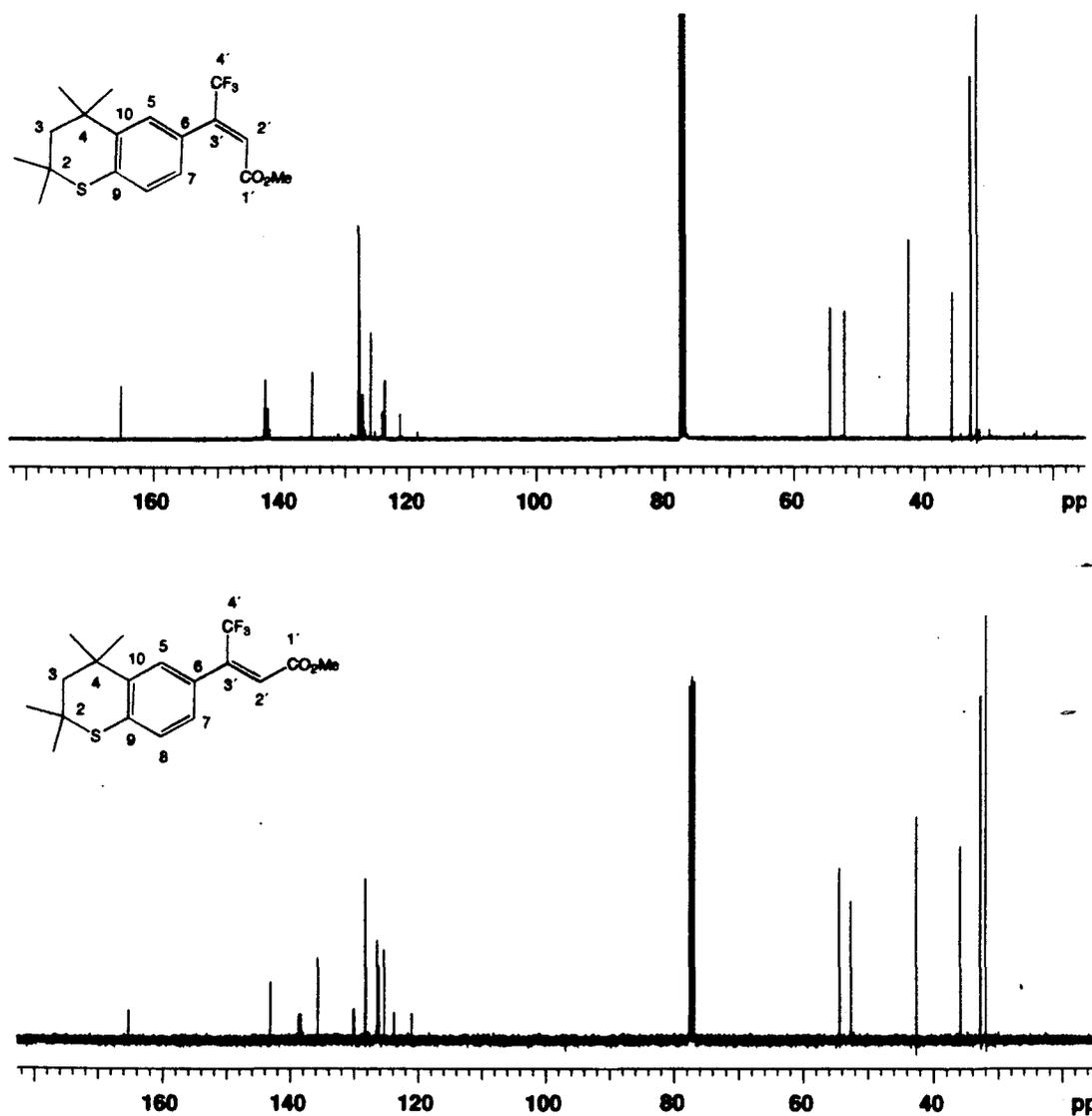


Figura 21: Espectros ^{13}C -RMN 100 MHz (CDCl_3) del (E) y (Z)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (12)

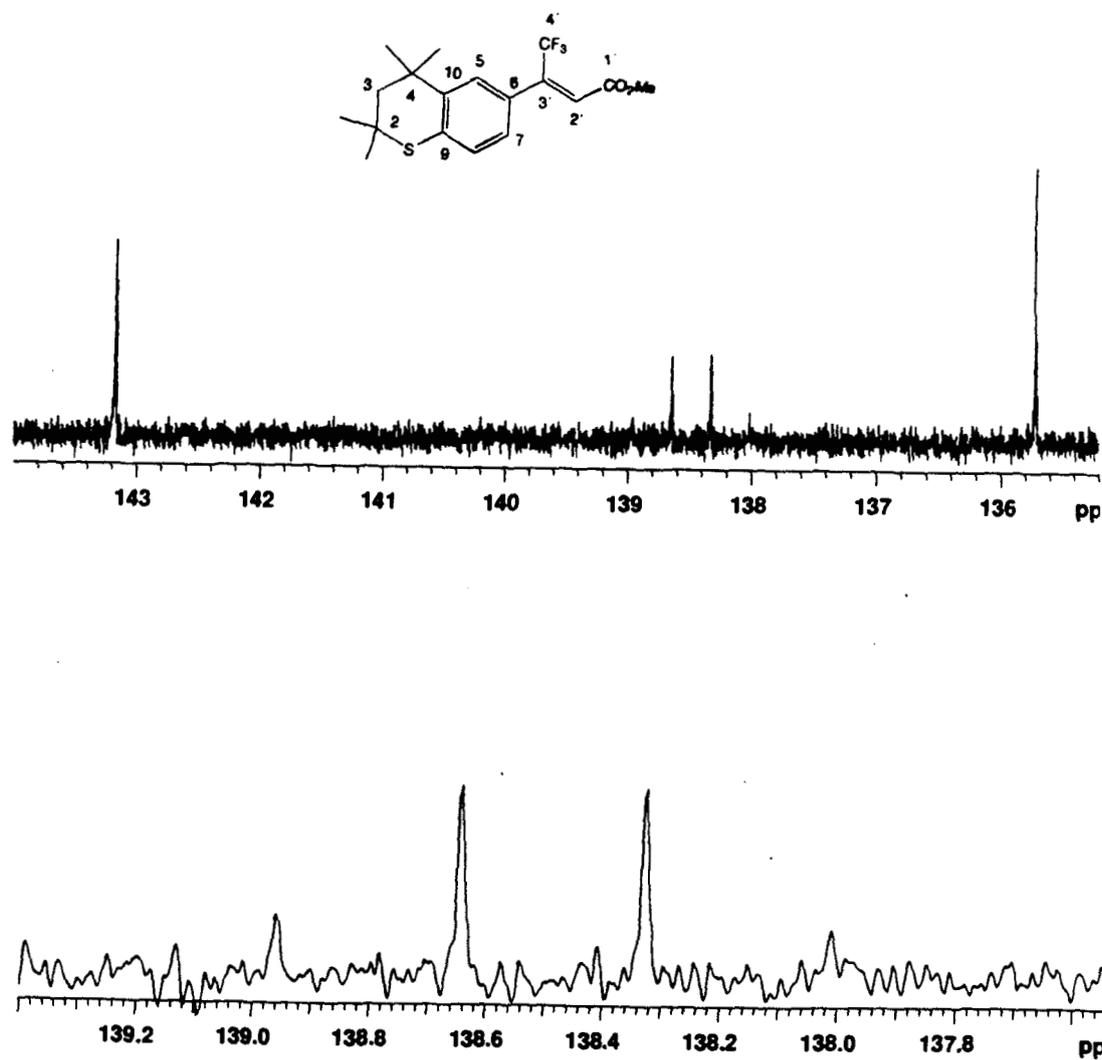


Figura 22: Espectro ^{13}C -RMN 100 MHz (CDCl_3) del (*Z*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (**12**) (ampliación)

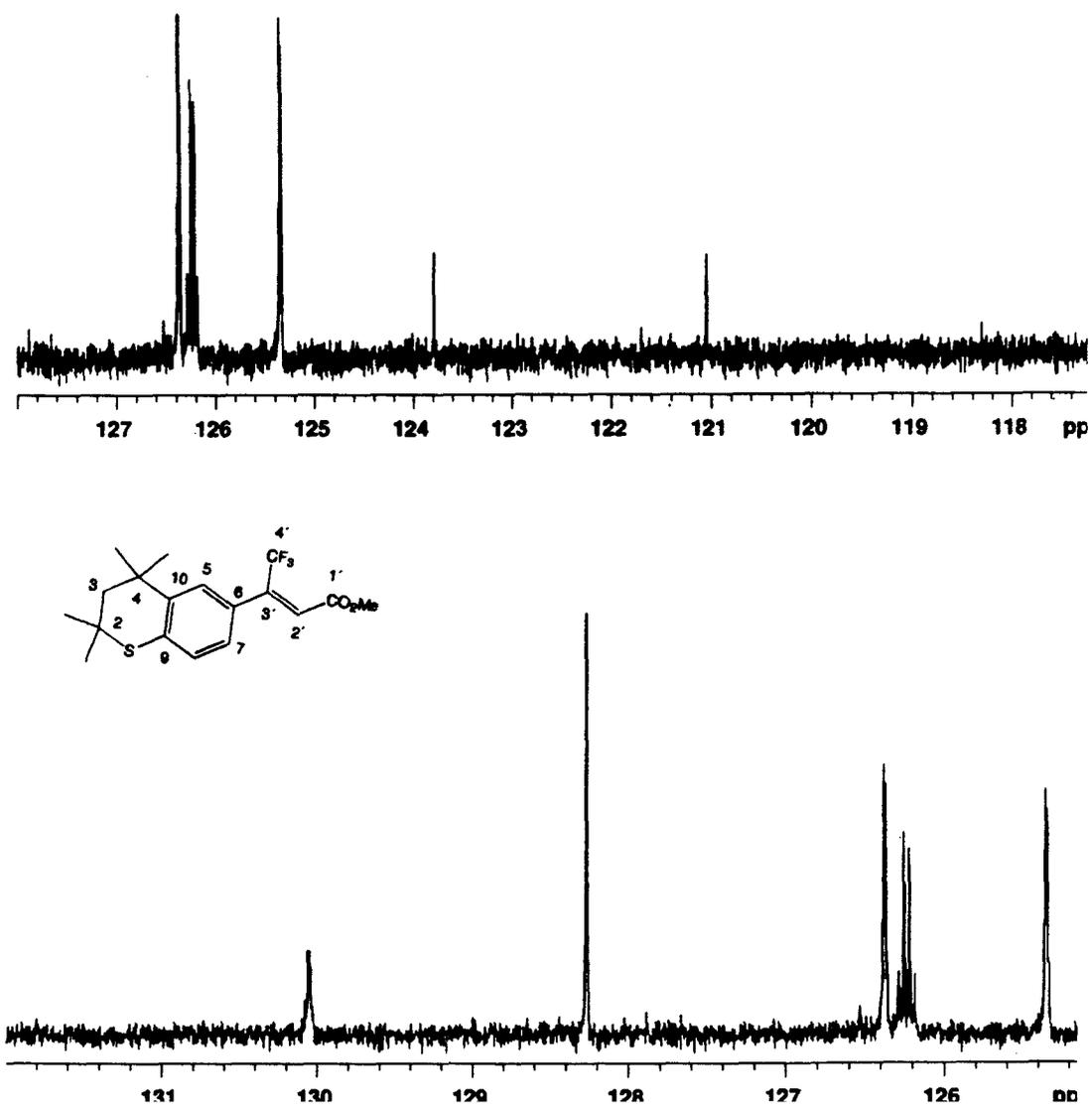


Figura 23: Espectro ^{13}C -RMN 100 MHz (CDCl_3) del (*Z*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametilcroman-6-il)-2-butenocato de metilo (**12**) (ampliación)

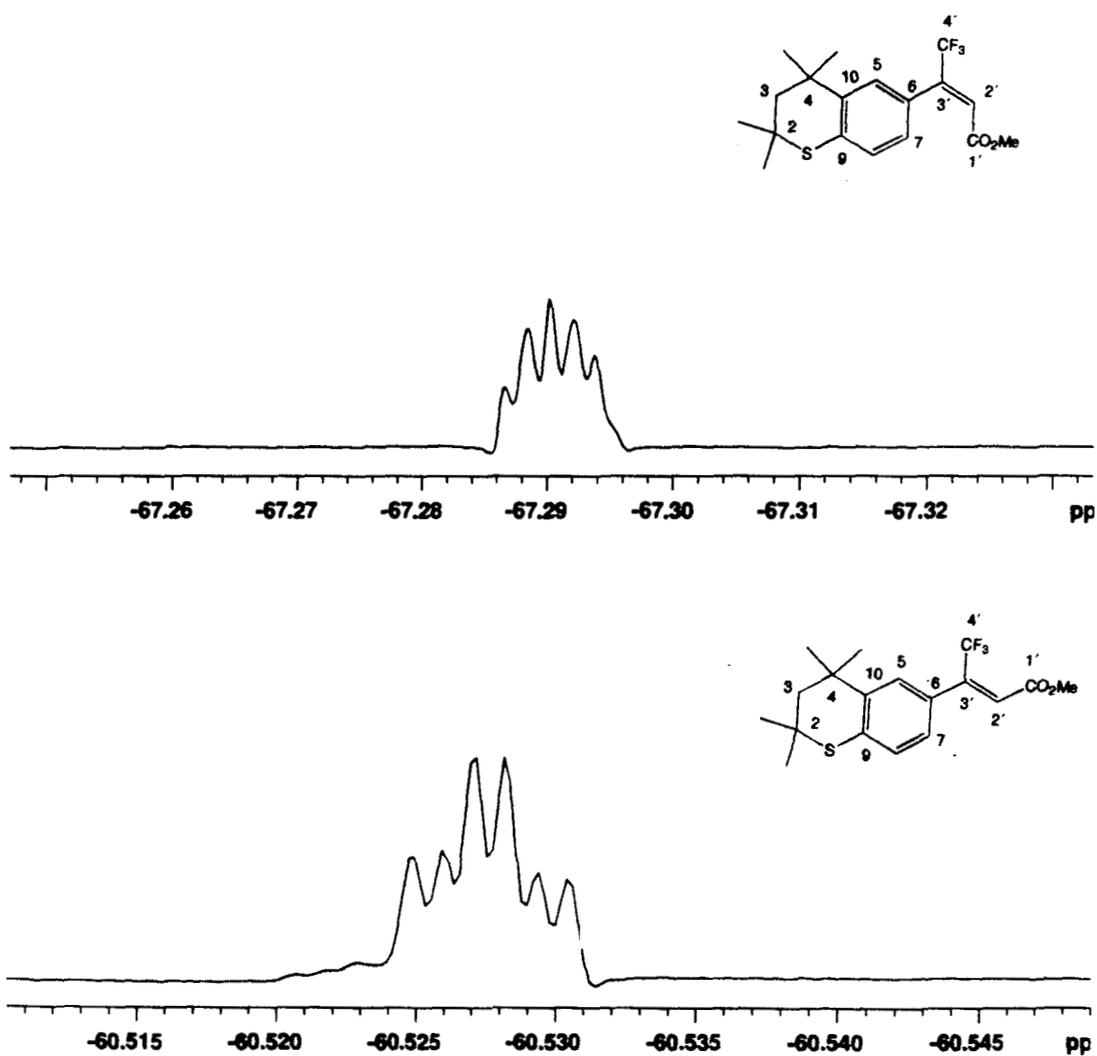


Figura 24: Espectros ^{19}F -RMN 376 MHz (CDCl_3) del (*E*) y (*Z*)-4,4,4-trifluoro-3-(2,2,4,4-tetrametiltiocroman-6-il)-2-butenato de metilo (**12**)
(estándar externo $\text{C}_6\text{H}_5\text{CF}_3/\text{C}_6\text{D}_6 = -62,80$ ppm)

