Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Síntesis de derivados esteroidales marcados isotópicamente y su ensayo como precursores biosintéticos de bufadienólidos de sapo

Garraffo, Hugo Martín

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Garraffo, Hugo Martín. (1985). Síntesis de derivados esteroidales marcados isotópicamente y su ensayo como precursores biosintéticos de bufadienólidos de sapo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1888_Garraffo.pdf

Cita tipo Chicago:
Garraffo, Hugo Martín. "Síntesis de derivados esteroidales marcados isotópicamente y su ensayo como precursores biosintéticos de bufadienólidos de sapo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1888_Garraffo.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

****

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"SINTESIS DE DERIVADOS ESTEROIDALES MARCADOS ISOTOPICAMENTE Y SU ENSAYO COMO PRECURSORES BIOSINTETICOS DE BUFADIENOLIDOS DE SAPO"

Director de Tesis

Dr. Eduardo G. Gros

Lugar de Trabajo

Departamento de Química Orgánica

HUGO MARTIN GARRAFFO

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN QUIMICA

- 1985 -

- 1888 -

****

Reg. Nº 1888

A mi esposa.

A mis familiares.

A mis amigos.

Deseo expresar mi reconocimiento y gratitud al Dr. Eduardo G. Gros, por su dirección en este trabajo, por su permanente ejemplo de voluntad y dedicación, por su paciencia y por las enseñanzas recibidas.

Agradezco además:

A UMYMFOR (CONICET-FCEN) por la realización de las determinaciones instrumentales:

Sr. Jorge A. Aznárez por los espectros de masa.

Dr. Gerardo Burton y Sr. Carlos G. Arabehety por los espectros de RMN-^{13}C y RMN-^{1}H en 100 MHz.

Srta. Alicia Arenaza por los espectros de RMN-^{1}H en 60 MHz.

Lic. Juan B. Rodríguez por las cromatografías líquido-líquido de alta resolución.

Al Dr. Gerardo Burton de quien recibí los primeros conocimientos en el tema durante el último cuatrimestre de mi carrera.

A la Lic. Patricia Eisenberg por su entusiasmo y colaboración, en ocasión de realizar sus trabajos prácticos de la materia Química Orgánica B (Síntesis Orgánica).

A la Lic. María del Carmen Brunengo (Universidad Nacional del Sur - Bahía Blanca) por su colaboración desinteresada en ocasión de su pasantía en Bs. As.

Al Dr. Aldo E. A. Mitta y al Sr. Carlos Arciprete por permitirme el uso de una línea de vacío en la División Moléculas Marcadas de la Comisión Nacional de Energía Atómica y por su apoyo durante mi corta estadía en ese laboratorio.

Al Dr. Eduardo H. Charreau por facilitarme el uso de varios equipos e

instalaciones, pertenecientes al Instituto de Biología y Medicina Experimental y por las esclarecedoras conversaciones mantenidas con él y su equipo de colaboradores inmediatos.

A los Licenciados Omar P. Pignataro y Tomás A. Santa Coloma por la realización de varios ensayos con homogeneizados y cortes de tejido de sapos, así como por las fructíferas discusiones sobre los temas biosintéticos.

Al Lic. Tomás A. Santa Coloma por su amistad, por su generosidad en esfuerzo, imaginación y aporte de conocimientos, que me brindaron un nuevo enfoque y un nuevo impulso en los ensayos biosintéticos en general.

A los Dres. Alicia M. Seldes, Manuel C. Blanco y Carlos R. Portal, por su apoyo constante y sus expertos consejos, brindados amistosa y desinteresadamente.

A mis compañeros de laboratorio: Dr. Gabriel J. Bukovits, Dr. César A. Russo, Lic. Alicia Baldessari, Lic. Gustavo H. Dartayet, Lic. Darío Doller y Dra. Rosa Erra Balsells, por su compañerismo y cordialidad, su estímulo diario y su buena disposición para la organización del trabajo común.

A mis compañeros del Departamento de Química Orgánica, incluidos los ya nombrados, cuya estima siempre me ha honrado.

INDICE

pág.

Capítulo 1: Introducción

Generalidades..... 1

Principios esteroidales cardioactivos..... 5

Biosíntesis de bufadienólidos..... 9

Bufadienólidos de origen vegetal..... 9

Bufadienólidos de origen animal..... 14

Capítulo 2: Objetivos de la presente investigación..... 22

Capítulo 3: Descripción de la labor realizada

A) Procesos sintéticos..... 40

A.1) 3β-Hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (59)..... 40

A.2) 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (65)..... 45

A.3) |20-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (69)..... 50

A.4) Colesta-5,20(22)E-dien-3β-ol (76)..... 53

A.5) 5β-Colestan-3β-ol (84)..... 62

A.6) |21-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (86) y
|21-^{14}C| 5β-colestan-3β-ol (88)..... 69

B) Estudios biosintéticos..... 72

B.1) Inoculación de trazadores radiactivos a animales
intactos..... 72

B.2) Ensayos con cortes de tejido y con homogeneizados de glándulas parotoides de sapos *Bufo arenarum*..... 76

Consideraciones preliminares..... 76

Consideraciones acerca de la necesidad de la aplicación de estas metodologías a la realización del presente trabajo..... 82

a) Experiencia de inoculación de |1-^{14}C| acetato de sodio y |5-^{3}H| mevalonolactona a cortes de tejido de glándula parotoide..... 85

b) Aislamiento de lipoproteínas del suero sanguíneo.... 87

c) Marcación de las lipoproteínas con iodo (^{125}I)..... 88

d) Ensayo de unión de las lipoproteínas a los receptores en la membrana..... 89

e) Marcación de las lipoproteínas con linoleato de |1,2,6,7-^{3}H| colesterol.....100

f) Incubación de cortes de tejido de glándula parotoide con las lipoproteínas marcadas con linoleato de colesterol tritiado.....100

Capítulo 4: Resultados obtenidos

Estudios biosintéticos.....102

Capitulo 5: Discusión de resultados.....122

Capítulo 6: Experimental

Generalidades.....136

Procesos sintéticos.....141

Inoculación de productos radiactivos a animales intactos.182

Inoculación de productos radiactivos a homogeneizados y cortes de tejido de glándula parotoide.....189

Resumen.....199

Bibliografía.....202

Indice de figuras.....210

Indice de tablas.....210

CAPITULO 1

INTRODUCCION

GENERALIDADES

El conocimiento de la toxicidad de los venenos de sapos se remonta a tiempos pretéritos. Médicos de la antigüedad mencionaban medicinas preparadas a partir de piel de sapos, y describieron sus efectos sobre el corazón y la respiración.

En los siglos XVII y XVIII, se enlistaron temporariamente a los sapos desecados como "bufones exciccati" en las farmacopeas oficiales y se usaron como diuréticos contra la gota y otras enfermedades, aún antes de que las digitalis fueran introducidas por Withering.

En China y Japón, la secreción seca del sapo chino, muy probablemente *Bufo gargarizans*, conocida como Ch'an Su en China o Senso en Japón, se usa aún hoy para combatir varias enfermedades.

El llamado veneno de sapo es una secreción producida por glándulas dérmicas modificadas que están presentes en la mayor parte del área de la piel del sapo pero concentradas especialmente en la región del cuello (las glándulas parotoides).

Debido a que el veneno contiene muchos principios farmacológicamente activos, incluyendo alcaloides indólicos, no indólicos y esteroides como los bufadienólidos (bufogeninas) y sus derivados, las bufotoxinas, el interés por su composición fue en sus principios, farmacológico y no sistemático.

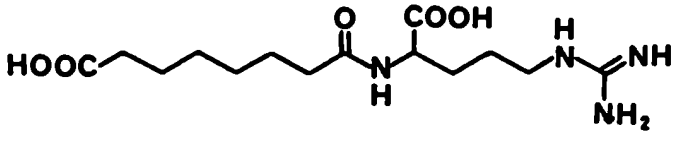
Más recientemente se investigó la composición de las secreciones de la piel de sapos con fines de estudios genéticos y evolutivos.

El veneno, probablemente excretorio en su función original (aunque indudablemente utilizado para evitar predadores), contiene productos de pasos metabólicos secundarios.

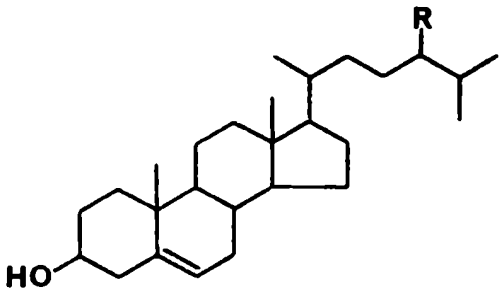
Como se mencionó, en la secreción venenosa se encuentran dos grupos de sustancias tóxicas, así como otras sustancias sin propiedades farmacológicas específicas. Los productos tóxicos pueden agruparse en:

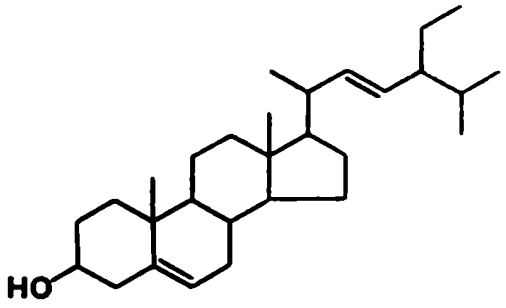
1) Los principios cardioactivos, representados por derivados esteroidales comúnmente conocidos como bufogeninas[1], o sistemáticamente como bufadienólidos y bufotoxinas[2] (conjugados de los bufadienólidos con suberilarginina (1)), los cuales son primariamente responsables del efecto farmacológico de la secreción venenosa.

Además de los bufadienólidos, también se han encontrado colesterol[3] (2) y el previamente conocido como γ-sitosterol[4,5] (mezcla de colesterol, campesterol[6] (3), estigmasterol (4) y sitosterol (5)).



1





2 R = H
3 R = CH_3
5 R = C_2H_5

4

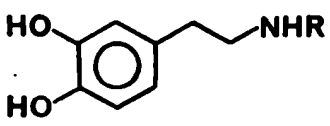
2) Los componentes básicos, que comprenden bases de dos tipos químicos diferentes: a) derivadas de feniletilamina y b) derivadas de triptamina.

Del estudio de varias especies de sapos del género *Bufo*, se verificó que aunque se encontraron diferencias en las bases que se aislaron de cada una de ellas, difícilmente se podía hablar de especificidad de especies.

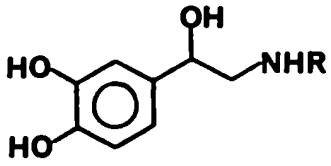
La aplicación sistemática de diferentes métodos cromatográficos amplió considerablemente el conocimiento que se tenía de la distribución de las bases en muchas especies de sapos, pero no clarificó la comprensión del significado biológico de las mismas ni el rol que dichas bases cumplen en los animales.

2a) Se han identificado varias bases derivadas de la feniletilamina en los venenos de sapos: dopamina[7] (6), N-metildopamina[7] (7), noradrenalina[8] (8),

adrenalina[9] (9).

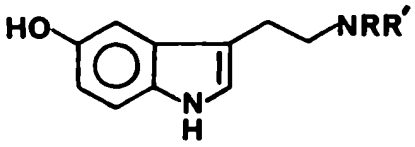


6 R = H
7 R = CH_3

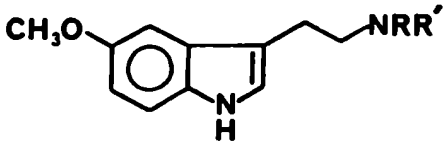


8 R = H
9 R = CH_3

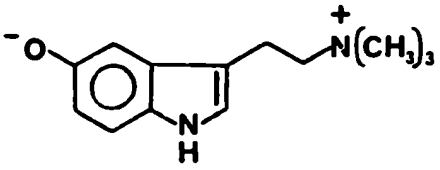
2b) Entre las bases derivadas de triptamina figuran: 5-hidroxitriptamina[10] (serotonina, 10), N-metil-5-hidroxitriptamina[11] (11), N-metil-5-metoxitriptamina[12] (12), bufotenina[11] (N,N-dimetilserotonina, 13), O-metilbufotenina[12] (14), bufotenidina[11] (N,N,N-trimetilserotonina, 15) y dehidrobufotenina[11] (16).



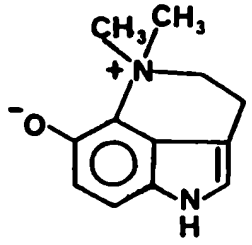
10 R = R' = H
11 R = CH_3; R' = H
13 R = R' = CH_3



12 R = CH_3; R' = H
14 R = R' = CH_3



15



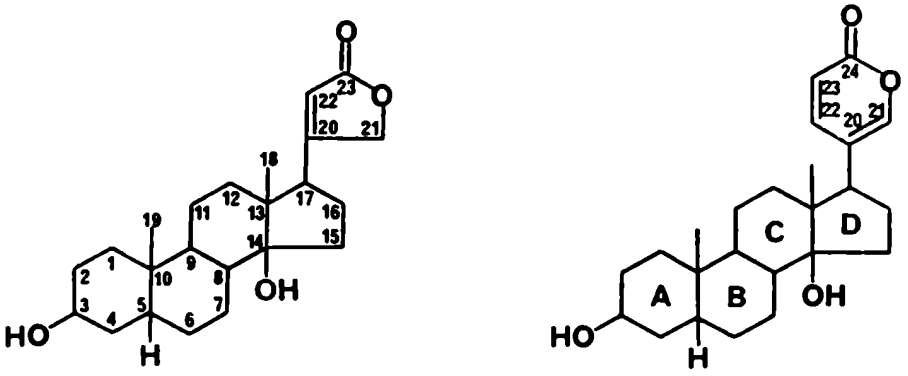
16

Principios esteroidales cardioactivos

Los principios cardiotónicos esteroidales tienen la propiedad de ejercer una acción poderosa sobre el músculo cardíaco; inyectados en la corriente sanguínea en cantidades muy controladas son de importancia farmacológica, ya que aumentan la contractibilidad del corazón y disminuyen la frecuencia sistólica incrementando así la eficiencia cardíaca.

Los principios que nos ocupan se encuentran restringidos en la Naturaleza a algunos pocos vegetales donde se encuentran como glicósidos y a ciertos animales en los que se encuentran en forma de agliconas o geninas libres o esterificadas con ácidos como la suberilarginina (1).

Estructuralmente, los principios cardiotónicos esteroidales son de dos tipos: cardenólidos y bufadienólidos (ver figura 1).



digitoxigenina
(cardenólido)

bufalina
(bufadienólido)

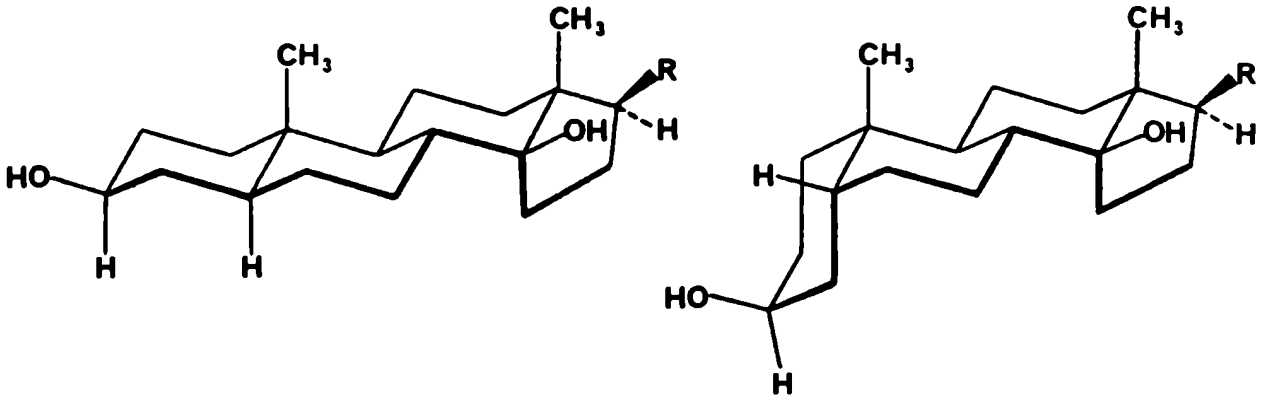
Figura 1: Ejemplos de los distintos tipos de principios cardiotónicos esteroidales.

Los cardenólidos son moléculas de 23 átomos de carbono, cuya cadena lateral consiste en un anillo lactónico de 5 miembros, α,β no saturado (grupo butenólido), caracterizadas además por poseer un grupo hidroxilo en el carbono 14 con orientación β.

Por su parte, los bufadienólidos tienen 24 átomos de carbono, con un anillo lactónico de 6 miembros doblemente no saturado (α-pirona) como cadena lateral y un grupo hidroxilo en posición 14 o un epóxido en 14(15), teniendo en todos los casos orientación β.

La estereoquímica de estos compuestos corresponde a la de un esterol o un ácido biliar en los carbonos 8, 9, 10, 13 y 17, pero la orientación del sustituyente en el carbono 14 es β como se dijo, resultando una unión *cis* entre los anillos C y D.

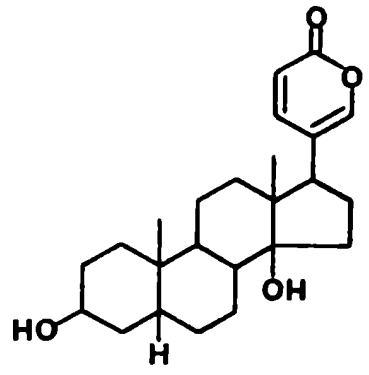
En los bufadienólidos, la orientación del hidrógeno sobre el carbono 5 es β (anillos A y B *cis*) mientras que en los cardenólidos puede ser α, β o poseer un doble enlace en posición 5(6) (ver figura 2). Los bufadienólidos vegetales suelen presentar un doble enlace en la posición 4(5).



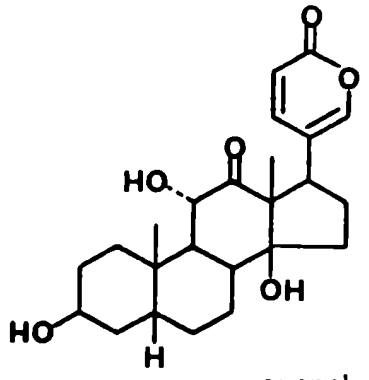
A/B *trans*
C/D *cis*

A/B *cis*
C/D *cis*

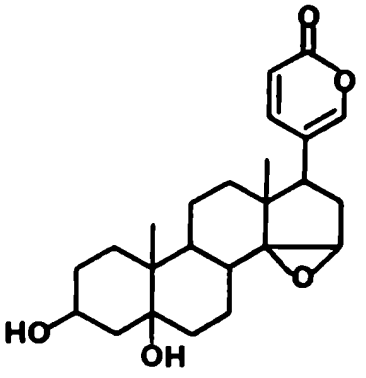
Figura 2: Estereoquímica del sistema tetracíclico saturado de cardenólidos y bufadienólidos.



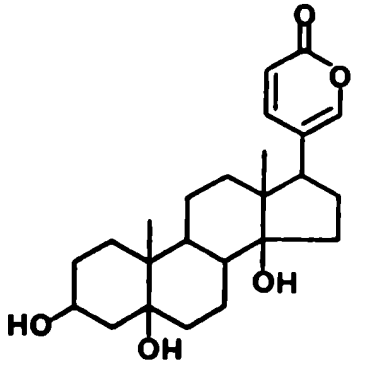
bufalina



arenobufagina



marinobufagina



telocinobufagina

Figura 3: Ejemplos de bufadienólidos de origen animal.

BIOSINTESIS DE BUFADIENOLIDOS

Numerosos investigadores estudiaron la biogénesis de cardenólidos y de bufadienólidos y dentro de estos últimos tanto aquéllos provenientes de vegetales como de animales.

El grupo de los cardenólidos es el que ha sido más amplia y profundamente estudiado[13], pero dado el objetivo principal del presente trabajo no serán extensivamente discutidos, sino que serán tenidos en consideración cuando sus relaciones estructurales con los bufadienólidos permitan la comparación para un mejor entendimiento de los procesos biosintéticos establecidos.

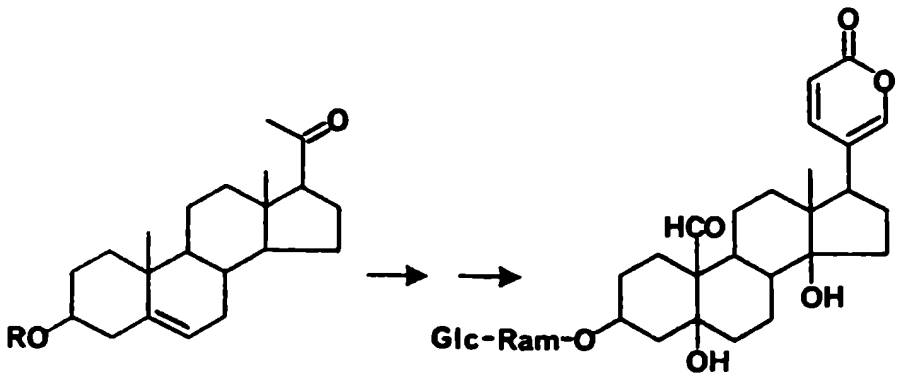
Bufadienólidos de origen vegetal

Los estudios biosintéticos con este tipo de compuestos se han realizado en plantas *Helleborus atrorubens* y en la variedad roja de la *Scilla maritima* o *Urginea maritima*.

Debido a la similitud estructural entre cardenólidos y bufadienólidos, se consideró como probable que la biogénesis de ambos tipos de compuestos estaría muy relacionada.

Tschesche y Brassat[14] en 1965, suministraron el 3-O-glucósido de |21-^{14}C| pregnenolona (17a) a ejemplares de *Helleborus atrorubens*, determinando

que la hellebrina (18) aislada luego de 16 días, era radiactiva. Por acetilación y luego ozonólisis (que se sabía que destruía el anillo lactónico[15]) de la hellebrina marcada, se obtuvo un producto inactivo. Este resultado indicaba que la marcación de la hellebrina estaba en el anillo lactónico solamente y que por lo tanto, la pregnenolona (17) marcada en C-21, se había incorporado directamente y no a través de rupturas degradativas (por ejemplo a acetato) y posterior síntesis del bufadienólido (ver figura 4).



17a R = Glc
17 R = H

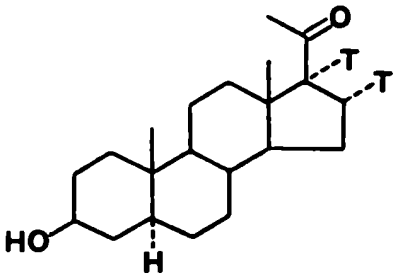
18

Figura 4: Incorporación del glucósido de pregnenolona en hellebrina.

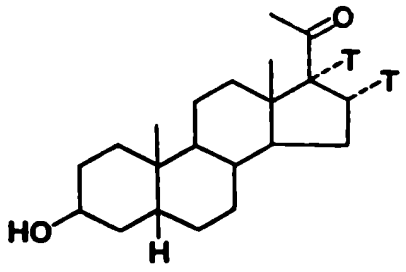
En una experiencia posterior se suministró a ejemplares de la planta antes mencionada, en forma conjunta, |4-^{14}C| pregnenolona (17) y |3α-^{3}H| pregnenolona[16] con el fin de estudiar el mecanismo de hidroxilación en la posición 5 del bufadienólido. Se aisló hellebrina (18) determinándose que

contenía ^{3}H y ^{14}C, pero la relación $^{3}H/^{14}C$ había disminuido respecto de la relación existente entre los compuestos inoculados.

Además, en el mismo trabajo[16], se probaron como precursores |16,17-$^{3}H_2$| 3β-hidroxi-5α-pregnan-20-ona (19) y |16,17-$^{3}H_2$| 3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona (20), que no resultaron incorporadas.



19

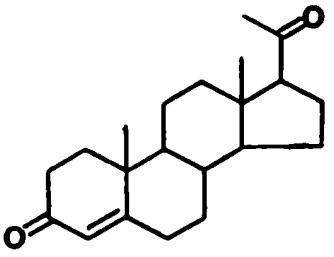


20

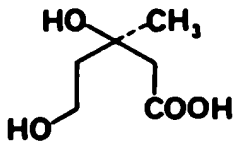
Estos resultados permitieron suponer que la hidroxilación en el carbono 5 no ocurría por sustitución directa de un hidrógeno en esa posición con o sin inversión de configuración, sino por adición de agua al doble enlace 5(6). Además, la retención parcial del ^{3}H en posición 3α indicaba que no era necesaria la formación de un ceto-derivado en posición 3, pero la pérdida de ^{3}H encontrada se podía justificar suponiendo que la pregnenolona (o un derivado relacionado) estaba en equilibrio con progesterona (21) (o un 3-ceto-derivado) que no intervendría directamente en la síntesis de hellebrina (18).

Paralelamente a estos ensayos en *Helleborus atrorubens*, Gros y colaboradores realizaron experiencias con la variedad roja de *Scilla maritima*, en-

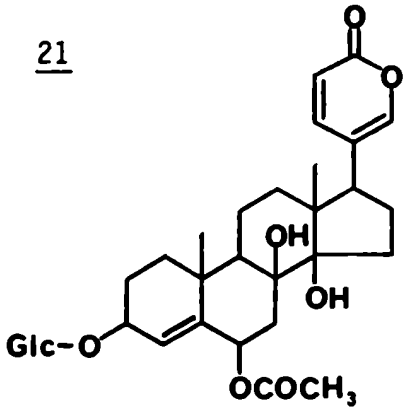
contrando que tanto el ácido |2-^{14}C| mevalónico[17] (22) como la |20-^{14}C| pregnenolona[18] (17) se incorporaban al scillirósido (23), principal bufadienólido de esa planta, confirmando para este vegetal los resultados obtenidos por los investigadores alemanes.



21



22



23

Todos estos resultados establecían el probable origen biológico de 21 átomos de carbono del bufadienólido vegetal, por lo que para llegar a determinar el origen de los átomos de carbono 22, 23 y 24 que completarían el anillo lactónico, procedieron[19,20] a inocular metabolitos pequeños en ejemplares de la variedad roja de la *Scilla maritima*. Entre ellos, se probaron acetato y oxalacetato marcado con ^{14}C en distintas posiciones, demostrándose que este último era el donante de los 3 carbonos necesarios para armar el

anillo lactónico de 6 miembros.[20]

En suma, lo que se conoce al presente sobre la biosíntesis de bufadienólidos vegetales como hipótesis lógica con base en las experiencias realizadas se puede resumir en el siguiente esquema (figura 5)

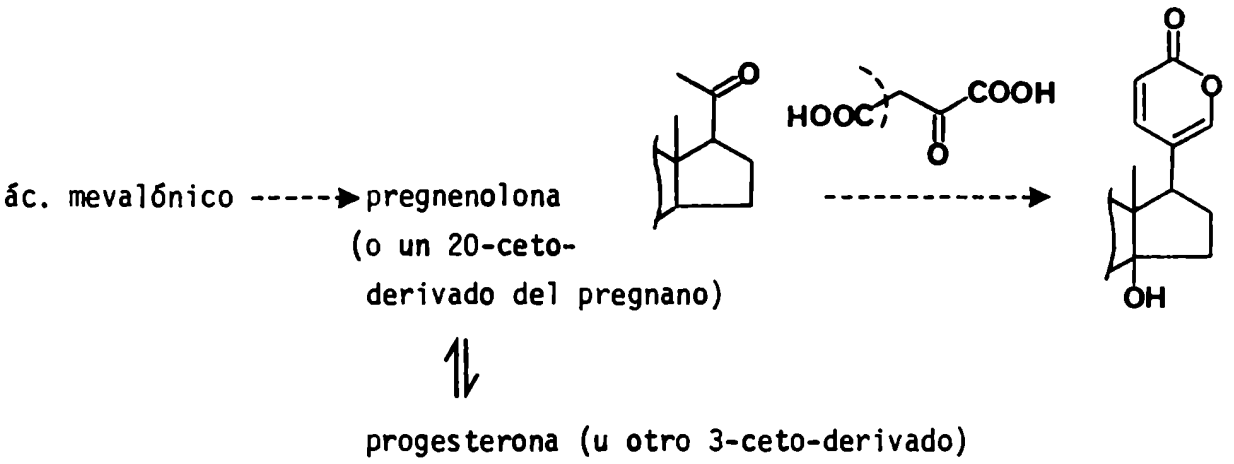


Figura 5: Esquema biosintético de formación de los bufadienólidos de origen vegetal.

En cuanto a la hidroxilación en C-14, ha sido demostrado que, en el caso de los cardenólidos, ésta precede a la formación del anillo butenólido, dado que probables precursores sintéticos conteniendo el anillo lactónico pero faltando el hidroxilo 14β, no resultaban incorporados en el cardenólido[21], mientras que intermediarios tipo pregnano con el grupo hidroxilo en 14β eran buenos precursores de los cardenólidos (ver pág. 32).

En el caso de los bufadienólidos se desconoce si se mantiene la secuencia confirmada para cardenólidos dado que no se han llevado a cabo experien-

los bufadienólidos en sapos, pero que el ácido acético no lo era.

Este razonamiento parece no tener en cuenta el resultado experimental que indica que el ácido acético es precursor del colesterol en organismos animales[24] y en consecuencia resulta difícil explicar que el acetato de sodio radiactivo no se incorpore en los bufadienólidos.

Sin embargo, como el ácido acético es un metabolito primario muy anterior al colesterol y además participa de variados caminos metabólicos, es de esperar una gran dilución y dispersión de la marca para llegar de acetato a colesterol y ésta podría ser una explicación de la falta de marcación evidente o detectable en los bufadienólidos.

Estos resultados se han revisado en parte en la presente tesis, trabajando con cortes de tejido de glándula parotoide de sapos, como se describirá más adelante.

Posteriormente, otros investigadores[25] repitieron las experiencias con |4-^{14}C| colesterol (2) en sapos *Bufo marinus*, encontrando incorporaciones mucho menores en los bufadienólidos que las obtenidas por Siperstein[23].

Los estudios biosintéticos con sapos intactos se ven dificultados por el lento metabolismo del animal, y por el hecho circunstancial de que aparentemente los bufadienólidos se encuentran distribuidos en distintas partes del animal, a pesar de no existir experiencias de *screening* directo que lo corroboren. Así, al suministrar marinobufagina (24) marcada con tritio a sa-

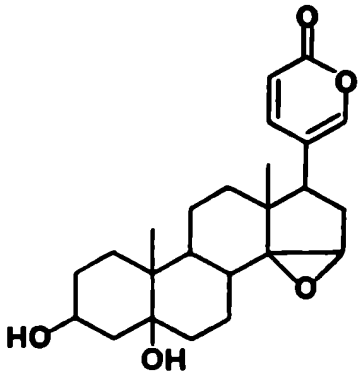
pos *Bufo marinus* hembra[26], se encontró que al cabo de 90 días la mayor parte del bufadienólido radiactivo estaba inalterado en los tejidos ováricos y en cantidades menores en el tracto gastrointestinal, mientras que en el veneno extraído de las glándulas se encontró muy poca marinobufagina (24) radiactiva, siendo la telocinobufagina (25) el producto principal de conversión, aunque ésta no pudo ser identificada correctamente. Este último dato indicaría una posible interconversión entre los bufadienólidos.

Por otra parte, esta experiencia de estudio de distribución de los bufadienólidos en el organismo animal, puede tener poco valor si se considera que es muy probable que los bufadienólidos no sean transportados a través de las membranas de los tejidos que los producen y que al inyectar marinobufagina (24) en el torrente sanguíneo es lógico que se acumule en distintas partes, sin por ello ser una distribución natural.

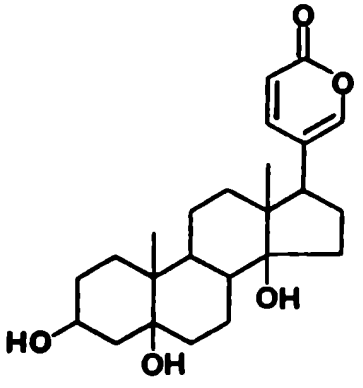
En otros ensayos, Gros y colaboradores[17,27] probaron que el ácido mevalónico (22) marcado se incorporaba en el veneno de sapos *Bufo paracnemis*, pero sólo en la fracción denominada γ-sitosterol (que como ya se mencionó es una mezcla de sitosterol (5), estigmasterol (4), campesterol (3) y colesterol (2)), pero no se incorporaba a los bufadienólidos. Esto replantearía el problema suscitado con el acetato en la experiencia de Siperstein *et al.*[23].

Con el objeto de comprobar si el anillo lactónico de los bufadienólidos en animales y a semejanza de lo hallado para sus homónimos vegetales, tenía

su origen en una condensación entre un derivado esteroidal del tipo 20-ceto-pregnano con una molécula pequeña que proporcionaría los 3 átomos de carbono que restan para formar dicho anillo, distintos grupos de investigadores inyectaron, por una parte |4-^{14}C| pregnenolona (17) a sapos *Bufo marinus*[25], y por otra, |20-^{14}C| pregnenolona[25a] a sapos *Bufo paracnemis*[27]. En ambos casos se obtuvieron resultados negativos, ya que la marinobufagina (24) aislada de esas experiencias no era radiactiva.



24



25

En una experiencia posterior se inoculó |20-^{14}C| colesterol (2)[28] a sapos *Bufo paracnemis*[27] y la marinobufagina (24) aislada al cabo de 78 y 107 días resultó poseer radiactividad. Por oxidación del bufadienólido al ácido etiánico correspondiente, previa acetilación, y degradación de Schmidt de dicho ácido, se determinó que toda la actividad del bufadienólido se encontraba en el carbono 20 (ver figura 6)[27a].

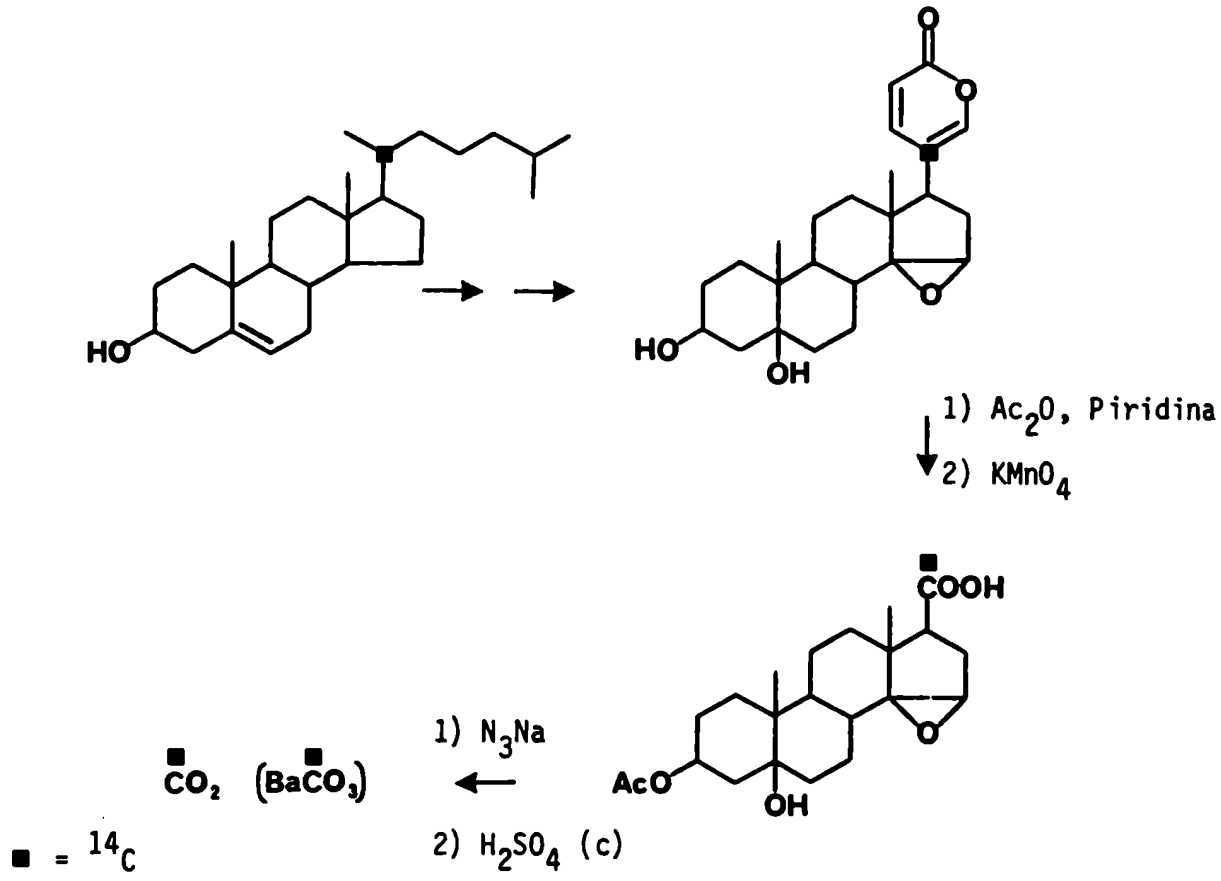
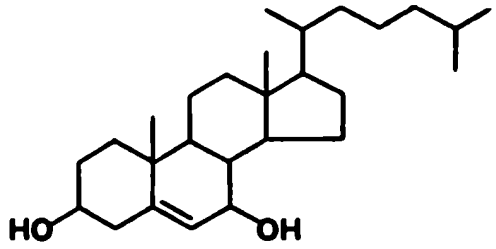


Figura 6: Demostración de la marcación en C-20 del bufadienólido luego de inocular |20-^{14}C| colesterol.

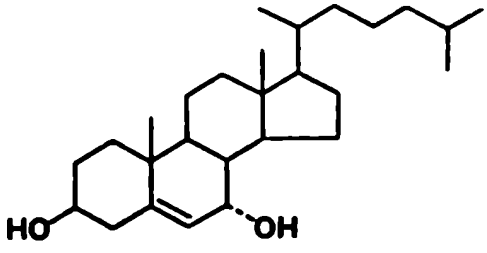
Este resultado positivo, unido a los negativos obtenidos con derivados del pregnano, llevaron a suponer que en el caso de los sapos, el colesterol podía ser transformado inicialmente en un intermediario con estructura de ácido biliar[29] (por ruptura de la cadena lateral entre los carbonos 24 y 25), el que luego sería convertido en los bufadienólidos sin necesidad de condensación posterior con otra molécula más pequeña ya que el intermediario tendría todos los carbonos necesarios para formar el anillo α-pirona.

El hecho de haberse aislado 7β-hidroxicolesterol (26) y 7α-hidroxicolesterol (27) del veneno de sapos[1], compuestos que son intermediarios conocidos en la biosíntesis de ácidos biliares[30,31], apoyaba esa hipótesis, a pesar de que no se encontraron 7-hidroxibufadienólidos en dicho veneno.

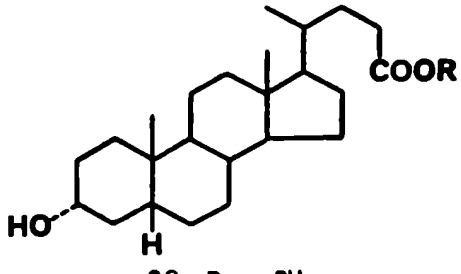
Por otra parte, Chen y Osuch inyectaron a ejemplares de *Bufo marinus*, el éster metílico del ácido |24-^{14}C| 3α-hidroxi-5β-colánico (28), el ácido |24-^{14}C| 3α-hidroxi-5β-colánico (29), el éster metílico del ácido 3β-formoxi-5β-colánico marcado con tritio (30), el ácido |24-^{14}C| 3β-hidroxi-5β-colánico (31) como sal sódica y los ésteres metílicos de los ácidos 3β-hidroxi-5α-colánico (32) y 3β-acetoxicol-5-énico (33) marcados con tritio[25].



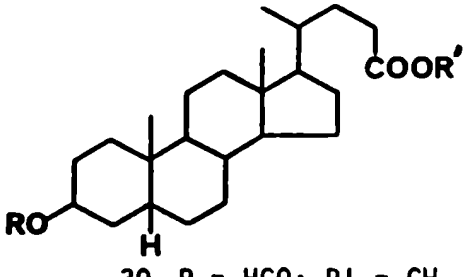
26



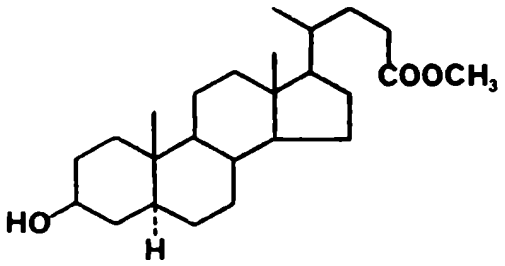
27



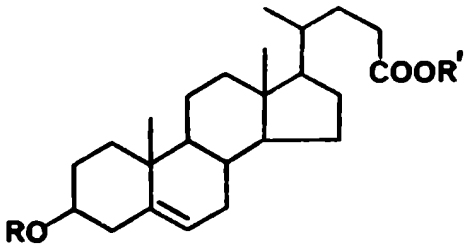
28 R = CH_3
29 R = H



30 R = HCO; R' = CH_3
31 R = R' = H



32



33 R = Ac; R' = CH_3

34 R = R' = H

Los autores mencionados encontraron que los compuestos hidroxilados en 3α no se incorporaban en los bufadienólidos pero sí lo hacían los isómeros 3β. Una prueba definitiva requeriría verificar, en el caso de los precursores marcados con ^{14}C, que el carbono 24 de los bufadienólidos estuviera marcado, experiencia que no fue realizada. Además los bufadienólidos fueron purificados por cromatografía en placa preparativa, e identificados solamente por ccd, con lo cual los resultados obtenidos son de dudoso valor, aunque apoyarían la teoría de un intermediario "tipo ácido biliar" en el camino biosintético que nos ocupa.

Con el objeto de verificar esta hipótesis, otro grupo de investigadores sintetizó |24-^{14}C| colesterol[31a](2) y el ácido |24-^{14}C| 3β-hidroxicol-5-énico [32,33] (34) y los utilizaron en ensayos biosintéticos con sapos *Bufo paracnemis* intactos. En ambos casos las experiencias indicaron que los productos ensayados no resultaron precursores de los bufadienólidos de origen animal[34].

Teniendo en cuenta estos resultados negativos, se descartaría la hipó-

tesis del precursor con cadena de ácido biliar, al menos en las condiciones experimentales empleadas, es decir, utilizando para los ensayos animales intactos.

Se reconsideró entonces la posibilidad de que en animales el proceso biosintético transcurriera a través de un intermediario del tipo 20-ceto-pregnano, pero estructuralmente más cercano al producto final que la pregnenolona. Esta reconsideración de la hipótesis primaria, como se describe en el capítulo Objetivos, motivó el inicio de este trabajo.

CAPITULO 2

OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION

El objetivo fundamental de este trabajo fue continuar el estudio del proceso de la biosíntesis de bufadienólidos de origen animal.

Con base en los datos de que se disponía acerca de las diversas experiencias realizadas utilizando compuestos marcados con trazadores radiactivos y tomando en cuenta los conflictivos resultados obtenidos (véase el capítulo Introducción, biosíntesis de bufadienólidos), se decidió en principio replantear el problema considerando los mecanismos biosintéticos conocidos para la formación de compuestos con estructura esteroidal.

De ello son de destacar las siguientes consideraciones:

Es extremadamente probable que los bufadienólidos de origen animal provengan de colesterol, el esterol más abundante en los organismos animales, dada la relación estructural entre ambos, o provengan de otro intermediario esteroidal estrechamente relacionado con el colesterol y que esté en el camino biosintético o metabólico del mismo.

En ese caso, ya que colesterol proviene universalmente de acetato a través de mevalonato, estos dos precursores primarios deberían ser a su vez precursores de los bufadienólidos.

Para el caso de acetato, no se pudo probar experimentalmente en forma directa su rol de precursor de bufadienólidos en sapos[23], mientras que para el caso de mevalonato, las experiencias realizadas indican que el mismo es incorporado en el colesterol glandular y hepático pero no en bufadienólidos[17,27].

El propio colesterol, marcado con ^{14}C en C-4 y en C-20, se incorpora en la marinobufagina[23,27a]; en el último caso se demostró por degradación, que el C-20 de la marinobufagina era el exclusivo portador de la marca. Esta evidencia es la más firme que se encuentra en la literatura.

Aceptado el colesterol o por seguro el sistema tetracíclico del mismo como precursor, quedaban por investigar los pasos hasta los bufadienólidos, los intermedios que existían en el camino, enzimas que catalizaran las transformaciones y los lugares donde se producían estos intermediarios.

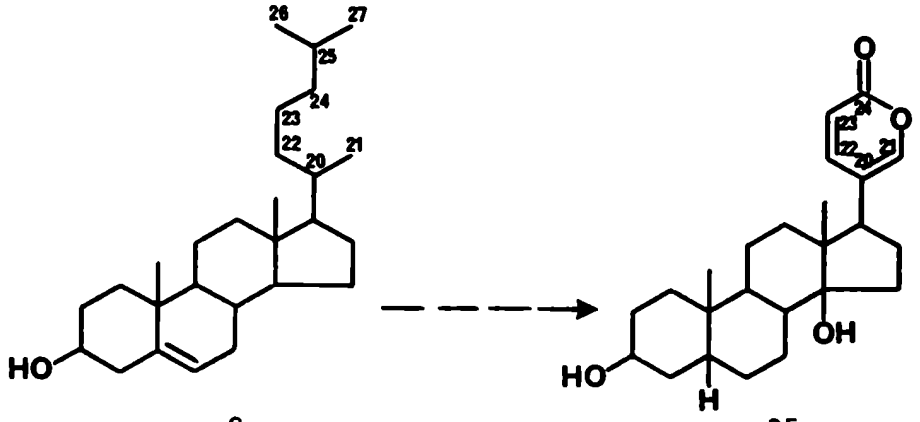
Desde el punto de vista de un químico orgánico, el problema está fundamentalmente dirigido a identificar todos los intermediarios presentes en el camino biosintético, aunque el conocimiento de las enzimas actuantes y los sitios de biosíntesis, constituye una herramienta poderosa para la planificación de las experiencias que permitan dilucidar las estructuras de los mencionados intermediarios.

Los pasos hasta colesterol, deben involucrar a los ya conocidos desde acetato, pasando por mevalonato, escualeno[35], etc. pero no es conocido si el sitio donde se biosintetizan los bufadienólidos, es también aquél donde se biosintetiza colesterol *de novo*.

Ha sido previamente establecido que los bufadienólidos se sintetizan en las glándulas de la dermis presentes en la mayor parte de la piel de los sa-

pos, aunque concentradas y de mayor tamaño en la zona ubicada detrás de los ojos (las glándulas parotoides), y además que el llamado "veneno de sapo" que elaboran esas glándulas también contiene colesterol[3], aunque se desconoce si ese colesterol, hipotéticamente usado para la biosíntesis de bufadienólidos, se sintetiza en las glándulas o proviene del hígado o de otros órganos a través de la corriente sanguínea.

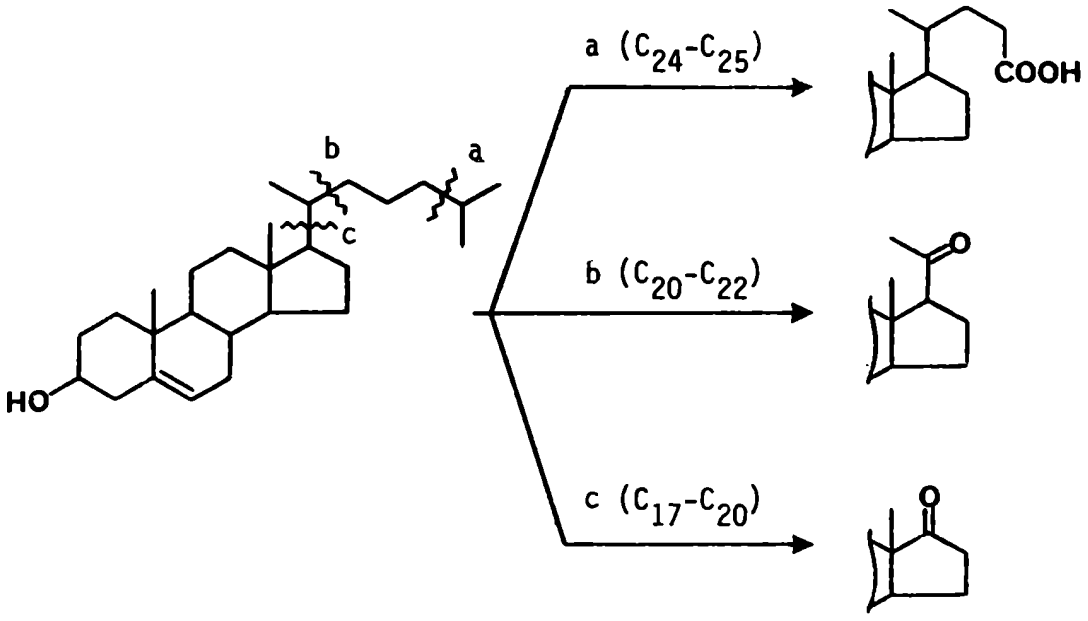
Si se considera el bufadienólido más sencillo, la bufalina (35) y se lo compara con colesterol (2), se pueden observar las diferencias estructurales entre ambos compuestos:



2 35

De ello, uno de los pasos teóricamente necesarios para transformar colesterol en bufadienólidos (en este caso, bufalina) es la ruptura de la cadena lateral del esterol puesto que éste contiene 27 carbonos, mientras que un bufadienólido posee sólo 24 carbonos. Es conocido que los sitios más favorecidos de ruptura enzimática de la cadena lateral son aquéllos donde exis-

ten ramificaciones, por lo que habría tres rupturas probables de dicha cadena lateral, que están avaladas por las conocidas transformaciones de colesterol en ácidos biliares, pregnanos y androstanos[36] respectivamente.



La primera, ruptura entre C-24 y C-25, productora de una cadena lateral de tipo ácido biliar, conduce al número justo de carbonos y sólo harían falta hidroxilaciones y deshidrataciones para completar el anillo lactónico de los bufadienólidos.

La segunda, ruptura entre C-20 y C-22, apoyada por el conocimiento de que los bufadienólidos de origen vegetal provienen de pregnenolona, conduce a un 20-ceto-derivado al que le faltarían 3 átomos de carbono para formar el

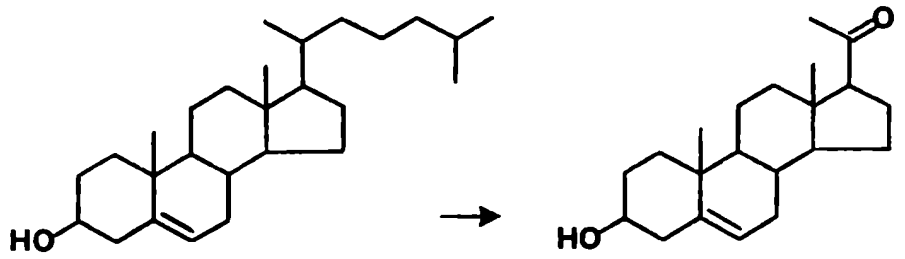
anillo α-pirona. En el caso de los bufadienólidos de origen vegetal ha sido establecido[20] que el oxalacetato podría proporcionar los átomos de carbono que le faltan a un intermediario tipo pregnano para constituir la α-pirona.

La tercera, ruptura entre C-17 y C-20, conduce a un derivado tipo androstano, que necesitaría toda la cadena lateral, en este caso el anillo α-pirona completo o un radical tipo 2-pentilo para formar el mencionado anillo lactónico.

Las experiencias realizadas con colesterol marcado con ^{14}C en el C-20[27] y con colesterol marcado en el C-24[34], demostraron que el C-20 del esterol quedaba formando parte del bufadienólido marinobufagina mientras que el C-24 era eliminado durante la formación del bufadienólido, por lo que la única ruptura posible de las tres mencionadas, que concordaría con los resultados logrados con colesterol marcado, es la segunda, entre C-20 y C-22 conduciendo, como ya se señaló a un intermediario tipo pregnano.

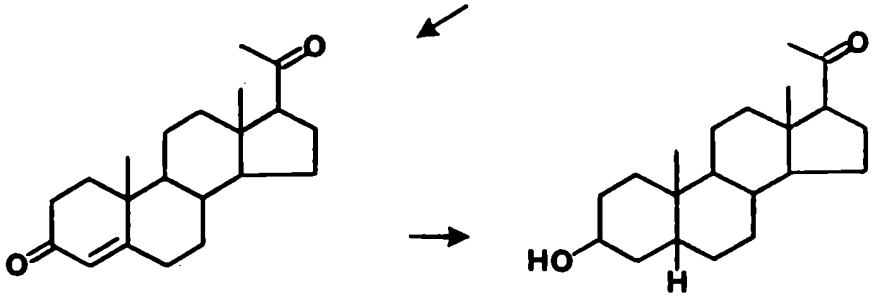
Otra de las transformaciones necesarias para obtener bufalina a partir de colesterol, es la hidrogenación estereoespecífica del doble enlace 5(6), para ubicar al hidrógeno en C-5 orientado β, o sea lograr unión *cis* entre los anillos A y B. Esta hidrogenación podría ser directa aunque no hay antecedentes, o bien pasando por un intermedio Δ^4-3-ceto y posterior reducción como ocurre con cardenólidos[37] y con ácidos biliares[38], lo que se puede ejemplificar con digitoxigenina (36) y ácido cólico (37) respectivamente:

Secuencia biosintética de digitoxigenina a partir de colesterol.



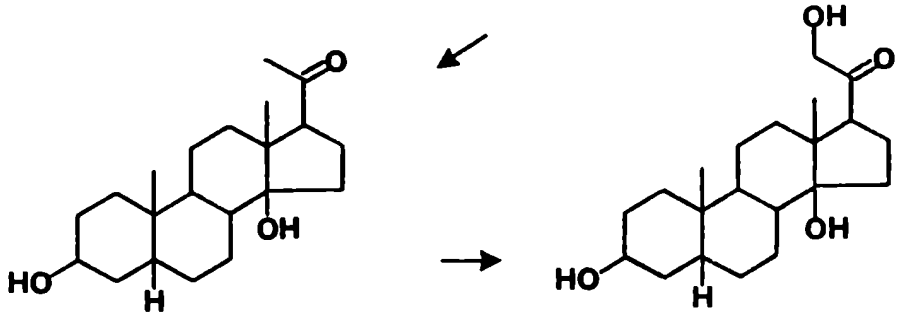
colesterol

pregnenolona



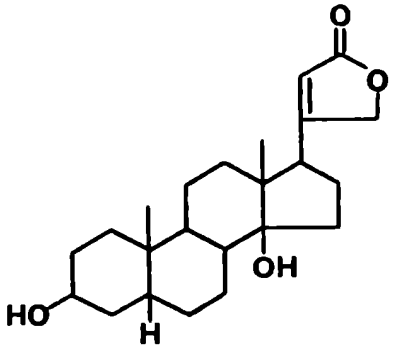
progesterona

5β-pregnanolona



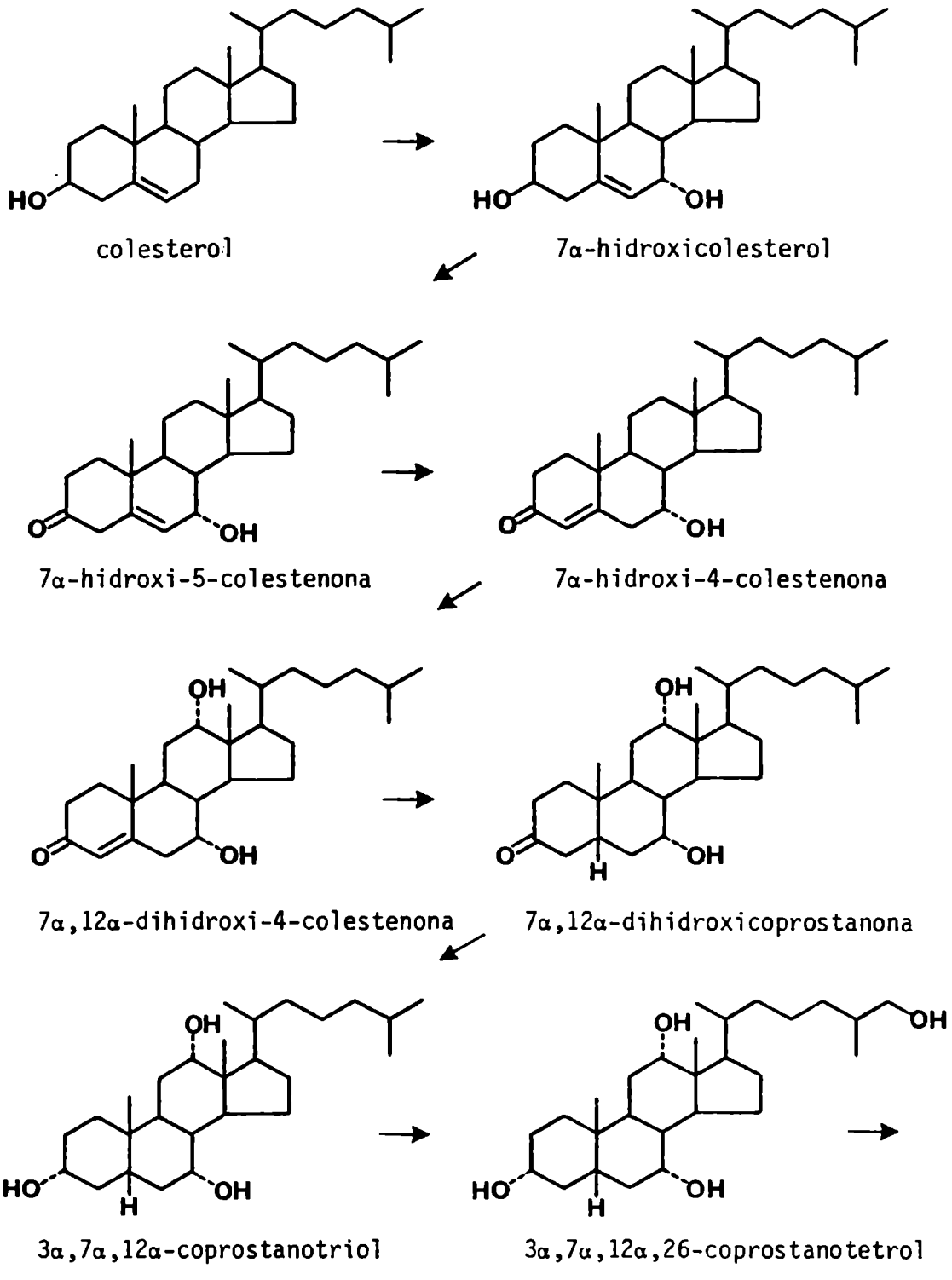
14β-hidroxi-5β-pregnanolona

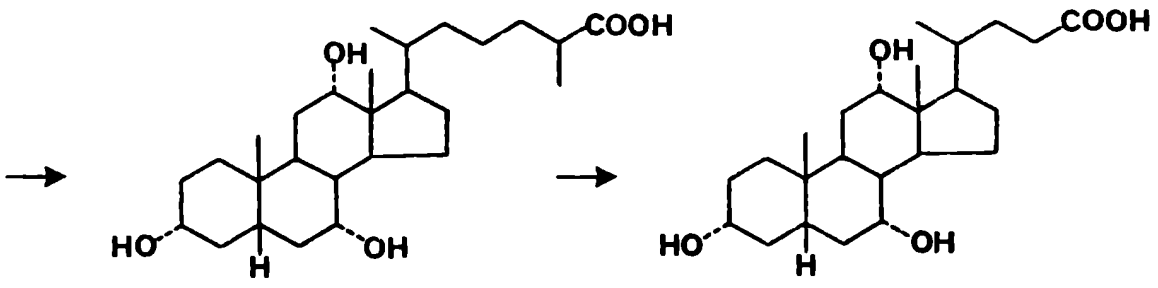
14β,21-dihidroxi-5β-pregnanolona



36

Secuencia biosintética de ácido cólico a partir de colesterol.





ác. 3α,7α,12α-trihidroxi-26-coprostanoico

37

Otro paso de singular importancia y que no tiene paralelo en otros esteroides de origen animal es la hidroxilación en el C-14 con orientación β, conducente a una estereoquímica *cis* entre los anillos C y D.

Algunos esteroides de origen vegetal, por ejemplo los cardenólidos, también poseen un hidroxilo en posición 14 con orientación β.

Esto es de especial interés, ya que es conocido[39] que la hidroxilación de esteroides en átomos de carbono no vinílogos ocurre por desplazamiento directo de un hidrógeno con retención de configuración, o sea que el hidroxilo entrante asume la estereoquímica del hidrógeno saliente.

Dado que colesterol[40-42] (2), pregnenolona[43,44] (17) y progesterona[45] (21), que poseen el hidrógeno en posición 14 con orientación α, se incorporan a los cardenólidos, sería de esperar que si la hidroxilación ocurriera por el mecanismo conocido, se obtuvieran productos con un hidroxilo 14α en lugar de 14β, como realmente ocurre.

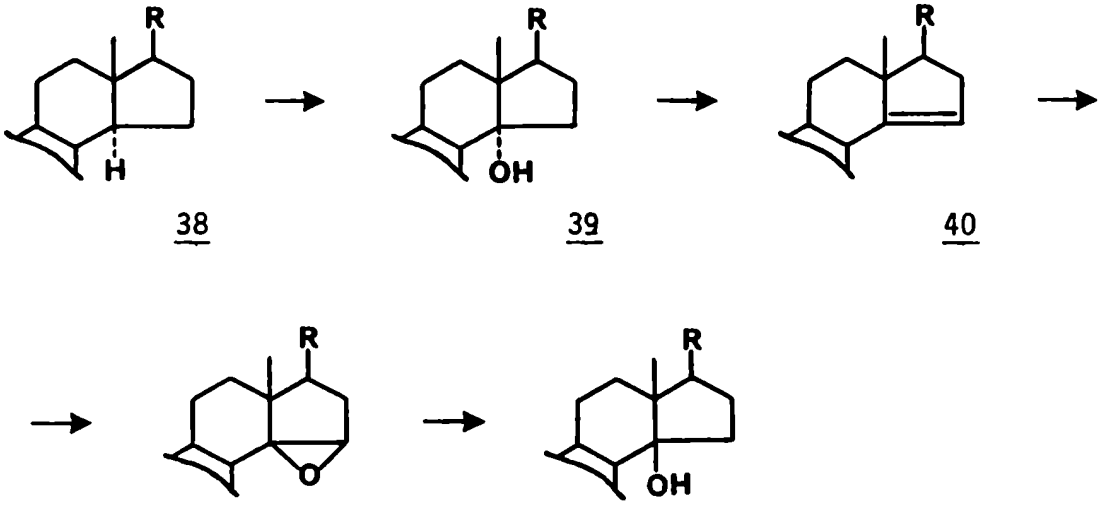
Para justificar este hecho, Caspi y Lewis[46] plantearon dos hipótesis,

partiendo de la suposición común a ambas de que, en un precursor esteroidal con el hidrógeno en posición 14α (38), ocurriera una hidroxilación normal dando un 14α-hidroxi-derivado (39), el cual se invertiría al compuesto 14β-hidroxilado. La primera parte de esta teoría se ve apoyada por el aislamiento de esteroides 14α-hidroxilados de plantas[47,48].

Una de las hipótesis supone que la secuencia de inversión se inicia por deshidratación del alcohol terciario para producir la olefina 14(15) (40), que por oxidación por la cara β daría lugar al 14β,15β-epóxido (41).

La existencia en la Naturaleza de bufadienólidos conteniendo agrupaciones 14β,15β-epóxido sirve como antecedente para el apoyo a esta suposición.

Finalmente, la apertura reductiva del epóxido (41) por ataque en el carbono 15 produciría el alcohol 14β tal cual lo muestra el esquema siguiente:

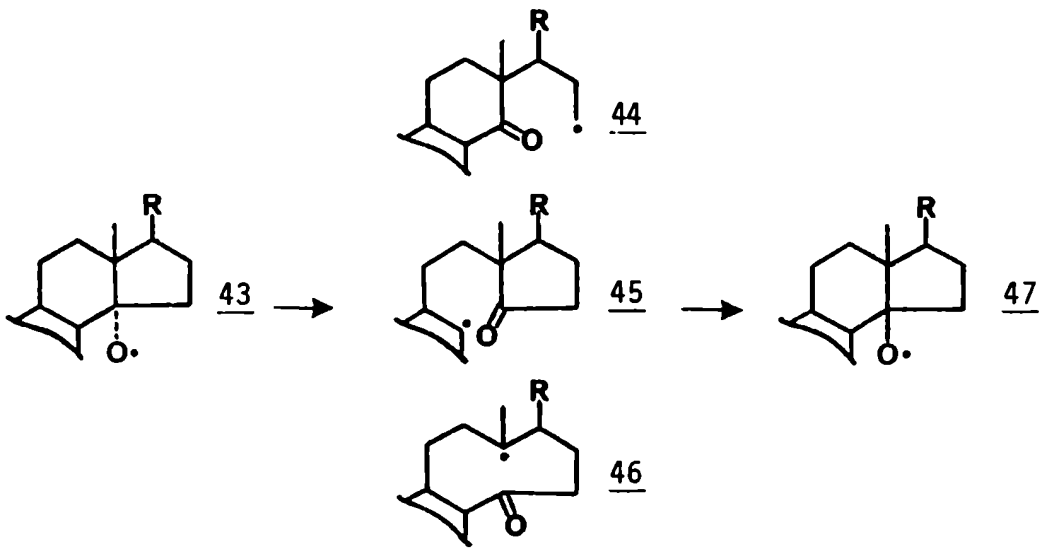


38 39 40

41 42

Alternativamente, la deshidratación del alcohol 14α podría dar lugar a la olefina 8(14), que por oxidación estereoespecífica conduciría a un 8β, 14β-epóxido, que por ataque reductivo en el carbono 8 produciría el alcohol 14β (42).

La segunda hipótesis de Caspi y Lewis[46] supone que el proceso de inversión de configuración del grupo hidroxilo en el carbono 14 puede ser por radicales libres y no iónico, teniendo en cuenta que la biosíntesis de cardenólidos ocurre en las hojas[43,49,50]. Por influencia de la luz solar el 14α-hidroxi-derivado (39) podría originar el radical oxi (43). Este tipo de radicales se reordena a radicales ceto[47] como 44, 45 y 46.



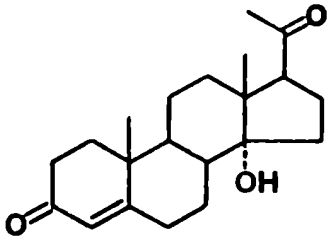
Posteriormente, el cierre del anillo podría ocurrir con inversión de la configuración en el carbono 14 dando el radical 14β-oxi (47) y finalmente el

alcohol 14β (42).

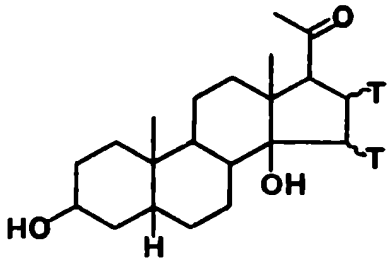
Por otra parte, en ninguna de las dos hipótesis la hidroxilación inicial está limitada al carbono 14, sino que puede ocurrir en los carbonos 8 ó 15 y luego esos hidroxicompuestos podrían transformarse en un alcohol 14β por mecanismos similares a los propuestos.

Para probar estas hipótesis se efectuaron numerosos ensayos.

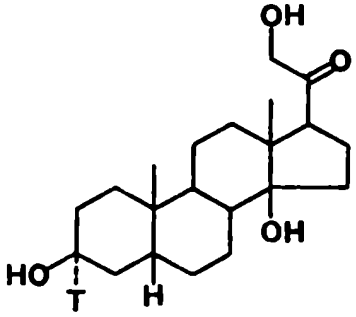
A pesar de que la progesterona (21) era precursora de los cardenólidos [45], se demostró que la 14α-hidroxiprogesterona (48) no lo era[46]. Por otra parte, resultaron buenos precursores la |15,16-$^{3}H_{2}$| 3β,14β-dihidroxi-5β-pregnan-20-ona (49) y la |3α-^{3}H| 3β,14β,21-trihidroxi-5β-pregnan-20-ona (50), lo cual indicaba que la hidroxilación en el carbono 14 ocurría con anterioridad a la formación del anillo butenólido.



48



49



50

Canonica y colaboradores[51] utilizando ácido mevalónico doblemente marcado, (3R) |(2R) 2-^{3}H-2-^{14}C|, como también una mezcla de |15β-^{3}H| y |4-^{14}C| progesterona (21) y también una mezcla de |15α,15β,21,21,21-$^{3}H_{5}$| y |4-^{14}C|

pregnenolona (17), en distintos ensayos biosintéticos, demostraron que los hidrógenos de carbono 15 de los precursores no intervenían en el mecanismo de hidroxilación en el carbono 14, lo cual descartaba todos los intermediarios con un doble enlace entre C-14 y C-15.

En cuanto a la posible intervención del hidrógeno en C-8, la literatura ofrece dos experiencias que se contradicen.

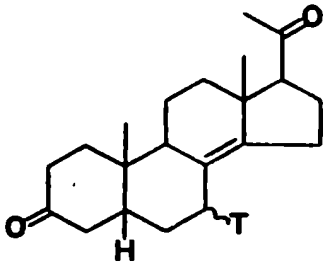
Caspi y colaboradores[52] encontraron que administrando una mezcla de |8β-^{3}H| colesterol (2) y |4-^{14}C| colesterol a plantas *Digitalis lanata*, se obtenían cardenólidos radiactivos en los que la relación de isótopos $^{3}H/^{14}C$, tenía igual valor que la medida para la mezcla inicial de precursores.

Según este resultado, el hidrógeno en 8β no intervendría en la introducción biológica del hidroxilo en 14β, o sea quedarían eliminados los intermediarios con doble enlace entre C-8 y C-14, como así también aquéllos con insaturación 7(8) y 8(9).

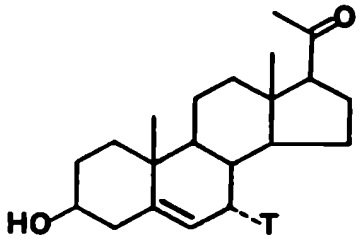
Sin embargo, Tschesche y Kleff[53] administraron |7-^{3}H| 5β-pregn-8(14)-en-3,20-diona (51), |7α-^{3}H| pregnenolona (52) y |6-^{3}H| 7,8-dehidroprogesterona (53) a plantas *D. lanata* encontrando que los dos primeros eran precursores de digitoxigenina (36) pero no el último.

Estos últimos autores, sobre la base de sus resultados propusieron que la hidroxilación en C-14 podía ocurrir por formación del epóxido 8β,14β y apertura reductiva del mismo.

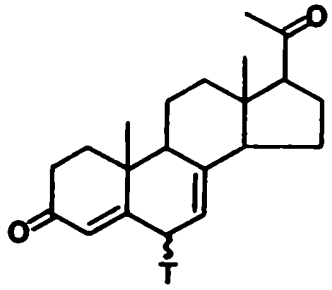
Esta hipótesis resulta apoyada porque entre los productos de hidrogenación catalítica de la adinerigenina (54) se identificó a la dihidrodigitoxigenina[53] (55), con lo cual el 8β,14β epóxido podría transformarse reductivamente en un alcohol 14β.



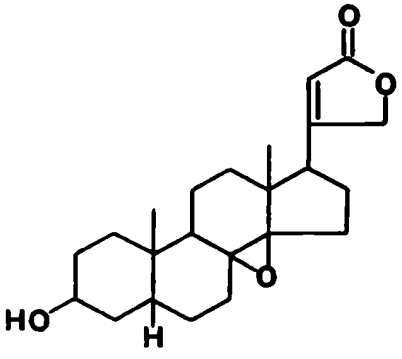
51



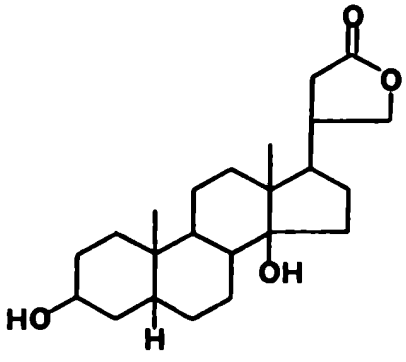
52



53



54



55

Con los datos existentes hasta el momento, no es posible establecer el mecanismo biosintético de la hidroxilación β en el carbono 14 para los cardenólidos.

En el caso de los bufadienólidos, todavía no se han realizado experiencias en ese sentido, pero si como ocurre con cardenólidos, las hidroxilacio-

nes y arreglos del sistema tetracíclico tienen lugar antes de la formación del anillo lactónico (en este caso α-pirona), entonces puede suponerse que los tres pasos necesarios (para el ejemplo de la bufalina) son: la hidrogenación en 5β, la hidroxilación en 14β y la modificación de la cadena lateral del colesterol, pero en principio desconociéndose la secuencia con que ocurren.

En la figura 7 se plantean las posibilidades hipotéticas que conducirían desde colesterol hasta un bufadienólido, teniendo en cuenta por lo antedicho, que las modificaciones en el sistema tetracíclico se producirían antes de la formación del anillo α-pirona y que la ruptura de la cadena lateral de colesterol ocurre entre C-20 y C-22 exclusivamente.

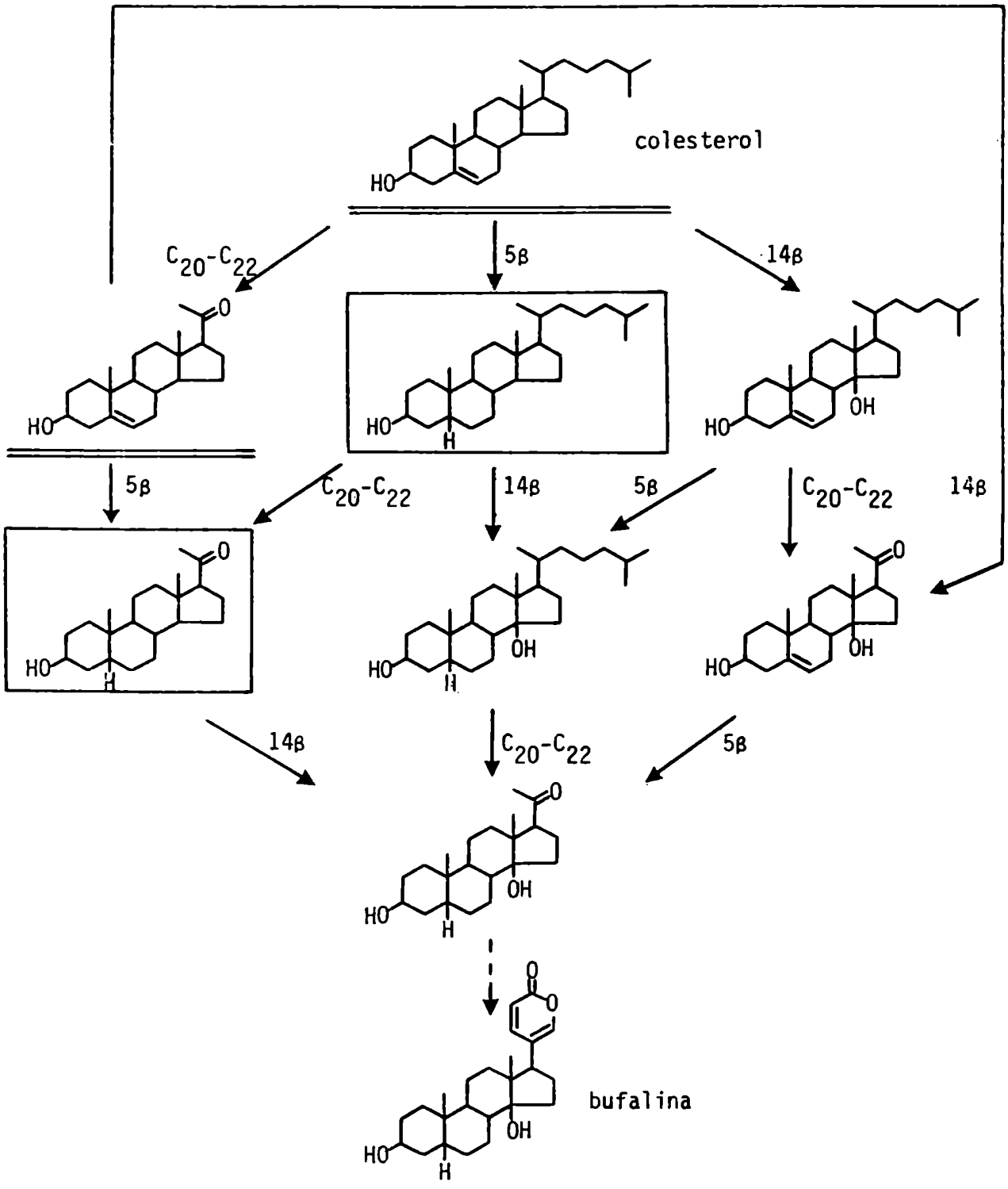


Figura 7: Posible esquema biosintético de colesterol a un bufadienólido de origen animal (en este caso, bufalina).

Como ya se ha indicado, colesterol y pregnenolona (subrayados en la figura 7) marcados en C-20, habían sido ensayados en experiencias biosintéticas con sapos intactos con distintos resultados, ya que mientras se logró incorporación positiva para el primero[27a], para el segundo resultó negativa [18,27].

En el presente trabajo, y tratando de esclarecer el mecanismo de biosíntesis que nos ocupa, se pretendió aproximarse estructuralmente al producto final y para ello se realizó la síntesis de las sustancias recuadradas en la figura 7: 3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona marcada en C-20 con ^{14}C, la misma marcada en C-21 con ^{14}C y 5β-colestan-3β-ol marcado en C-21 con ^{14}C y se probaron sus posibles roles como precursores de los bufadienólidos de origen animal.

En los dos primeros casos, se trataba de 20-ceto-pregnanos con estereoquímica *cis* entre los anillos A y B, marcados en carbonos distintos de la cadena lateral. En el otro caso se trataba de coprostanol, que posee cadena lateral intacta y como en los casos anteriores tiene estereoquímica *cis* entre los anillos A y B, también marcado en la cadena lateral.

Estos tres compuestos esteroidales marcados en los carbonos indicados con ^{14}C, no habían sido sintetizados hasta el momento.

Como ya se había indicado un precursor simple como el ácido mevalónico resultaba incorporado en el colesterol componente del "veneno glandular",

pero no existían pruebas concretas sobre la biosíntesis *de novo* de colesterol en glándulas parotoides.

Por ello, otro de los objetivos perseguidos en el presente trabajo, fue el de establecer el origen biosintético del citado colesterol glandular.

Como todas las experiencias realizadas eran llevadas a cabo con animales intactos, permanecía desconocido si el colesterol que se transformaba en bufadienólidos en las glándulas de la piel de los sapos, era sintetizado *de novo* por las glándulas mismas o se formaba en otro lugar y luego era traslocado a las glándulas.

Para saber si las glándulas venenosas eran o no capaces de sintetizar colesterol *de novo* se realizaron incubaciones *in vitro* con $|1\text{-}^{14}C|$ acetato de sodio y $|5\text{-}^{3}H|$ mevalonolactona con cortes de tejido de glándula parotoide de sapos *Bufo arenarum* y los resultados de incorporación de marcación se compararon con aquéllos obtenidos en experimentos similares realizados con cortes de tejido de hígado de los mismos sapos.

Además, en un intento de verificar la probable provisión de colesterol a la glándula a través de lipoproteínas transportadoras, se investigó la presencia de sitios de unión de las lipoproteínas en las membranas plasmáticas glandulares y la incorporación de las lipoproteínas dentro del tejido glandular.

Como también se había indicado (pág.16), de la inyección de ácido meva-

lónico radiactivo se había aislado la fracción llamada "γ-sitosterol" radiactiva. Esta mezcla de esteroles, que en ccd se comporta como un solo producto, contiene colesterol y otros esteroles con cadena lateral ramificada (pág.2) que son considerados de origen vegetal.

Era importante conocer si la radiactividad estaba presente sólo en el colesterol o también en los otros esteroles, para determinar si los sapos los biosintetizaban o solamente los ingerían con la dieta.

Para ello se separó el "γ-sitosterol" en sus componentes y se los analizó para ver cuál o cuáles eran los responsables de la radiactividad.

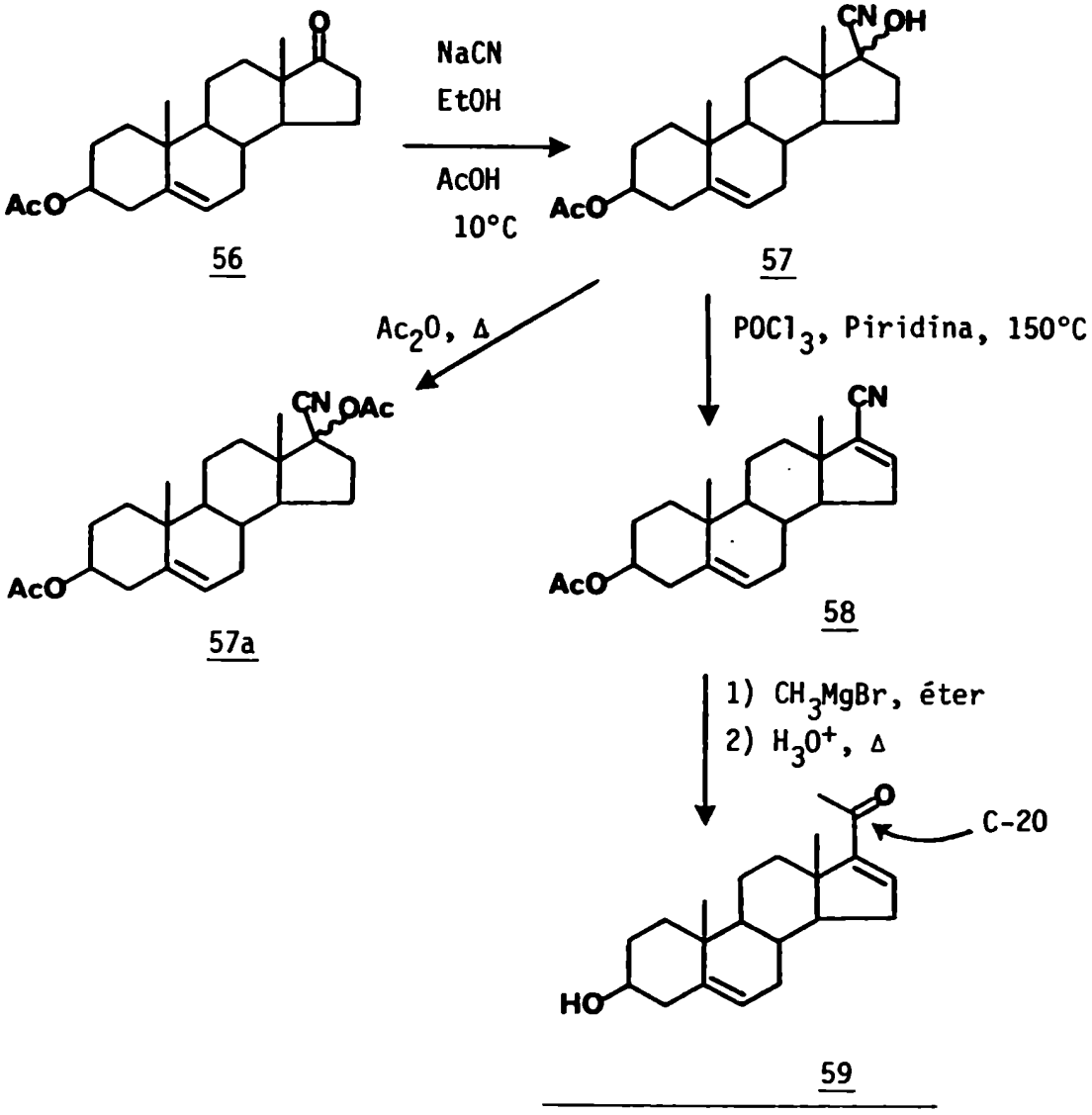
CAPITULO 3

DESCRIPCION DE LA LABOR REALIZADA

A) PROCESOS SINTETICOS

A.1) SINTESIS DE 3β-HIDROXIPREGNA-5,16-DIEN-20-ONA (59).

El esquema sintético, encaminado a obtener un 20-ceto-pregnano marcado en el C-20, fue el siguiente:



Este esquema, con pequeñas modificaciones ya se había utilizado previamente[54,25a] para la obtención de pregnanos a partir de androstanos.

En este caso, la síntesis se realizó para probar condiciones óptimas de cada una de las reacciones de la secuencia, con vistas a ejecutar las mismas con otro esteroide de partida, cuya única diferencia con el compuesto 56 es que estaría reducido el doble enlace Δ^5 con una estructura de 5β-androstano.

Además, como la marcación isotópica, según este método, debía introducirse en el primer paso utilizando cianuro marcado, todos los pasos debían controlarse de tal modo de obtener el mayor rendimiento químico y radioquímico posibles.

a) Obtención de la cianhidrina (56 → 57).

El método de Porto y Gros[25a], modificación del de Butenandt y Schmidt-Tomé[54], que consistía básicamente en el calentamiento a 80°C de un tubo cerrado en forma de Y invertida conteniendo en una rama una solución etanólica del esteroide 56 más cianuro de potasio, y en la otra rama ácido acético, invirtiéndose el tubo para mezclar los componentes antes del calentamiento, no dio resultados satisfactorios aunque se probó en numerosas oportunidades.

En consecuencia, se ensayó otra técnica[55] en la que se agregaba el ácido acético lentamente durante 2 hs a la solución del esteroide 56 en etanol y el cianuro de sodio sin disolver contenidos en un balón cerrado con un tapón de látex y mantenido a 10°C.

Este último método dio resultados prácticamente cuantitativos utilizando un exceso de 10 a 1 de cianuro con respecto a esteroide.

Pero como el cianuro a utilizar más adelante, debía ser $|^{14}C|$ cianuro de sodio, pese al óptimo rendimiento químico respecto del esteroide, esta relación conduciría a un rendimiento radioquímico muy bajo (un máximo de 10%, sin considerar las diluciones).

Por el contrario cuando la relación de los reactivos fue 1 a 1 el rendimiento químico decreció a un 20-30% respecto del esteroide.

Teniendo en cuenta además, la dificultad de separar la cianhidrina 57 del compuesto carbonílico 56 por métodos cromatográficos (dicha cianhidrina se descomponía parcialmente perdiendo ácido cianhídrico y regenerando el compuesto de partida cuando se la intentaba purificar por ccd preparativa de alúmina o silicagel), se decidió probar con otras relaciones de reactivos.

Así se ensayaron relaciones 5:1, 2:1 y 2,5:1 de cianuro a esteroide, verificándose que esta última conducía a un rendimiento de aproximadamente 80% del compuesto 57 a partir del compuesto 56.

Puesto que los dos rendimientos, el químico y el radioquímico (en el caso de usar cianuro marcado) estaban en contraposición, se consideró adecuada como una solución intermedia, la relación 2,5:1 de cianuro a compuesto carbonílico.

Es necesario destacar que aunque esta reacción conduce a una mezcla epi-

mérica en C-17, la dificultad desaparece en la siguiente reacción de deshidratación, ya que los dos epímeros dan lugar al mismo producto 58.

b) Deshidratación de la cianhidrina (57 → 58) (57 → 57a).

Se siguió en principio la técnica empleada por Porto y Gros[25a], es decir un calentamiento en tubo cerrado a 150°C de la cianhidrina 57 disuelta en piridina y con el agregado de un deshidratante como el oxicloruro de fósforo. Estos autores describieron un rendimiento de 50%, mientras que Butenandt y Schmidt-Tomé[54] describían 79% para la misma reacción.

Durante la reacción (90 minutos) se observó un progresivo oscurecimiento de la mezcla y al finalizar se obtuvo una solución de color casi negro.

El producto, aislado en la forma habitual por extracción, se cromatografió para obtener el compuesto 58, pero con un rendimiento no mayor que 50%.

Estas observaciones motivaron la búsqueda de algún otro método deshidratante más suave o más efectivo.

Teniendo en cuenta que se trataba de un hidroxilo terciario, se pensó que un posible método era calentar la cianhidrina con anhídrido acético a reflujo. En realidad esto condujo al compuesto acetilado en C-17 (57a), no produciéndose la deshidratación buscada.

También se probó el uso de cloruro de tionilo a diferentes temperaturas, pero no se obtuvo el compuesto que se deseaba lograr.

En consecuencia, para la reacción de deshidratación se utilizó el méto-

do del oxicloruro de fósforo ya mencionado.

c) Obtención de la dehidropregnenolona (58 → 59).

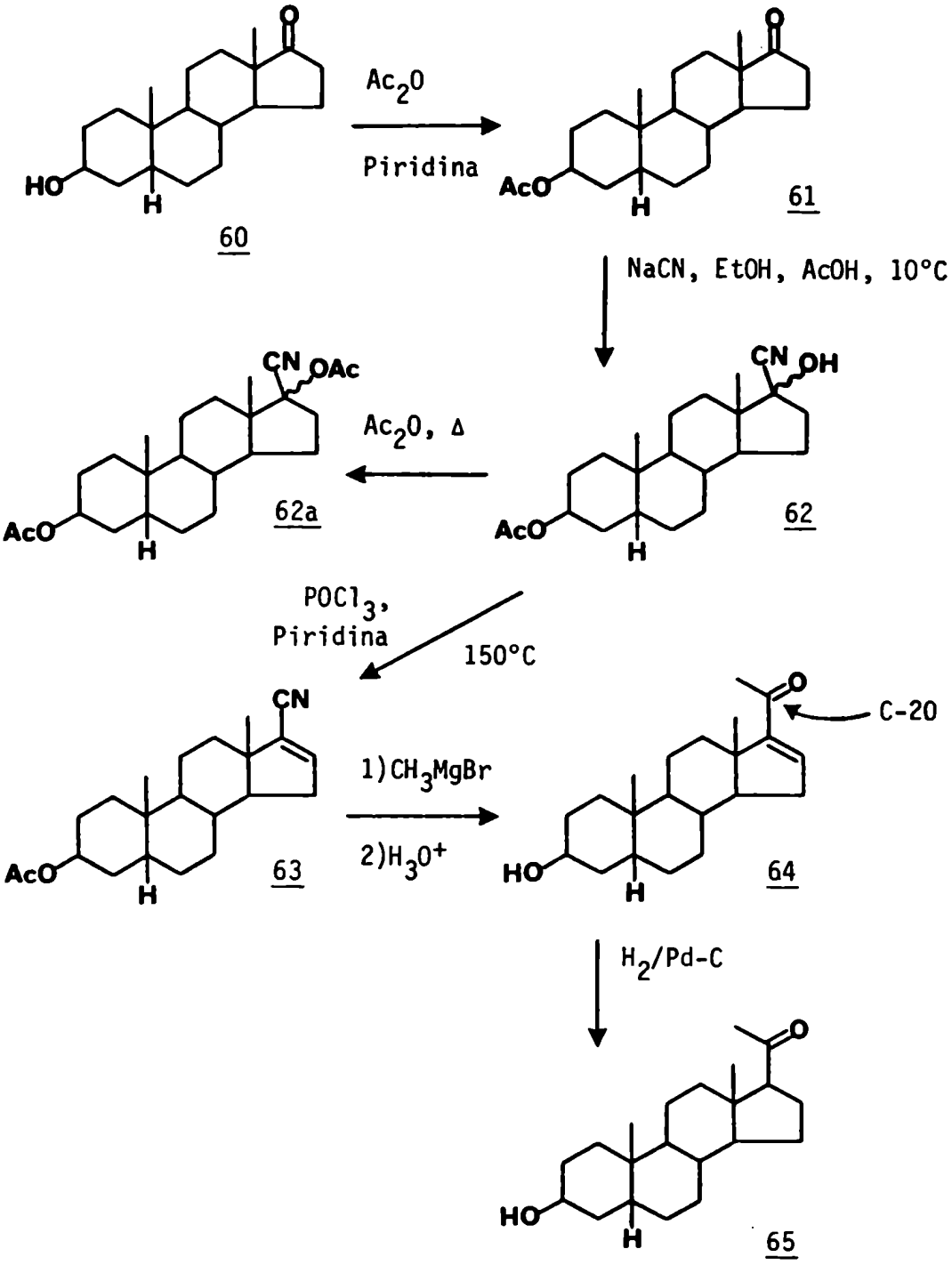
Siguiendo la misma técnica conocida[25a] se efectuó la reacción de Grignard con bromuro de metilmagnesio sobre el nitrilo 58.

La reacción es más lenta que con un compuesto carbonílico y debió efectuarse con un gran exceso de reactivo organomagnésico en éter y calentamiento a reflujo durante 46 hs.

El compuesto nitrogenado intermedio se hidrolizó calentándolo en medio ácido acético para conducir a la metilcetona deseada (59) con un rendimiento de 57% luego de recristalizada.

A.2) SINTESIS DE 3β-HIDROXI-5β-PREGNAN-20-ONA (65).

El esquema sintético a seguir era esencialmente el mismo que el recién descripto para la obtención del compuesto 59.



Es necesario aclarar que al producto buscado (65), no era conveniente sintetizarlo por hidrogenación directa de la dehidropregnenolona 59, ya que es conocido[56] que los compuestos con hidroxilo 3β y con doble ligadura 5(6), se reducen preferencialmente originando productos con orientación α del hidrógeno en C-5, es decir estructuras saturadas en las cuales la unión entre los anillos A y B es *trans*, contrariamente al propósito deseado.

Lo mismo habría ocurrido de haber intentado obtener los compuestos reducidos 60 ó 61 (con hidrógeno orientado 5β) a partir del acetato de androstenolona 56.

Esta dificultad para obtener los esteroides A/B *cis* con hidroxilo 3β, a partir de aquéllos con doble ligadura 5(6) se evidencia en parte en el distinto precio que tienen estos productos en el comercio: compuestos como el 60 o el 61 tienen un precio cincuenta veces mayor que el compuesto 56.

Esto explica por qué se hizo la síntesis anterior (56 → 57 → 58 → 59) para ensayar y poner a punto las reacciones con un esteroide mucho más barato.

Además se consideró que la diferencia estructural y conformacional entre los dos compuestos de partida (56 y 60) (sistema plano de la doble ligadura en 56 versus unión A/B *cis* en 60) no presentaría mayores influencias sobre las reacciones en el anillo D o en la cadena lateral.

a) Acetilación del alcohol en C-3 (60 → 61).

Se realizó en las condiciones habituales con anhídrido acético y piridina, para proteger al hidroxilo de las condiciones enérgicas de deshidratación posterior.

b) Obtención de la cianhidrina (61 → 62).

La reacción se llevó a cabo con una relación 2,5:1 de cianuro de sodio a esteroide en las condiciones ya ensayadas para obtener la cianhidrina 57.

Como el cianuro de sodio es poco soluble en el solvente de la reacción (etanol), ésta comienza en forma heterogénea. Esto que de por sí puede disminuir el rendimiento de la reacción, se ve agravado por el hecho de que el cianuro marcado necesario para la síntesis radiactiva posterior, se provee dentro de una ampolla de vidrio, como una delgada película de sólido adherida a las paredes de la ampolla. Para agregar el cianuro marcado al balón de reacción, se debe entonces cortar la ampolla, luego romperla en pequeños pedazos y agregar estos trozos de vidrio al balón. Esto dificulta la agitación y por ende puede disminuir el rendimiento aún más.

Para hacer los ensayos lo más similares posibles a aquél en que se debía usar el cianuro marcado, tanto en la obtención de la cianhidrina 57 como en la de la cianhidrina 62, se agregaron al balón unos cuantos trozos de vidrio semejantes a los que resultarían cuando se usara el cianuro radiactivo.

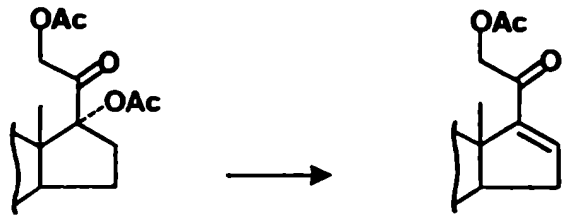
c) Deshidratación de la cianhidrina (62 → 63) (62 → 62a).

Al igual que en la síntesis anterior, se trató de lograr una reacción de deshidratación más suave, con mayor rendimiento y más segura (teniendo en cuenta además, que el calentamiento en tubo cerrado implica un riesgo grande, cuando se trabaja con productos costosos).

Se ensayó calentar a reflujo con anhídrido acético o con anhídrido acético más ácido clorhídrico (c) y en ambos casos se obtuvo sólo el producto diacetilado en C-3 y C-17 (62a). Con ácido *p*-toluensulfónico en lugar de ácido clorhídrico, se obtuvo una mezcla de varios productos.

El diacetato 62a se calentó a 160°C en alto vacío, para tratar de eliminar ácido acético, pero sublimó sin variación.

También se intentó un método utilizado en la eliminación de ácido acético de la cadena lateral de corticoides[57]



que consiste en el calentamiento del esteroide con acetato de potasio en N,N-dimetilformamida, pero los resultados fueron negativos.

Otro reactivo usado fue el tribromuro de fósforo sobre el compuesto 62,

pero se obtuvieron varios productos, ninguno de los cuales era el deseado.

En consecuencia se volvió a realizar la deshidratación con oxicloruro de fósforo en piridina en tubo cerrado, pero variando la temperatura, el tiempo de calentamiento y la cantidad de reactivo.

Se encontró que las mejores condiciones eran 150°C y 30 minutos con pequeña cantidad de oxicloruro de fósforo y aunque el producto se oscurecía mucho, luego de purificación por cromatografía, el rendimiento en el producto buscado 63 aumentó (60%) con respecto al método utilizado para obtener al compuesto 58 (50%).

d) Obtención de la metilcetona (63 → 64).

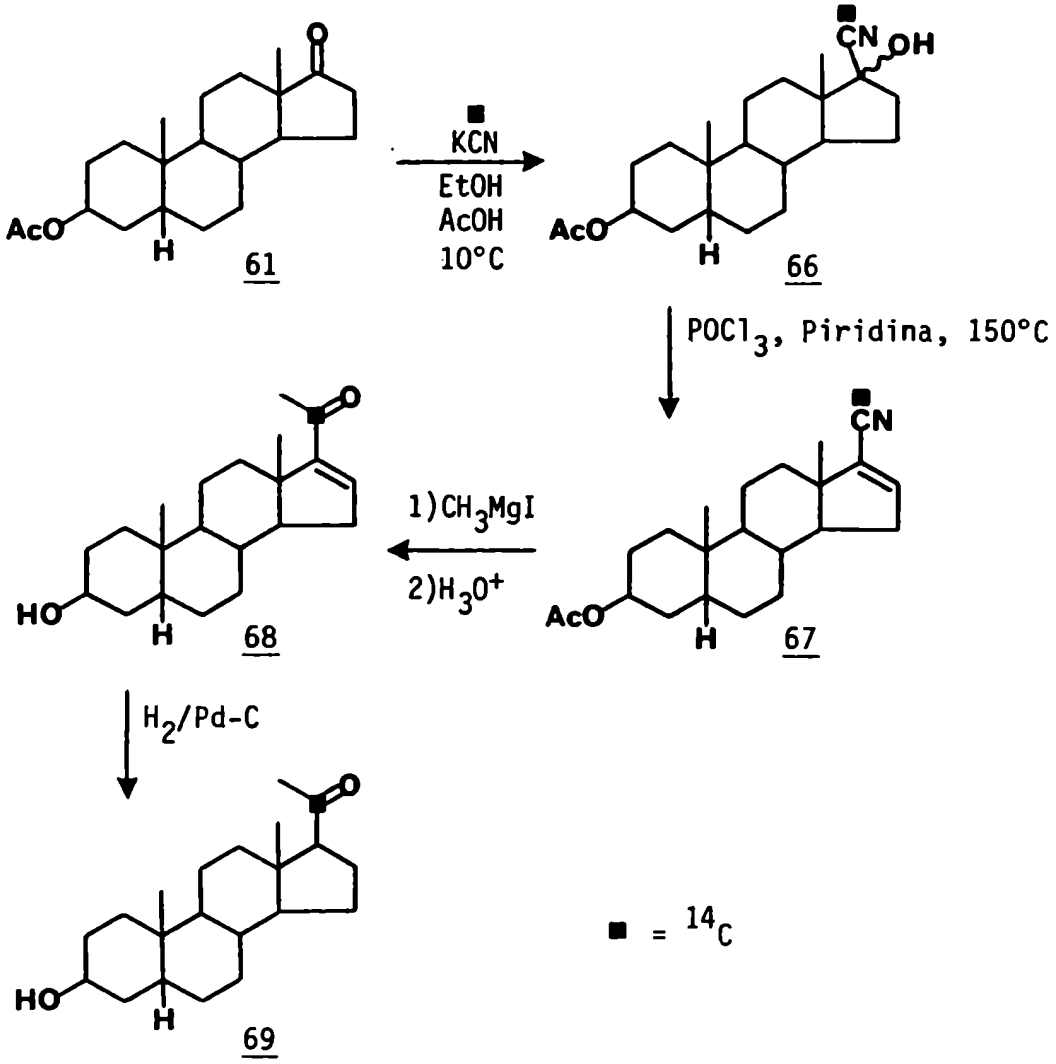
La reacción de Grignard efectuada sobre el nitrilo 63 dio buen rendimiento de producto 64 (80%) tanto con bromuro como con ioduro de metilmagnesio.

e) Reducción del doble enlace 16(17) de la metilcetona conjugada (64 → 65).

La hidrogenación catalítica del producto 64 debería ocurrir preferencialmente por la cara α del esteroide debido a la interferencia estérica que produce el metilo angular en C-18. Es así que el producto debería tener la cadena en C-17 orientada β, como los pregnanos naturales.

La reacción de hidrogenación con paladio sobre carbón condujo efectivamente a un solo compuesto, la 3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona (65).

A.3) SINTESIS DE |20-^{14}C| 3β-HIDROXI-5β-PREGNAN-20-ONA (69).



Nuevamente, el esquema fue el mismo, sólo que se utilizó cianuro de potasio radiactivo en lugar de cianuro de sodio, por disponer en ese momento de la sal potásica. Además, en el paso 67 ⟶ 68 se utilizó ioduro de metil-magnesio en lugar del correspondiente bromuro, por mayor simplicidad en el

manejo (el bromuro de metilo es un vapor a temperatura ambiente, mientras que el ioduro de metilo es un líquido).

De todas maneras, se ensayaron previamente ambas reformas para comprobar que no se variaban los rendimientos.

Conviene indicar que Butenandt y Schmidt-Tomé[54] habían informado que la reacción de Grignard no era satisfactoria cuando usaban ioduro de metilmagnesio, pero las pruebas realizadas en este trabajo establecieron que podían utilizarse ambos reactivos sin modificaciones en el rendimiento.

En la primera reacción, considerando la relación 2,5:1 de cianuro a esteroide, se utilizaron 100 mg de cianuro de potasio para 200 mg de compuesto 61. Esto implicó una gran dilución de la actividad específica del cianuro radiactivo (1,06 mg de act. esp. 61,1 mCi/mmol) puesto que al reactivo marcado se le agregaron 99 mg de cianuro de potasio no marcado. Esto se hizo necesario para poder trabajar con una masa adecuada de esteroide y lograr el producto final (69) suficientemente puro.

La mezcla de cianhidrinas epiméricas 66 con actividad específica 0,65 mCi/mmol se trató en la forma ya mencionada en la síntesis anterior, con oxicloruro de fósforo en piridina a 150°C durante 30 minutos y el producto aislado (67) luego de purificación por cromatografía tenía una actividad específica de 0,66 mCi/mmol. Este compuesto por reacción con ioduro de metilmagnesio produjo la metilcetona 68 con actividad específica 0,66 mCi/mmol, que

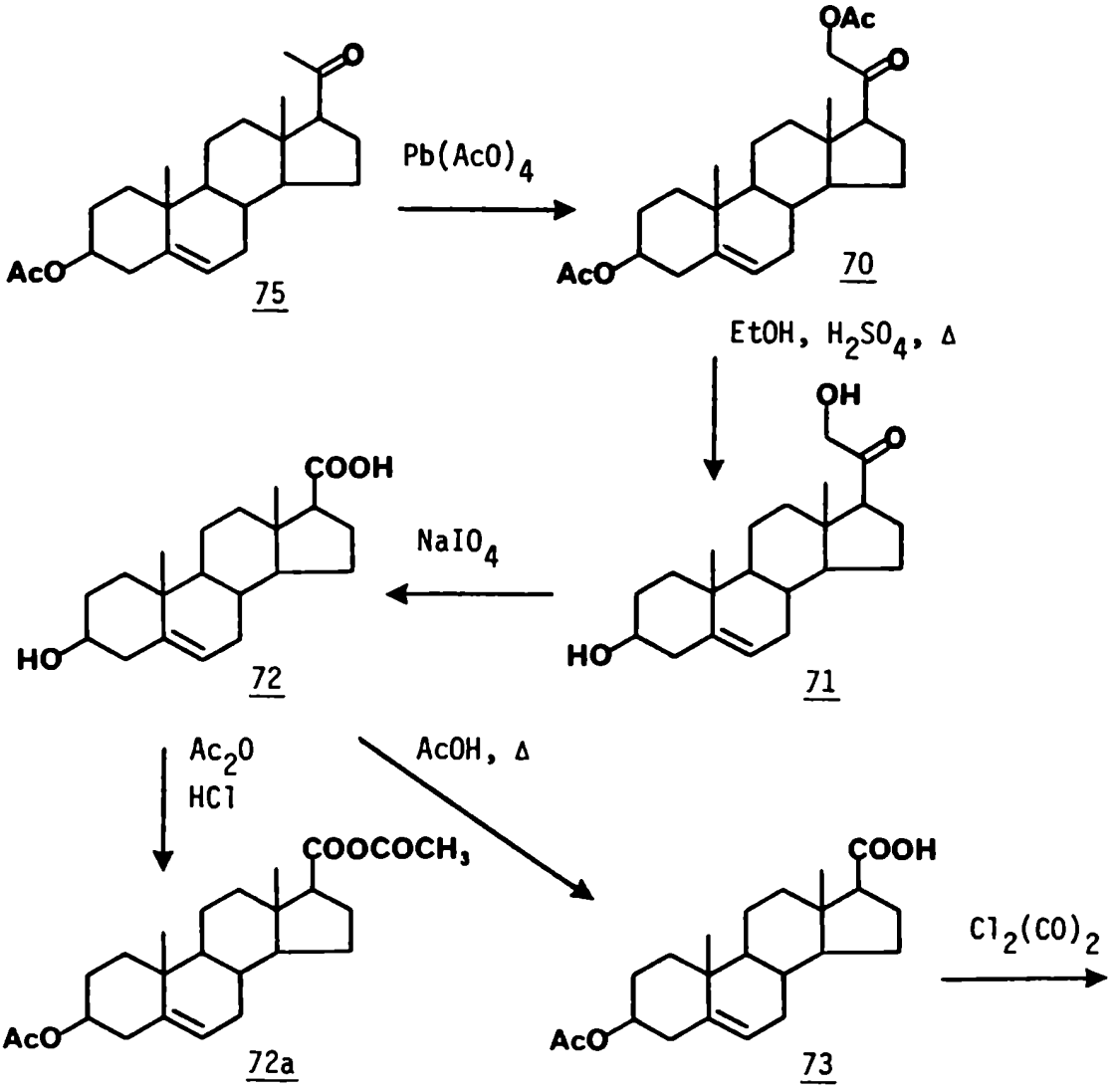
por hidrogenación catalítica condujo al producto buscado 69 con actividad específica 0,65 mCi/mmol.

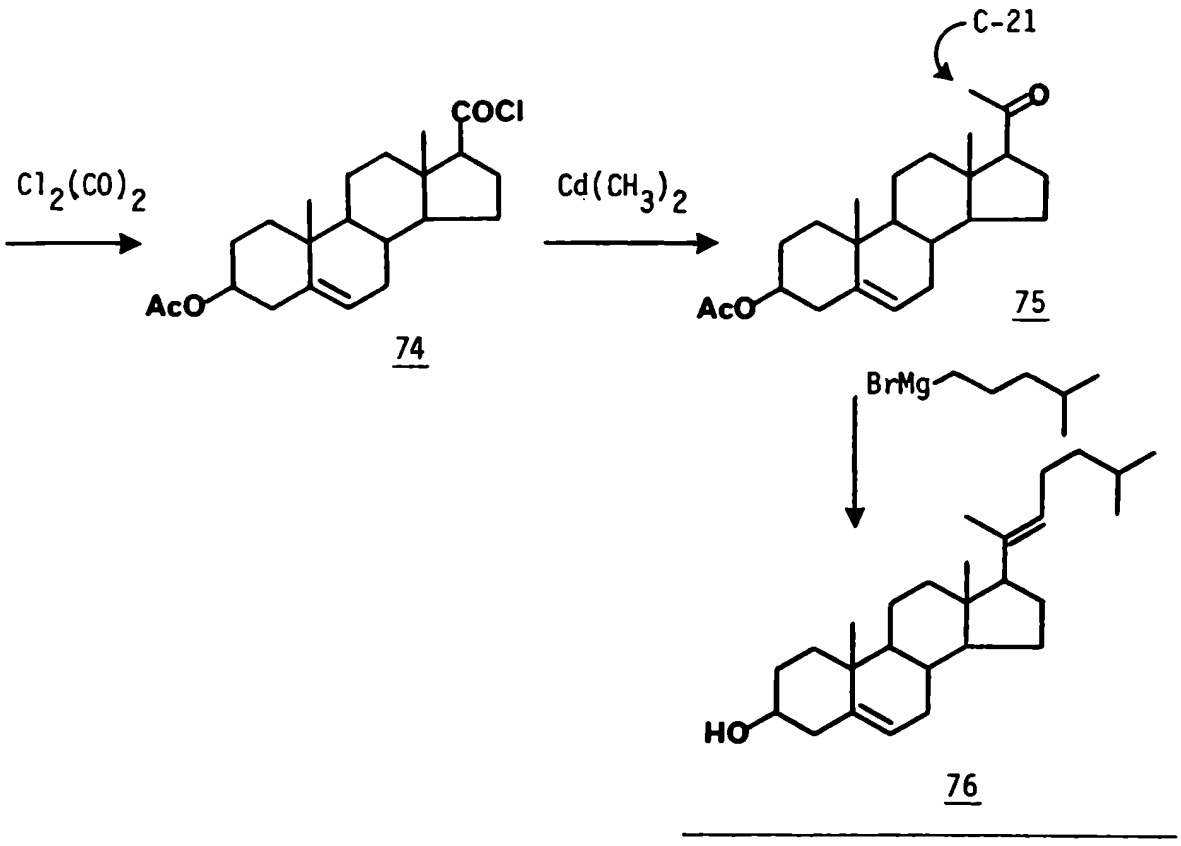
Por todo lo expuesto anteriormente, el paso limitante en el rendimiento radioquímico fue el primero, pero el de menor rendimiento químico fue la reacción de Grignard (70% aproximadamente) y el rendimiento químico total resultó 58%.

A partir de 1 mCi de cianuro marcado utilizado se obtuvo un rendimiento radioquímico estimado en 23%. Con referencia a este dato hay que tener en cuenta que ya en el primer paso se debía obtener un máximo estadístico de 40%, y se recalca esto porque no puede saberse si el cianuro marcado, que había quedado adherido a los trozos de vidrio de la ampolla, reaccionó con la misma velocidad que el no marcado.

A.4) SINTESIS DE COLESTA-5,20(22)E-DIEN-3β-OL (76).

La síntesis que se esquematiza a continuación, fue diseñada para introducir marcación isotópica en el C-21 de un esteroide con esqueleto tipo pregnano y poder continuar a partir de éste a otro con estructura de colestano.





Como ocurrió con la síntesis de la 3β-hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (59), la presente secuencia de reacciones sirvió para ensayar las mejores condiciones, con el objeto de sintetizar el mismo tipo de compuestos pero saturados con hidrógeno 5β en lugar de la doble ligadura Δ^5.

Básicamente el esquema consiste en degradar la cadena de un pregnano a un ácido etiánico con la concomitante eliminación del metilo C-21, volver a sintetizar el pregnano de partida mediante la introducción del grupo originalmente eliminado (con la idea de que este carbono portara una marcación isotópica) y luego elongar la cadena lateral a un colestano.

a) Reacción de acetoxilación en C-21 (75 → 70).

Se siguió una técnica empleada en la acetoxilación en C-21 de 20-ceto-pregnanos[58] con tetraacetato de plomo en benceno y metanol en presencia de trifluoruro de boro.

La reacción resultó más eficiente cuando el hidroxilo en C-3 estaba protegido como acetato, por eso se utilizó acetato de pregnenolona (75) como reactivo de partida.

b) Reacción de desacetilación (70 → 71).

Una vez funcionalizado el C-21 se procedió a desacetilar mediante una transesterificación con etanol en medio ácido. Esta reacción es equivalente a una hidrólisis ácida (para la parte alcohólica del éster) y se la prefirió antes que una saponificación para evitar un medio alcalino capaz de producir isomerización en C-17 (a través de la enolización del grupo carbonilo de C-20).[59]

c) Preparación del ácido etiánico (71 → 72).

La ruptura del cetol proveniente de la reacción de desacetilación se realizó con periodato de sodio en metanol-agua, según una técnica ya descripta para otro esteroide[41].

d) Acetilación del alcohol en C-3 (72 → 73) (72 → 72a).

Esta reacción, de apariencia muy sencilla (simple tratamiento con anhídrido acético en piridina), se complicó debido a que el anhídrido acético

reaccionaba formando, además del esperado acetato en C-3, un anhídrido mixto con el ácido carboxílico en C-17 (72a). Además, este anhídrido resistió las condiciones de hidrólisis suave con piridina acuosa a 90°C[60] sin modificarse.

Cuando se utilizaron relaciones variables anhídrido acético: piridina, pero siempre menores que en la reacción previa, se observó una mezcla de productos y en algunos casos también material de partida.

El mismo resultado insatisfactorio se obtuvo con mezclas de anhídrido acético, piridina y ácido acético.

Finalmente, el método más efectivo fue un calentamiento a reflujo con ácido acético durante 72 hs, que condujo al producto buscado 73 sin formación del subproducto 72a.

e) Preparación del cloruro de ácido (73 → 74).

Al igual que otros haluros de ácidos, el cloruro de oxalilo[61] reacciona con ácidos carboxílicos para producir los correspondientes cloruros de ácidos.

En este caso, se suspendió el ácido etiánico 73 en benceno y se agregó cloruro de oxalilo, obteniéndose fácilmente el producto 74 que se utilizó sin purificación para el próximo paso.

f) Obtención de la metilcetona a partir del cloruro de ácido (74 → 75).

Indudablemente, éste era el paso clave de la síntesis, fundamentalmente porque se trataba de aquél en el cual se procedería a la introducción

de la marca isotópica en C-21.

El compuesto 75 (acetato de pregnenolona) ya se había sintetizado marcado en el C-21 con ^{14}C, utilizando $|^{14}C|$ dimetilcadmio, con el dato importante de haber utilizado cantidades equimoleculares de $|^{14}C|$ ioduro de metilo y de cloruro del ácido etiánico correspondiente[62].

El inconveniente en utilizar dicha técnica era la masa de reactivos involucrada: aproximadamente 5 mmoles de cada reactivo.

En la síntesis que se deseaba realizar las cantidades a utilizar eran diez veces menores, dado que en los estudios biosintéticos siempre es deseable usar productos con elevada actividad específica.

Por esta circunstancia, en principio se dejó de lado el método con dimetilcadmio y se buscaron otros procedimientos para llevar a cabo la reacción en condiciones más adecuadas.

Para la obtención de cetonas a partir de ácidos es conocida la reacción del ácido o su sal de litio con compuestos alquil líticos[63]. De proceder por este método, se consumiría metil litio en exceso debido a su reacción con el grupo acetato en C-3. En todo caso se podía diseñar la síntesis en forma diferente, protegiendo el hidroxilo en C-3 como derivado tetrahidropiranílico o usando otro protector no atacable por el organolítico, pero igualmente eso no garantizaba el éxito de la reacción en condiciones 1:1 de ácido a metil litio.

También son conocidas las reacciones de haluros de ácido con compuestos organometálicos de magnesio, cinc y cadmio[64] conducentes a cetonas.

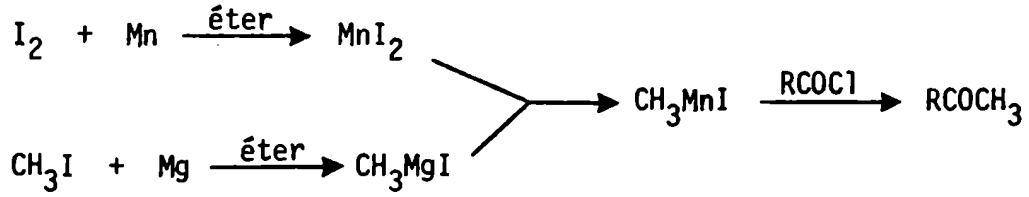
En publicaciones más recientes, Cahiez y colaboradores[65,66] mostraron la utilidad de reactivos organomanganesianos en la síntesis de cetonas a partir de haluros de ácidos, e inclusive lo aplicaron al campo de los esteroides[67].

Según estos autores, la reacción de los ioduros de alquilmanganeso con cloruros de ácidos carboxílicos no conjugados conduce a las correspondientes cetonas con buenos rendimientos, en general mejores que las reacciones basadas en otros metales como cadmio, cinc, aluminio o mercurio. Estos rendimientos son comparables a aquéllos obtenidos con reactivos organocúpricos, con las ventajas siguientes para los organomanganesianos: *a*) la relación 1:1 de monoalquilmanganesiano (RMnI) a sustrato produce aproximadamente el mismo resultado que el derivado dialquilcúprico (R_2CuLi) cuando éste está en una relación entre 3:1 y 6:1 con el sustrato y *b*) el reactivo ioduro de alquilmanganeso es estable a temperatura ambiente. Además, en comparación con los compuestos alquil líticos o magnésicos, los ioduros de alquilmanganeso son más selectivos y la molécula de sustrato puede tener grupos formoxi, acetoxi o carbonílicos sin ser atacados por el reactivo.

Con estos antecedentes, se procedió a ensayar la reacción con los compuestos de manganeso, ya que según todos los datos el cloruro de ácido 74

tendría que reaccionar mol a mol con el ioduro de metilmanganeso.

Primero se sintetizó ioduro manganoso, por reacción de iodo con manganeso en éter anhidro[68]



Por reacción del ioduro manganoso con un equivalente de compuesto de Grignard (reacción de intercambio de metal) en éter anhidro a baja temperatura (-20°C) se obtuvo una suspensión amarilla de ioduro de metilmanganeso.

A esta suspensión se le agregó una solución bencénica del cloruro de ácido 74.

El resultado de la reacción no fue el esperado, ya que se obtuvo muy baja conversión en el compuesto 75. Se repitió varias veces aumentando los tiempos de reacción, sin observar variaciones apreciables.

Dados estos fallidos intentos, se decidió apelar a la mencionada reacción con dimetilcadmio pero introduciendo las modificaciones más apropiadas para obtener un producto con la mayor actividad específica posible.

La actividad específica del $|^{14}C|$ ioduro de metilo comercial estaba fijada, de modo que se debía tratar de diluirlo lo menos posible, o sea emplear la cantidad equivalente del cloruro de ácido a la masa de ioduro de metilo marcado. Dicho compuesto radiactivo tenía una actividad específica de 58 mCi/mmol y una actividad total de 1 mCi, de donde se dedujo que tenía una

masa de 2,45 mg (0,017 mmoles) o un volumen de 1,07 µl. Es decir que, para no diluir el ioduro de metilo debía utilizarse 0,017 mmoles de cloruro de ácido 74 (6,4 mg). Con tan poca masa de esteroide en una reacción complicada resultaría difícil de trabajar, ya que por ejemplo vestigios de humedad pueden hacer variar enormemente el rendimiento de la reacción o impedirla totalmente. Además, había que continuar luego con otras reacciones sobre el producto obtenido.

De modo que se tomó una solución intermedia: intentar la reacción con 0,5 mmoles de cada reactivo. Para ello fue necesario adaptar el diseño experimental al recipiente específico en el que se proveía comercialmente el ioduro de metilo radiactivo. El detalle de esta operación se presenta en la parte experimental (pág. 166).

De esta manera se sintetizó el ioduro de metilmagnesio a partir de 0,5 mmoles (aproximadamente 33 µl) de ioduro de metilo anhidro con un exceso de magnesio en éter anhidro, luego se le agregó cloruro de cadmio anhidro en exceso para formar el dimetilcadmio y a esta suspensión se le adicionó el cloruro de ácido 74 (0,5 mmoles) en benceno. Se obtuvo el producto 75 con un rendimiento de 40% luego de purificación cromatográfica.

g) Elongación de la cadena lateral del pregnano (75 → 76).

Hay varios métodos posibles para obtener una cadena lateral de colestano a partir de un derivado tipo pregnano[69], entre ellos una reacción de

Grignard sobre el carbonilo en C-20 o una reacción de Wittig sobre el mismo carbonilo.

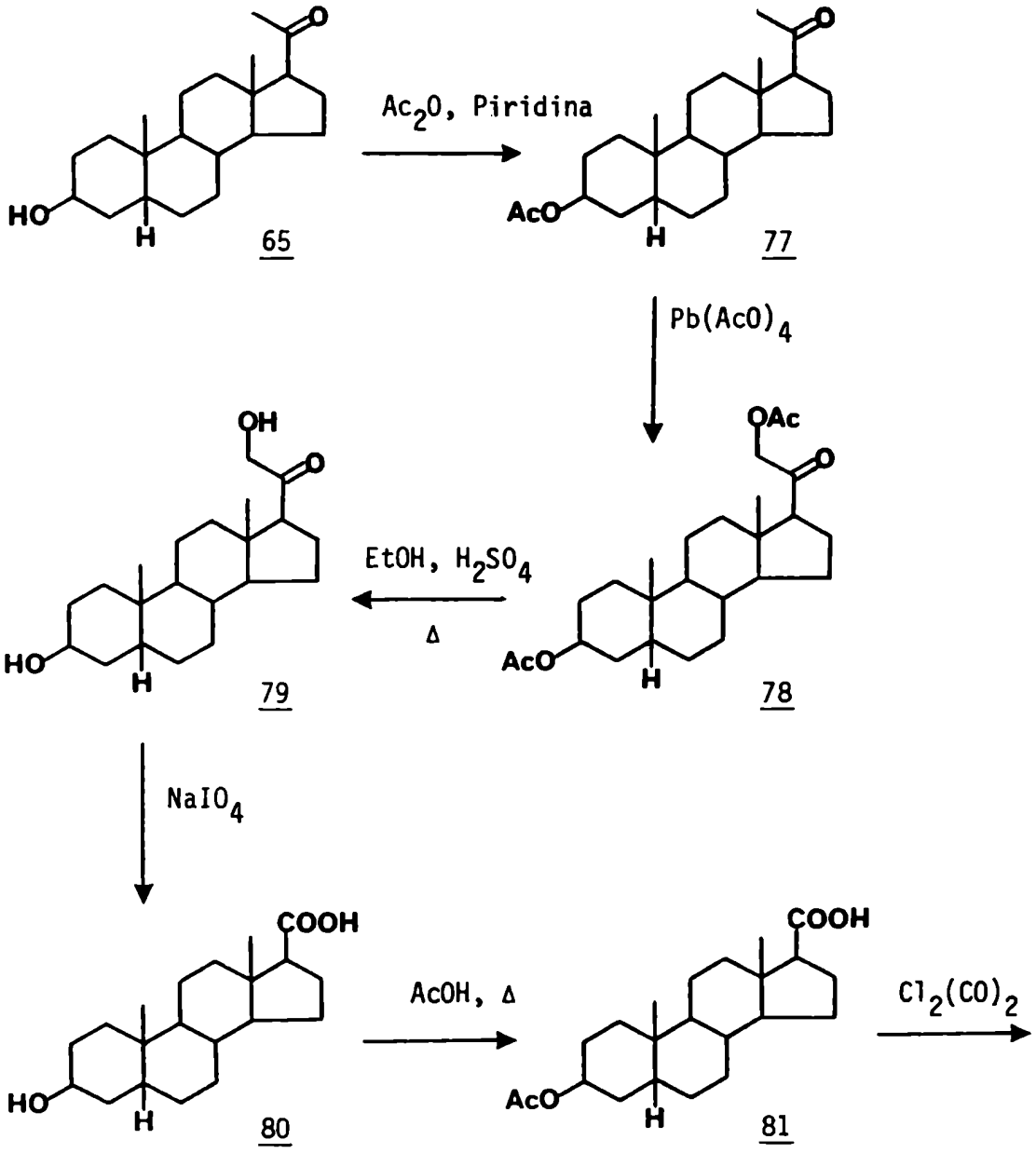
En este caso se siguió el primer camino en forma similar al método empleado por Porto y Gros[28].

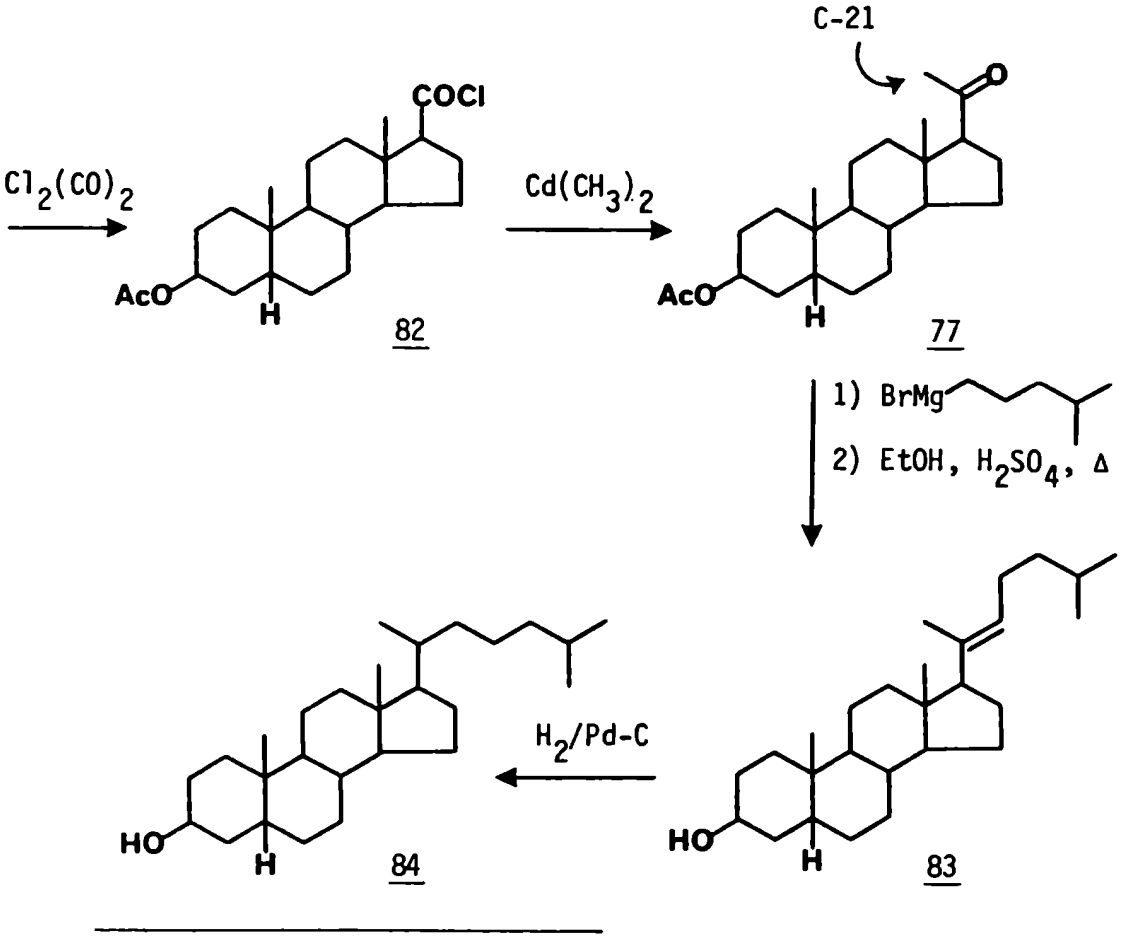
Se sintetizó el bromuro de isohexilo a partir de isohexanol[70], luego se preparó el bromuro de isohexilmagnesio por el método habitual y a esta solución etérea en exceso se le inyectó una solución bencénica de acetato de pregnenolona (75).

Se obtuvo una mezcla de productos y por separación cromatográfica se aisló el producto deshidratado en C-20, cuyo espectro de RMN-^{13}C indicó que era fundamentalmente insaturado en 20(22) con estereoquímica E.

A.5) SINTESIS DE 5β-COLESTAN-3β-OL (84).

Se desarrolló de manera similar a la síntesis previa (pág.53).





A partir del 20-ceto-pregnano (65) era necesario sintetizar el cloruro de ácido 82 para utilizarlo luego en la obtención de los productos marcados isotópicamente en C-21. Los compuestos 77, 83 y 84 que se obtendrían a partir de dicho cloruro de ácido, servirían de último ensayo para asegurar las condiciones para la síntesis radiactiva.

En realidad, para los estudios biosintéticos luego desarrollados, se podía utilizar también un compuesto marcado en el C-20 en lugar del C-21. Por

ello, a partir de la |20-^{14}C| 3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona (69) se habría podido continuar al coprostanol (84) marcado en C-20. Este método presentaba el inconveniente de tener que trabajar con compuestos radiactivos desde el primer paso, desde |^{14}C| cianuro de potasio, con la consiguiente disminución del rendimiento radioquímico.

En cambio, en la síntesis diseñada, la introducción de la marcación isotópica se realizaría en los últimos pasos. Además, la marcación en C-21, facilitaría la tarea degradativa de un posible bufadienólido radiactivo si el producto inoculado (marcado en C-21) resultara precursor de los bufadienólidos de origen animal.

Otra manera de obtener la marcación isotópica en C-21, habría sido mediante la misma reacción de Grignard realizada sobre el nitrilo conjugado (ver pág. 45) pero utilizando ioduro de metilmagnesio radiactivo. En dicha reacción (63 → 64) o con el esteroide ya marcado en C-20 (67 → 68, pág. 50) se usaba un gran exceso de haluro de metilo (más de 100 a 1 con respecto al esteroide) lográndose rendimientos satisfactorios. Pero si la marcación isotópica debía provenir del haluro de metilo, no se podía usar tal exceso pues la dilución conduciría a productos no útiles para estudios biosintéticos.

Se ensayaron relaciones de reactivos de hasta 10 a 1 de ioduro de metilo a nitrilo esteroidal sin obtener buenos resultados, por lo que se descartó la idea y se diseñó la síntesis con el cloruro de ácido.

a) Protección del hidroxilo en C-3 (65 → 77).

Se realizó por acetilación en las condiciones habituales con anhídrido acético y piridina.

b) Acetoxilación en C-21 (77 → 78).

Se funcionalizó la metilcetona por acetoxilación en el metilo, con tetraacetato de plomo, con la misma técnica empleada para obtener el compuesto 70 en la síntesis previa.

c) Preparación del α-cetol por hidrólisis (78 → 79).

Nuevamente se realizó la reacción de transesterificación con etanol en medio ácido, que condujo al α-cetol 79 (ver pág. 53).

d) Ruptura del α-cetol con formación del ácido etiánico correspondiente (79 → 80).

De la misma manera que en la síntesis precedente, la reacción del cetol con periodato de sodio produjo la pérdida del C-21, dando lugar a la formación del ácido 80.

e) Protección del hidroxilo en C-3 del ácido etiánico (80 → 81).

Como ocurrió en la síntesis anterior, se acetiló el hidroxilo en C-3 tratando el compuesto 80 con ácido acético a reflujo, para permitir la subsiguiente preparación del cloruro de ácido.

f) Preparación del cloruro de ácido (81 → 82).

Se siguió la misma técnica empleada anteriormente utilizando cloruro

de oxalilo. El producto aislado, sin purificación previa se utilizó para el próximo paso.

g) Reacción del cloruro de ácido con dimetilcadmio (82 → 77).

Manteniendo la relación 1:1 de ioduro de metilo a cloruro de ácido, se preparó primero el ioduro de metilmagnesio, luego el dimetilcadmio por agregado al reactivo de Grignard de cloruro de cadmio y finalmente la metilcetona 77 en un rendimiento aproximado de 40% luego de purificar el producto por cromatografía.

En la formación del ioduro de metilmagnesio, se ensayó agregar a todo el magnesio en éter sólo una parte del ioduro de metilo; luego de iniciada la reacción y consumido parte del magnesio se congeló el medio de reacción utilizando aire líquido, luego se inyectó el resto de ioduro de metilo, se dejó llegar a temperatura ambiente y se verificó que la reacción continuaba sin inconvenientes. Esta variante se realizó como una medida de seguridad para cuando la reacción se llevara a cabo con ioduro de metilo radiactivo: si la reacción de formación del ioduro de metilmagnesio no se iniciara correctamente, entonces no se abriría la ampolla conteniendo el ioduro de metilo marcado y podía repetirse la técnica sin malgastar el compuesto radiactivo ni el cloruro de ácido esteroidal. Esto se hizo así porque la experiencia mostró que la reacción total a menudo fallaba y que el paso más delicado consistía en la formación del reactivo de Grignard en pequeña cantidad.

La fundamentación del congelamiento intermedio que se realizaba, estriba en que cuando se realizara la reacción con el haluro de metilo marcado, habría que transvasar éste de la ampolla, en la cual se lo provee, al tubo de reacción y este transvase se realizaría por diferencia de presión de vapor entre ambas partes, ya que el tubo estaría a aproximadamente -180°C y la ampolla se calentaría con una microllama.

h) Elongación de la cadena lateral (77 → 83).

Como en la síntesis precedente la reacción de la metilcetona 77 con bromuro de isohexilmagnesio en exceso, produjo una mezcla de productos siendo los más importantes dos de ellos (los menos polares según ccd). Se separaron por cromatografía. El más polar de los dos se convirtió en el otro cuando se lo sometió a un calentamiento con etanol en medio ácido y el producto final formado resultó ser el compuesto buscado 83 fundamentalmente con estereoquímica E en el doble enlace de la cadena lateral según se estableció por RMN-^{13}C. Es decir, que el medio ácido a reflujo había deshidratado el alcohol terciario formado en C-20 como consecuencia de la reacción de Grignard.

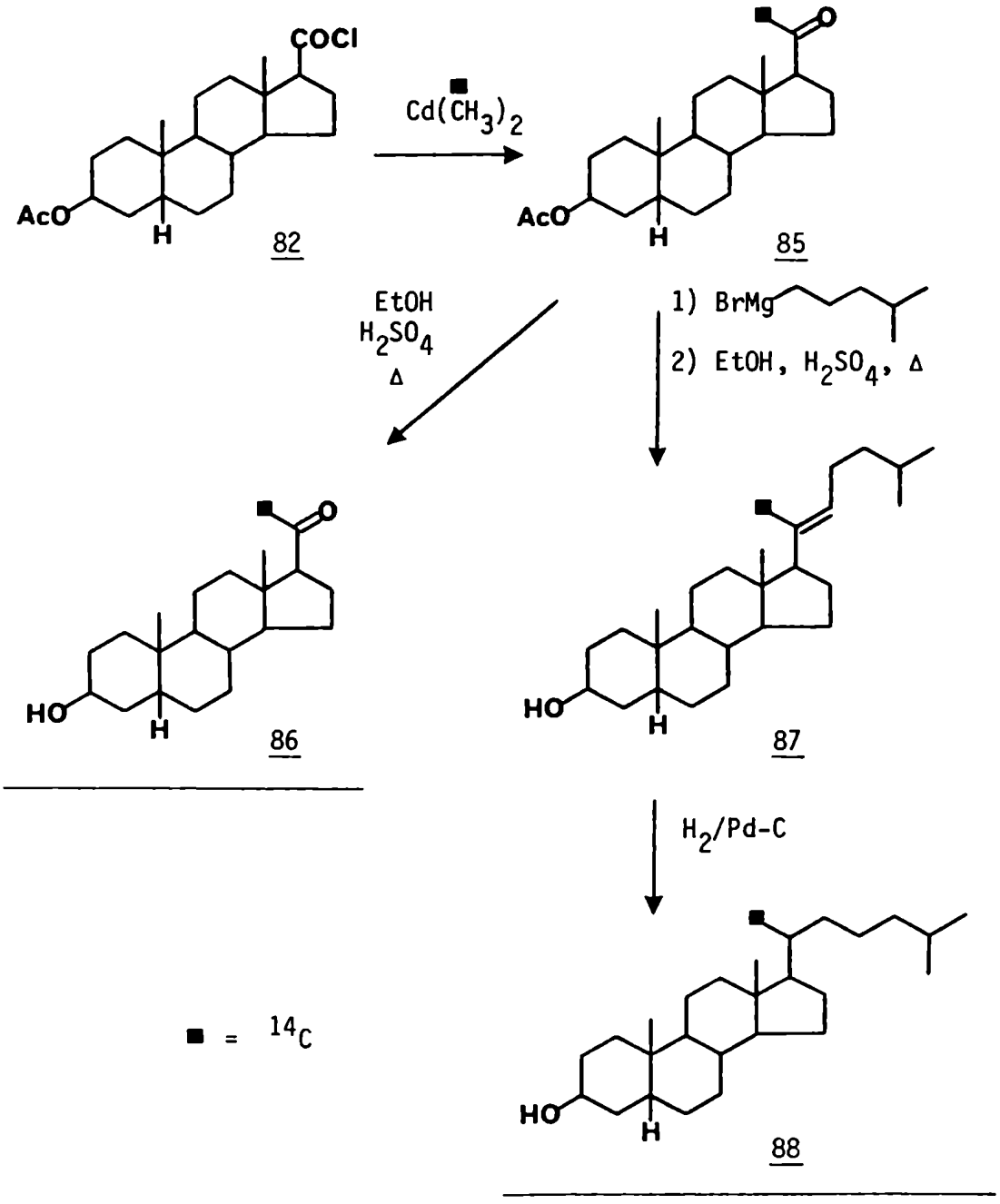
Esto implicaba una mejora considerable respecto a otro método utilizado anteriormente[28] en el cual el alcohol secundario en C-3 se protegía por acetilación, se deshidrataba el alcohol terciario en C-20 dando una doble ligadura 20(22) en condiciones enérgicas con oxicloruro de fósforo en piridina y luego se hidrolizaba para liberar el hidroxilo en C-3.

i) Hidrogenación catalítica de la doble ligadura (83 → 84).

La hidrogenación con paladio sobre carbón, condujo cuantitativamente a la mezcla epimérica en C-20 (20-R y 20-S) que no se intentó separar.

A.6) SINTESIS DE |21-^{14}C| 3β-HIDROXI-5β-PREGNAN-20-ONA (86) Y DE |21-^{14}C| 5β-COLESTAN-3β-OL (88).

Como ya se explicó en la síntesis anterior, se partió del cloruro de ácido 82.



a) Obtención de la metilcetona (82 → 85).

Utilizando la técnica del dimetilcadmio radiactivo, con las precauciones mencionadas en la precedente síntesis (no radiactiva) y en la parte experimental, se obtuvo el compuesto buscado 85 con un rendimiento aproximado de 40% y una actividad específica de 1,42 mCi/mmol.

b) Hidrólisis del acetato en C-3 (85 → 86).

Nuevamente por una reacción de transesterificación con etanol o una etanólisis se obtuvo uno de los productos finales necesarios para los estudios biosintéticos, el compuesto 86, con una actividad específica de 1,46 mCi/mmol.

La preparación de este producto 86, marcado con ^{14}C en el C-21, se puede comparar con la síntesis del mismo esteroide marcado con el mismo isótopo radiactivo en C-20 (69).

En ambos casos se partió de 1 mCi de precursor con actividades específicas muy similares (act. esp. del ^{14}CNK = 61 mCi/mmol; act. esp. del $^{14}CH_3I$ = 58 mCi/mmol) pero los productos obtenidos difieren mucho en actividad específica: el que estaba marcado en C-20 (69) tenía una actividad específica de 0,65 mCi/mmol mientras que el compuesto 86, marcado en C-21, tuvo más del doble de esa cantidad, según se mencionó arriba.

c) Elongación de la cadena lateral (85 → 87).

Tal como se realizó en la síntesis con compuestos no radiactivos, se

llevó a cabo una reacción de Grignard con bromuro de isohexilmagnesio, pero a diferencia de la síntesis anterior, el producto crudo de reacción se calentó con etanol-ácido sulfúrico para deshidratar el componente de la mezcla que mantenía una función alcohólica terciaria en C-20.

El producto insaturado 87 obtenido luego de purificación por cromatografía, tenía una actividad específica de 1,47 mCi/mmol.

d) Obtención del coprostanol radiactivo (87 → 88).

Por hidrogenación catalítica de la doble ligadura se obtuvo una mezcla de epímeros en C-20, que no se separó, con una actividad específica de 1,43 mCi/mmol.

B) ESTUDIOS BIOSINTETICOS

B.1) INOCULACION DE TRAZADORES RADIACTIVOS A ANIMALES INTACTOS

Las investigaciones se llevaron a cabo con sapos *Bufo paracnemis* o con sapos *Bufo arenarum*, según el tipo de experiencia que se intentaba realizar.

Los animales fueron mantenidos durante los períodos de las experiencias (hasta cuatro meses) con una alimentación forzada cada dos semanas y con suficiente agua.

En todos los casos en que se utilizaron animales intactos, éstos fueron inyectados subcutáneamente en la región inguinal que es una zona de mucha irrigación sanguínea.

Las inoculaciones se realizaron durante los meses de primavera a verano, en los cuales los sapos están metabólicamente activos.

A diferentes lapsos desde la inoculación de los trazadores, se obtuvo el veneno de cada sapo vaciando las glándulas parotoides y las tibiales (estas últimas presentes solamente en el caso de los sapos *Bufo paracnemis*) por presión manual de las mismas y recogiendo la secreción sobre una placa de vidrio. El veneno así extraído se dejó secar al aire durante un día, extendido sobre la placa de vidrio adquiriendo una consistencia "vidriosa". Se

raspó de dicha placa el veneno seco, se molió cuidadosamente (contiene componentes que producen reacciones alérgicas por inhalación del polvillo) con arena en un mortero y el total se extrajo en un extractor semicontinuo de tipo Soxhlet con solventes apropiados.

En cada caso se midió la actividad específica del veneno seco y del extracto obtenido por solventes.

En los casos en que el extracto resultó radiactivo, se realizó una cromatografía (en columna o en placa preparativa) para separar la fracción de esteroles y los principales bufadienólidos.

En las oportunidades en que la fracción esteroidal contenía radiactividad, por lo general cuando en la experiencia se había utilizado un conocido precursor de colesterol (caso del ácido mevalónico), se sacrificó uno de los animales para medir la radiactividad del colesterol que se extraía del hígado y vesícula biliar.

De la manera indicada se inocularon los siguientes trazadores radiactivos:

a) Acido |2-^{14}C| mevalónico (22)

b) |20-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (69)

c) |1,2-^{3}H| Colesterol (2)

d) |21-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (86)

e) |21-^{14}C| 5β-Colestan-3β-ol (88)

Los dos primeros compuestos radiactivos se inyectaron en sapos *Bufo paracnemis*, mientras que los tres últimos se inyectaron en sapos *Bufo arenarum*. En cada caso, los ensayos realizados con una misma especie de sapo, se efectuaron separadamente pero en forma paralela.

Como ya se indicó (ver pág. 17), el colesterol es un precursor de bufadienólidos, de manera que la inoculación de colesterol tritiado se efectuó como un control de incorporación para los demás trazadores radiactivos.

Los resultados de estas experiencias se presentan en el siguiente capítulo.

En el caso del veneno proveniente de sapos *Bufo paracnemis* que habían sido inoculados con ácido $|2\text{-}^{14}C|$ mevalónico y luego de la separación cromatográfica de la fracción de esteroles y de la de bufadienólidos, se procedió a la separación individual de los componentes de la fracción denominada "γ-sitosterol". Como ya se indicó, ésta es una mezcla de colesterol (2), campesterol (3), estigmasterol (4) y sitosterol (5). Esta fracción, que en ccd de adsorción o en cromatografía en columna se presenta como homogénea, se puede resolver en sus componentes por cromatografía gaseosa analítica o por cromatografía líquida de alta presión.

En un primer intento, la fracción "γ-sitosterol", que era radiactiva, se trató de separar en sus componentes por cromatografía gaseosa preparativa,

no lográndose obtener con los medios a nuestro alcance, componentes individuales sin contaminación. Se decidió cambiar de técnica y utilizar cromatografía líquida de alta presión. Mediante esta técnica se lograron separar los esteroles componentes del "γ-sitosterol". Dichos esteroles se analizaron por cromatografía gaseosa para verificar la ausencia de mezclas y luego se determinaron sus respectivas actividades específicas.

B.2) ENSAYOS CON CORTES DE TEJIDO Y CON HOMOGENEIZADOS DE GLANDULAS PAROTOIDES DE SAPOS *BUFO ARENARUM*.

Consideraciones preliminares

Cortes de tejido animal para ensayos biológicos

El uso de cortes de tejido en rebanadas lo introdujo Otto Warburg[71] en 1923 como un método para estudiar, por técnicas simples *in vitro*, el metabolismo de tejidos no extremadamente dañados mecánicamente y que fueran aún capaces de tener actividad metabólica similar a aquélla que tendrían *in vivo*.

El método consiste en la preparación de rebanadas lo suficientemente delgadas para permitir que el oxígeno del medio exterior llegue a las capas más internas de las tajadas por difusión, pero no tanto como para que la proporción de células rotas por los cortes sea elevada.

Estos cortes de tejido se suspenden en un medio adecuado en un recipiente conteniendo una mezcla gaseosa apropiada y se incuban con agitación, usualmente a 38°C (aunque para tejidos de anfibios la temperatura recomendada es de 25°C[72]).

Warburg calculó el espesor máximo permisible de los cortes, usando una constante de difusión para el oxígeno en el tejido obtenida por Krogh y asumiendo que la máxima velocidad de consumo de oxígeno por las células debería ocurrir a muy bajas concentraciones de dicho gas. Se observó que esto último

era verdad, tanto para organismos unicelulares como para partículas de tejido de mamíferos[73,74]. Para una velocidad de consumo de oxígeno de alrededor de 3 ml/g/h, el máximo espesor calculado es 0,5 mm aproximadamente, cuando la presión de oxígeno sobre el medio de incubación es 1 atm. El espesor límite calculado es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de respiración. Los estudios experimentales[75] han confirmado aproximadamente y con pequeñas diferencias los cálculos de Warburg.

Preparación de los cortes: El órgano o tejido particular debería extraerse inmediatamente después de matar el animal y comenzar en ese momento la preparación de los cortes. Si es inevitable un retraso, debe mantenerse al tejido frío, sobre hielo. Se han utilizado numerosos tipos de micrótomos para preparar cortes de espesor uniforme[76]. Como se señaló, los cortes no deben hacerse mucho más delgados que el espesor límite ya que eso aumentaría la proporción de células dañadas y la proporción de tejido sometido a alta tensión de oxígeno.

Medio de incubación: La solución a ser usada como medio de suspensión, depende del problema en estudio. Las velocidades de metabolización se afectan considerablemente por la constitución inorgánica y orgánica del medio. El más usado comúnmente consiste en una mezcla salina de presión osmótica y composición inorgánica similar a la del suero. El ion bicarbonato es el tercer ion más importante en cantidad en fluidos biológicos y se debe usar un

medio con pH regulado con bicarbonato si se requieren condiciones experimentales muy próximas a las fisiológicas. Con tal solución, la mezcla gaseosa externa a la solución, debe contener un 5% de CO_2 para asegurar un pH fisiológico. Para estudios aeróbicos con cortes de tejidos, si se usa bicarbonato se suele utilizar carbógeno como mezcla gaseosa (95% O_2 + 5% CO_2).

Limitaciones: La técnica de cortes delgados de tejido proporciona un resultado global del metabolismo en estudio, más que información acerca de reacciones simples y enzimas actuantes. A pesar de que esta técnica se usa principalmente para obtener datos metabólicos bajo condiciones simples pero "fisiológicas", es imposible hasta ahora obtener un ambiente completamente fisiológico que contenga todos los agentes humorales y otros intrínsecos. El corte de tejido no tiene circulación capilar y todos los intercambios entre el tejido y el medio de suspensión deben ocurrir por difusión a través de distancias de por lo menos la mitad del espesor de la lámina de corte. Para mantener una adecuada tensión de oxígeno en las capas más internas de una rebanada de tejido que respira activamente, las capas exteriores deben estar sometidas a una concentración de oxígeno anormalmente alta y de hecho, tóxica. Del mismo modo, para cualquier sustrato utilizado rápidamente por el tejido, la concentración en el medio de suspensión debe ser mayor que el probable nivel fisiológico. La concentración de un sustrato en el medio, no representa la concentración dentro de la rebanada de tejido; ésta variará con

el espesor del corte y la velocidad de consumo de dicho sustrato. La tensión de CO_2, la concentración de ion hidrógeno y las concentraciones de ácido láctico y otras sustancias producidas metabólicamente tienden a ser significativamente mayores dentro de la rebanada de tejido que en el medio que la rodea [71,77].

Homogeneizados de tejido animal

Actualmente, los homogeneizados de tejido son ampliamente utilizados para estudiar reacciones enzimáticas en materiales biológicos, o como material de partida para la preparación de los componentes particulados de células.

La definición de homogeneizado puede ser expresada desde dos puntos de vista, uno operacional y otro conceptual.

Potter y Elvehjem, en su artículo original[78] en 1936, usaron el término "suspensión de tejido" y recién en 1941 se empleó la palabra "homogeneizado"[79]. Desde entonces se usó este término en cientos de publicaciones con algunas variaciones en el sentido, pero usualmente en conexión con el uso de un dispositivo originalmente descripto o una modificación del mismo y así normalmente en un sentido operacional. Puesto que aún las operaciones que involucran los mismos instrumentos de producción pueden conducir a resultados muy variables, era deseable tener una definición conceptual.

Antes de 1947[80] la suspensión de tejido era considerada como una buena

definición de un homogeneizado. Se consideraba que debía obtenerse un mayor o menor número de células intactas, dependiendo más del medio de suspensión que de la técnica de molido, y se trató de evaluar el grado de ruptura celular por criterios enzimáticos[81].

Sin embargo, ya en 1941[79] había avanzado el concepto de una suspensión de partículas respiratorias probablemente idénticas a las mitocondrias y con el desarrollo de mejores técnicas para el aislamiento de mitocondrias de homogeneizados con sacarosa[82], se estableció la base para la presente definición conceptual de homogeneizado.

Así, desde 1947 se estableció que un homogeneizado significaba una preparación de tejido total en la que la ruptura celular es tan completa como sea posible, mientras que al mismo tiempo, la destrucción de núcleos, mitocondrias y otras partículas celulares se mantiene al mínimo que el conocimiento y la técnica actuales lo permiten.

Instrumental: El equipo básico para preparar homogeneizados consiste en un tubo de ensayos de paredes muy reforzadas en el que se coloca una mano o pilón también de vidrio (en general esmerilado) que encaja bien en el fondo del tubo, dejando sólo una muy pequeña luz entre ambas superficies; este pilón se hace girar eléctricamente, mientras el tubo con tejido y medio adecuado (enfriado exteriormente, pues la fricción puede calentar la suspensión y desnaturalizar proteínas) se mueve verticalmente hacia arriba y hacia

abajo, tratando de desmenuzar el tejido entre el pilón y la pared del tubo. Existen además muchas variantes y equipos pero funcionan esencialmente de igual manera.

Medios de incubación: La elección del medio de suspensión está siempre en evolución y depende del estudio en particular. Se han usado homogeneizados con agua en sistemas en los que se podían agregar los cofactores necesarios a la mezcla de reacción[83,84]. También se usaron medios isotónicos con cloruro de potasio o con sacarosa.

Usos: Los homogeneizados y las fracciones celulares aisladas representan un punto intermedio entre el animal vivo y la enzima individual aislada, lugar ocupado originalmente sólo por los cortes delgados de tejidos, y a pesar de que aún hay muchas reacciones que ocurren en esos cortes y fracasan en homogeneizados, la comprensión futura de estas reacciones debe depender de los resultados que se obtengan con homogeneizados. En general, los homogeneizados se usan para el estudio de sistemas enzimáticos múltiples involucrados en secuencias de reacciones metabólicas, con la intención de: *a*) ensayar el tejido con respecto a una enzima individual específica, o *b*) estudiar los factores regulatorios que determinan cuáles secuencias metabólicas ocurren cuando muchas alternativas son posibles[85], o cuáles reacciones son las que controlan la velocidad[86]. La tendencia actual es determinar cuáles reacciones metabólicas tienen lugar en los tejidos del animal entero, usando

técnicas con trazadores isotópicos, y luego estudiar cómo están controladas estas reacciones usando las técnicas de homogeneizados[87].

Consideraciones acerca de la necesidad de la aplicación de estas metodologías a la realización del presente trabajo.

Como se mencionó en el capítulo "Objetivos de la presente investigación" (pág. 38), era de interés aclarar el origen biosintético del colesterol glandular, ya que estaba demostrado[27] que éste era precursor de los bufadienólidos de sapos.

Normalmente existen dos fuentes posibles de colesterol glandular: la producción *de novo* y la entrada de colesterol desde el exterior de la glándula.

La importancia relativa de estas vías varía según el tejido de que se trate.

Cuando el aporte externo de colesterol está disminuido por algún motivo, se activa la síntesis *de novo*, normalmente inhibida por retroalimentación negativa del colesterol sobre la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), enzima que cataliza la conversión

HMG-CoA ⟶ mevalonato

y que es la reguladora de la vía

acetato ⇢ colesterol.

El aporte externo de colesterol está mediado por lipoproteínas que lo transportan por el torrente circulatorio, principalmente en forma de ésteres con ácidos grasos de cadena larga, para su captación por los diversos tejidos. En diversos tejidos esteroidogénicos estudiados, como por ejemplo adrenal, ovario, células de Leydig de ratas[88] existen receptores específicos en la membrana celular, a los cuales se unen estas lipoproteínas y mediante mecanismos no del todo aclarados permiten la introducción de los esteroides al tejido. La especificidad está dada por el receptor y por la parte proteica de la lipoproteína (apolipoproteína).

En el caso de las glándulas parotoides de sapos, si se observaba síntesis de colesterol *de novo*, significaba que se tenía localizado un sitio de biosíntesis total de bufadienólidos, ya que se sabía que estos se producían en dichas glándulas.

Si el aporte externo de colesterol a las células glandulares es el camino predominante, cualquier posible precursor de bufadienólidos anterior al colesterol (por ej. acetato o mevalonato) que se ensaye será metabolizado fundamentalmente en otros tejidos donde la biosíntesis *de novo* de colesterol sea importante. Habría dos consecuencias posibles: a) si el ensayo fuera realizado *in vivo* no aportaría nueva información con respecto a la incorporación de colesterol y sería menos eficiente; b) si el ensayo fuera *in vitro*,

los resultados de incorporación serían negativos o de muy bajo valor porque no ocurre la síntesis *de novo*.

Por lo tanto si la entrada de colesterol es la vía importante, habría que ensayar posibles precursores posteriores a colesterol en el camino biosintético a bufadienólidos.

Si en este último caso los ensayos fueran *in vivo*,un resultado negativo de incorporación podría deberse a una difícil llegada del precursor a la célula o a que el mismo no sea un verdadero precursor.

Por otro lado, si las experiencias fueran *in vitro*, un resultado negativo podría indicar nuevamente que no se trata de un verdadero precursor o que el tiempo de incubación (limitado en los ensayos *in vitro*) no fue suficiente.

En cualquier caso un resultado netamente positivo indicaría la presencia de un precursor, sin descartar la posibilidad de que intervenga en una vía metabólica alternativa a la predominante en condiciones fisiológicas normales.

Es decir que la inoculación en un organismo vivo de un posible precursor de bufadienólidos, puede conducir a resultados nulos de incorporación aunque se trate de un verdadero intermediario en el sitio de biosíntesis.

Para poder determinar si el colesterol utilizado por las glándulas

venenosas para biosintetizar bufadienólidos, era sintetizado *de novo* por dichas glándulas o provenía de algún otro órgano (por ejemplo el hígado) a través de la circulación sanguínea, se hizo necesario separar las glándulas y ensayar la biosíntesis de colesterol, establecer la presencia de receptores de lipoproteínas y confirmar su capacidad de "internalizar" o sea, permitir la captación del colesterol.

Este proceso, también llamado endocitosis mediada por receptores, es la vía conocida para la introducción de la LDL (lipoproteína de baja densidad) en la célula y la forma más habitual en que la misma se provee de colesterol para la formación de membranas (todas las células) o para la síntesis de otros productos. Como ejemplos de estos últimos casos pueden citarse: síntesis de ácidos biliares en células de hígado, síntesis de cortisol en glándula adrenal, síntesis de estradiol en ovario o, el proceso en estudio, síntesis de bufadienólidos en glándulas parotoides de sapos.

Los ensayos mencionados se realizaron *in vitro*, con cortes de tejido o con membranas aisladas de células a partir de homogeneizados de glándulas parotoides.

a) Experiencia de inoculación de $|1\text{-}^{14}C|$ acetato de sodio y $|5\text{-}^{3}H|$ mevalonolactona a cortes de tejido de glándula parotoide.

Se llevó a cabo esta experiencia con sapos *Bufo arenarum*, con dos ani-

males separadamente para obtener resultados duplicados.

Como era necesaria la extracción de las glándulas parotoides, se sacrificaron ambos sapos, se obtuvieron las glándulas como se indica en la parte experimental y también se utilizó el tejido hepático. Como se deseaba verificar la formación de colesterol, se utilizó como control dicho tejido hepático, en las mismas condiciones experimentales que el tejido de glándula parotoide.

Se incubaron paralelamente cortes de tejido de glándula y de tejido de hígado en ensayos separados, durante 2 y 16 hs con el agregado conjunto de $|1\text{-}^{14}C|$ acetato de sodio y $|5\text{-}^{3}H|$ mevalonolactona a los medios de incubación. Finalizadas dichas incubaciones, se midió la actividad remanente en los medios de incubación, se retiraron los cortes de tejido y previo lavado de los mismos se procedió a saponificar los posibles ésteres de colesterol presentes dentro del tejido.

El lavado previo se realizó para tratar que las experiencias siguientes se llevaran a cabo principalmente con los productos que quedaran dentro del tejido y no simplemente adsorbidos en su superficie.

Luego de la saponificación, se extrajeron los esteroides y los residuos obtenidos luego de llevar a sequedad los extractos orgánicos se analizaron por métodos cromatográficos utilizando colesterol como testigo.

La detección de los productos radiactivos se llevó a cabo mediante radiocromatografía. Se procedió al eluido de los compuestos que quedaran retenidos en la zona de Rf igual al de colesterol y se midieron estos eluidos por centelleo líquido para obtener valores de incorporación de ^{3}H y de ^{14}C. En aquellos casos en que se observó radiactividad, se procedió a agregar colesterol no marcado, a fin de poder recristalizar hasta actividad específica constante. Una vez logrado el producto con actividad específica constante, se lo derivatizó por acetilación y se verificó si el derivado recristalizado tenía la misma actividad específica que el colesterol de partida.

Los resultados de las incubaciones y posterior tratamiento se indican en el capítulo "Resultados obtenidos" (pág. 111).

b) Aislamiento de lipoproteínas del suero sanguíneo.

Del conjunto de lipoproteínas séricas las más importantes en el transporte de colesterol son la LDL y la HDL, lipoproteínas de baja densidad y de alta densidad respectivamente[88].

De la sangre de sapos *Bufo arenarum* se obtuvo el plasma colectado en una solución 0,1% de EDTA.

Las lipoproteínas de sapos (t-LDL, d=1,019-1,063 g/ml y t-HDL, d=1,090-1,215 g/ml) se aislaron por flotación secuencial utilizando una ultracentrí-

fuga y ajustando la densidad de la solución por sucesivos agregados de bromuro de potasio sólido. Luego de lavar las lipoproteínas con soluciones de baja densidad y alta densidad seguido en cada caso de ultracentrifugación, ambas lipoproteínas se dializaron para eliminar el exceso de bromuro de potasio.

Las fracciones aisladas migraron como picos homogéneos por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Finalmente ambas fracciones se filtraron para eliminar partículas y agregados.

c) Marcación de las lipoproteínas con iodo (^{125}I).

Ambas lipoproteínas (t-LDL y t-HDL) se marcaron con ^{125}I utilizando el método de la lactoperoxidasa, enzima que cataliza la oxidación del ioduro con agua oxigenada y que permite la unión del iodo a la tirosina de la proteína[89].

Las lipoproteínas iodadas se separaron del ^{125}I libre por pasaje a través de una columna de poliacrilamida-agarosa equilibrada previamente con una solución salina conteniendo albúmina de suero bovino (para saturar posibles sitios de adsorción de lipoproteínas en la matriz, ya que las mismas se encuentran en muy baja concentración).

La actividad específica de las lipoproteínas marcadas se determinó midiendo la actividad total de ^{125}I incorporada (contador de radiación gamma) y dividiéndola por la masa de lipoproteína correspondiente (determinada antes de la marcación por el método de Lowry[90]).

d) Ensayo de unión de las lipoproteínas a los receptores en la membrana. Modelo de sitios idénticos e independientes en la unión de pequeñas moléculas a un polímero.

Supongamos que una molécula de un polímero P tiene un número de sitios idénticos e independientes para ligar una molécula A, más pequeña. Si los sitios son idénticos (esto es, cada uno tiene la misma afinidad por A) e independientes (la ocupación de un sitio no afecta la unión a otro sitio) se puede obtener una descripción simple de este sistema.

Consideremos por ejemplo que el polímero P tiene 3 sitios idénticos e independientes y representemos con un 0 si el sitio está vacío o con un 1 si está ocupado por el ligando A.

Si se permite que el polímero P reaccione con el ligando A y la unión es reversible de modo de poder llegar a un equilibrio, habrá ocho especies presentes: 000, 001, 010, 100, 011, 101, 110 y 111. Para cada uno de estos equilibrios podemos escribir, por ejemplo,

$$A + 000 \overset{K}{\rightleftharpoons} 001 \text{ (ó } 010 \text{ ó } 100\text{), de donde,}$$

$$K = \frac{|001|}{|A|\,|000|} \qquad K|A| = \frac{|001|}{|000|} = \frac{|010|}{|000|} = \frac{|100|}{|000|} = s$$

Esto es así porque consideramos sitios idénticos, o sea que la constante de equilibrio es la misma para las tres especies unidas a un solo ligando.

Análogamente,

$$A + 001 \overset{K}{\rightleftharpoons} 011 \text{ (ó } 101\text{)}$$

$$K|A| = \frac{|011|}{|001|} = \frac{|011|}{K|A|\,|000|} \qquad K^2|A|^2 = \frac{|011|}{|000|} = \frac{|101|}{|000|} = \frac{|110|}{|000|} = s^2$$

Esto se cumple si consideramos además sitios independientes, pues la entrada del primer ligando A no afecta la entrada del segundo y las constantes son idénticas.

De igual manera,

$$A + 011 \text{ (ó } 101 \text{ ó } 110\text{)} \overset{K}{\rightleftharpoons} 111$$

$$K|A| = \frac{|111|}{|011|} \qquad K^3|A|^3 = \frac{|111|}{|000|} = s^3$$

La concentración total del polímero (libre + ligado) es:

$$|P|_T = |000| + |001| + |010| + |100| + |011| + |101| + |110| + |111| =$$

$$= |000| + 3s|000| + 3s^2|000| + s^3|000| =$$

$$= |000| \; (1 + 3s + 3s^2 + s^3) = |P|_{libre} \, (1 + s)^3$$

La concentración de polímero unido a ligando es,

$$|P|_{unido} = |P|_T - |P|_{libre}$$

o sea la suma de las concentraciones de las siete especies con A unido.

Si la concentración de una estructura como la 011 se expresa en forma de ligando unido, entonces queda $2|011|$ pues hay dos moléculas de A por molécula de polímero. Por extensión, la concentración total de A unido es:

$$|A|_{unido} = |001| + |010| + |100| + 2|011| + 2|101| + 2|110| + 3|111| =$$

$$= 3s|000| + 6s^2|000| + 3s^3|000| =$$

$$= 3s|000| \; (1 + 2s + s^2) = 3s|000| \; (1 + s)^2 =$$

$$= |P|_{libre} \; 3s \; (1 + s)^2$$

El número promedio de moléculas de ligando A unidas por molécula de polímero P, ν, es igual a $|A|_{unido} \; / \; |P|_T$

$$\nu = \frac{|A|_u}{|P|_T} = \frac{|P|_{libre} \; 3s \; (1 + s)^2}{|P|_{libre} \; (1 + s)^3} = \frac{3s}{1 + s}$$

Se puede demostrar[91] que en general, si hay N sitios idénticos e independientes,

$$\nu = \frac{Ns}{1 + s} = \frac{NK|A|}{1 + K|A|} \qquad \text{de donde,}$$

$$\nu\,(1 + K|A|) = NK|A|$$

$$\nu = NK|A| - \nu K|A|$$

$$\frac{\nu}{|A|} = KN - K\nu = K\,(N - \nu)$$

Cuando N es grande, no es posible ni deseable determinar la concentración de las especies individuales. El parámetro ν se usa más frecuentemente para expresar la extensión de la unión.

Si este modelo se cumple, la representación gráfica de $\nu/|A|$ versus ν, resulta una línea recta. La pendiente de la misma es -K, en donde K es la constante de equilibrio de asociación para un sitio. También se puede expresar en términos de la constante de equilibrio de disociación $Kd = \frac{1}{K}$ por lo cual,

$$\frac{\nu}{|A|} = \frac{N}{Kd} - \frac{\nu}{Kd} = \frac{1}{Kd}\,(N - \nu)$$

Otra forma de expresión es la siguiente:

$$\text{como} \quad \nu = \frac{|A|_u}{|P|_T} = \frac{|A|}{Kd}\,(N - \nu)$$

$$\text{entonces,} \quad \frac{|A|_u}{|A|} = \frac{N|P|_T}{Kd} - \frac{\nu|P|_T}{Kd} = \frac{N|P|_T}{Kd} - \frac{|A|_u}{Kd}$$

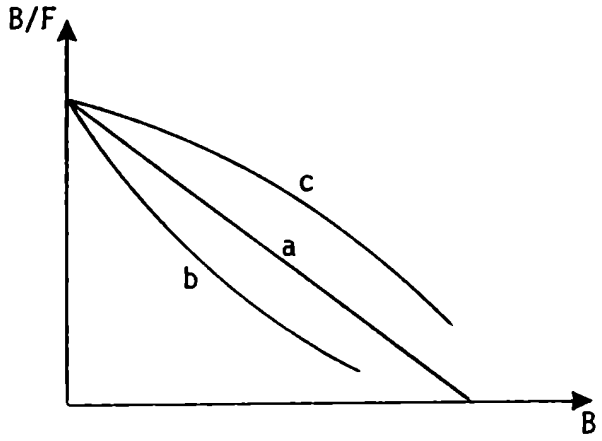
donde $N|P|_T = Q$ es el número total de sitios de unión por unidad de volumen de la solución (o por otra unidad relativa como mg de polímero, mg de proteína, etc.) y usando símbolos habituales en la literatura:

$$|A|_u = B \quad \text{("bound")}$$

$$|A| = F \quad \text{("free")}$$

se obtiene $$\boxed{\frac{B}{F} = \frac{Q}{Kd} - \frac{B}{Kd}}$$

Representando $B/F = f(B)$ se obtiene el gráfico de Scatchard[92], que en las condiciones establecidas daría una recta con pendiente $-1/Kd$ y ordenada al origen Q/Kd (a)



a: cumple el modelo

b: $\tau < 1$

c: $\tau > 1$

Figura 8: Gráfico de Scatchard.

Para que el gráfico sea una línea recta como la representada en a, deben cumplirse las condiciones siguientes:

- Que la reacción llegue al equilibrio (de otra manera no se pueden medir las concentraciones en el equilibrio).

- Que sean sitios idénticos. Si esto no es así aparecerán distintos valores de K y la ecuación no es una función lineal simplificada. Si por ejemplo hay dos sitios de unión con afinidad diferente por el ligando, se obtendrá una curva resultante de las dos rectas con distinta pendiente -1/Kd.

Para i sitios diferentes se puede demostrar que

$$\nu = \frac{B}{|P|_T} = \sum_i \frac{N_i K_i F}{1 + K_i F} \quad \text{que para el caso } i = 1$$

se transforma en la ecuación ya vista $\nu = \frac{NKF}{1 + KF}$ (recordando que $F = |A|$).

- Que los sitios de unión sean independientes. Si esto no se verifica, la concentración de, por ejemplo, la especie 011 será $\tau|000|s^2$ donde τ es el factor de corrección que tiene en cuenta la influencia del primer ligando unido, sobre la entrada del segundo. Si $\tau < 1$ se habla de cooperatividad negativa, es decir que el ligando unido disminuye la facilidad de la entrada de otro ligando respecto del valor ideal y se obtienen curvas como la b en la figura 8 . Si $\tau > 1$ hay cooperatividad positiva donde el ligando unido facilita la entrada del siguiente (curva c en la figura 8).

Aplicación del modelo a la unión de las lipoproteínas de sapo a los receptores en la membrana.

En la experiencia que nos ocupa el ligando era la lipoproteína, cuya fracción proteica se debería unir a receptores en la membrana celular.

Se utilizó una fracción de homogeneizado de glándula parotoide, obtenida por centrifugación a 27000 x g que consistía fundamentalmente de partículas de membrana celular. Dicho homogeneizado se hizo en un medio hipotónico con bicarbonato de sodio, que destruye las células y deja las membranas prácticamente intactas. Previo a la centrifugación a 27000 x g se centrifugó a 3000 x g para lograr la sedimentación de núcleos, agregados grandes y células intactas.

Se procedió de esta manera, utilizando solamente membrana, para evitar una posible "internalización" de las lipoproteínas al usar células enteras (si hay "internalización" se produce degradación de la lipoproteína y en consecuencia no se cumplen las condiciones de equilibrio de unión necesarias para el análisis; ver ecuación de Scatchard, pág. 93).

Se incubaron las lipoproteínas marcadas, con la preparación de membranas.

Para construir el gráfico de Scatchard, se debían obtener varios puntos, o sea incubaciones en que la concentración de lipoproteína unida (B en la fórmula) fuera diferente dentro de un rango adecuado. Para variar B se agregaron cantidades variables de lipoproteína sin marcar. O sea, en cada tubo de incubación se fijó la cantidad de proteína de membrana, la cantidad de

lipoproteína marcada (^{125}I-t-LDL o ^{125}I-t-HDL) y se fueron agregando a cada uno cantidades crecientes de lipoproteínas sin marcar; de este modo la cantidad de ligando unido (B) aumenta (por desplazamiento del equilibrio) hasta alcanzar la saturación de los sitios de unión. Como B tiene un límite (número total de sitios de unión) y F aumenta siempre con la masa de ligando agregada, el cociente B/F disminuye. Por este motivo se obtiene una pendiente negativa en el gráfico de Scatchard.

La concentración de ligando unido B, se puede expresar en forma de masa de ligando por unidad de volumen de solución de incubación o en forma molar, o más habitualmente en el caso de lipoproteínas, en forma de masa de ligando por unidad de masa de proteína de membrana (ya que se utiliza la misma masa de proteína de membrana en cada tubo y se obtiene así el número de sitios de unión relativo a la masa total de proteína de membrana).

Entonces la masa unida de cada lipoproteína para cada punto de equilibrio, se obtiene así:

$$m_{unida} = m_{total} \frac{\text{actividad unida}}{\text{actividad agregada}}$$

$$\text{donde} \quad m_{total} = m_{\substack{\text{lipoproteína} \\ \text{no marcada}}} + m_{\substack{\text{lipoproteína} \\ \text{marcada}}}$$

La actividad agregada se mide al comienzo (contador de radiación gamma) y la actividad unida se mide luego de la incubación, separando las lipopro-

teínas unidas a receptores de los ligandos libres (^{125}I-t-LDL o ^{125}I-t-HDL) por filtración a través de filtros Millipore de 0,45 μm; las lipoproteínas unidas a membrana quedan en el filtro que se mide en el contador "gamma".

La concentración de ligando libre (F) se determina así:

$$F = \frac{m_{total} - m_{unida}}{V_{incubación}}$$

Para que una estructura dada se pueda considerar un receptor debe poseer las siguientes características: especificidad, alta afinidad por el ligando, que la unión ligando-receptor sea reversible, que llegue a un valor de saturación y que la unión produzca una respuesta fisiológica medible.

Generalmente tienen además, baja capacidad, debido a que hay relativamente pocos sitios de unión por célula. Esto último se hace más evidente cuando se trata de un receptor cuyo ligando es un mensajero químico (por ejemplo neurotransmisores, hormonas, etc.).

Además de unirse al receptor, el ligando puede unirse no específicamente a otros sitios generalmente de baja afinidad y alta capacidad. Como éstos tienen alta capacidad, no se llegan a saturar aunque se le agregue al medio de incubación un exceso de ligando no marcado, mientras que los sitios de unión específica (de alta afinidad) se saturan rápidamente cuando aumenta la concentración de lipoproteína.

Por este motivo, el valor de unión inespecífica que es necesario descontar, se determina por el agregado de un exceso de ligando no marcado.

Debido a la disminución de la actividad específica del trazador, por exceso de ligando no marcado, la actividad de ^{125}I unida en estas condiciones corresponde estadísticamente a la unión de alta capacidad solamente, es decir, a la unión inespecífica.

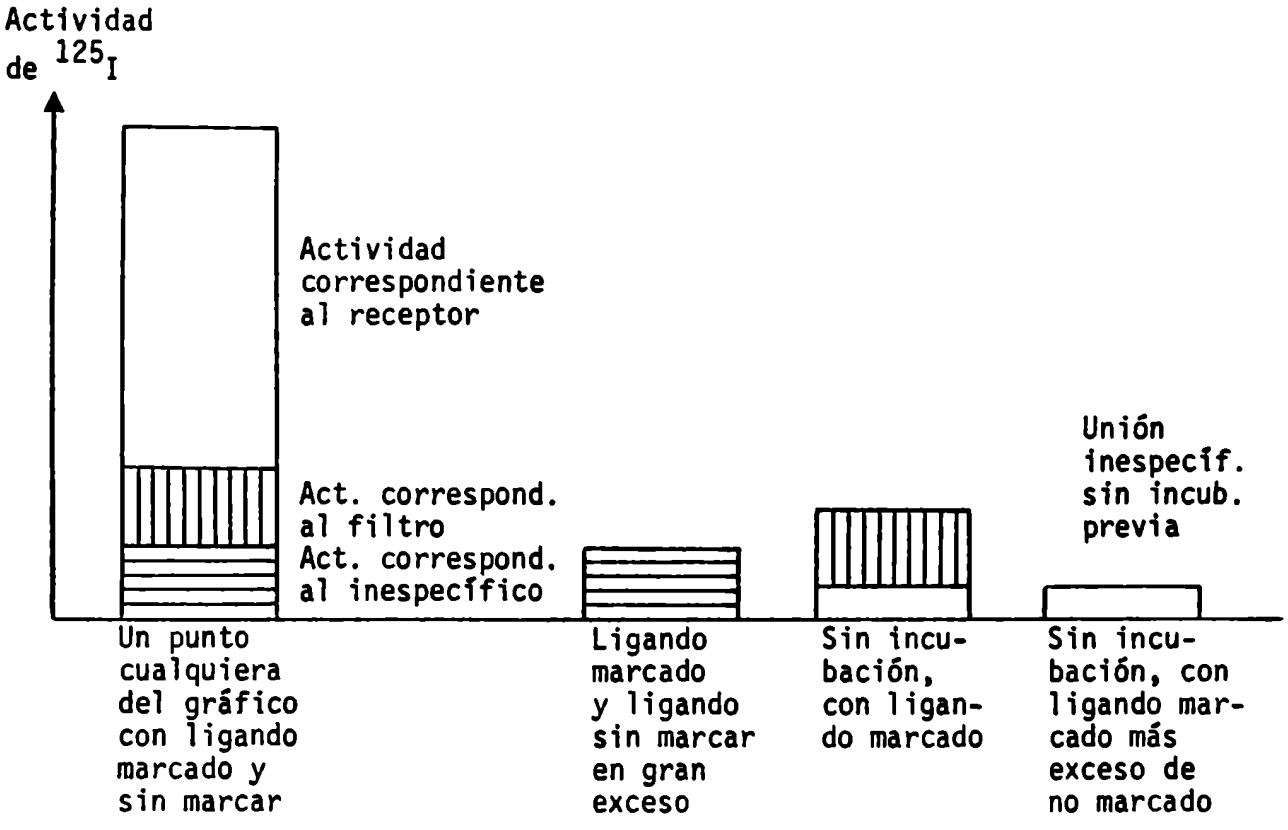
La actividad de ^{125}I unida para el ensayo con gran exceso de lipoproteína se resta de los valores de todos los otros puntos y también de la actividad total agregada, por considerar que el ligando unido inespecíficamente no está disponible para la unión con el receptor.

Otro valor a considerar es el control a tiempo cero. Este aparece debido al filtrado, ya que parte del ligando marcado queda unido al filtro, debido a los sitios de unión de baja afinidad del mismo.

El valor de corrección debido a la unión a tiempo cero, que se debe descontar como el de la unión no específica, se obtuvo de la siguiente manera: se filtraron las membranas con lipoproteína marcada (sin incubación previa) y se midió la radiactividad remanente en el filtro; se hizo lo mismo con el agregado de lipoproteína sin marcar en exceso, observándose una disminución de la actividad unida al filtro debido a la saturación de estos sitios; la diferencia, que resultó un valor pequeño, es el control a tiempo cero.

El cálculo completo se realiza entonces de la siguiente forma para cada

punto: $m_{unida} = m_{total} \left(\frac{\text{act. unida - act. unida con exc. de lig. no marcado - act. unida a tiempo cero}}{\text{act. agregada - act. unida con exceso de ligando no marcado}} \right)$



La actividad unida al filtro no se puede considerar dentro del valor de unión inespecífica porque es "desplazable" por ligando no marcado, a diferencia de la unión inespecífica que por no saturarse (alta capacidad) no disminuye por dilución del ligando marcado y tiene un valor constante luego de las incubaciones.

Los ensayos se hicieron por duplicado y los valores promedio para cada punto y cada lipoproteína se volcaron en gráficos de Scatchard (ver capítulo "Resultados obtenidos", pág. 116).

e) Marcación de las lipoproteínas con linoleato de |1,2,6,7-^{3}H| colesterol

El linoleato de |1,2,6,7-^{3}H| colesterol se unió a las lipoproteínas por el método de Faust *et. al.*[93] (ver capítulo "Experimental", pág. 196).

La larga cadena del linoleato facilita la unión con las lipoproteínas.

En realidad la LDL, por ejemplo, es un complejo grande con forma esférica (22 nm de diámetro) que contiene un centro con alrededor de 1500 moléculas de colesterol esterificadas con ácidos grasos de cadena larga . Dicho centro está rodeado por una doble capa lipídica que contiene dos copias de una proteína que es la responsable de la unión de la LDL a los receptores de la superficie celular.

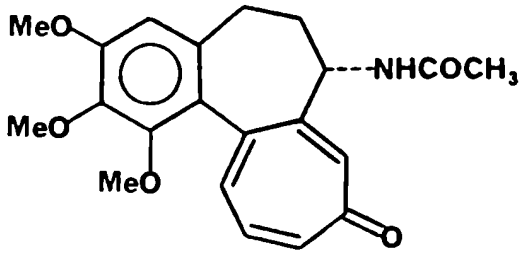
f) Incubación de cortes de tejido de glándula parotoide con las lipoproteínas marcadas con linoleato de colesterol tritiado.

Se incubaron cortes delgados de tejido glandular con las lipoproteínas marcadas con linoleato de colesterol tritiado en las condiciones utilizadas previamente para el ensayo con acetato y mevalonato (ver pág. 189).

Se realizaron los experimentos por triplicado con y sin el agregado de colchicina (89).

El alcaloide colchicina es un inhibidor de la "internalización", o sea

la endocitosis mediada por receptores[94] a la cual ya se hizo referencia.



89

CAPITULO 4

RESULTADOS OBTENIDOS

INOCULACION DE TRAZADORES RADIACTIVOS A ANIMALES INTACTOS

a) Acido |2-^{14}C| mevalónico (22).

Los resultados obtenidos muestran (ver Tabla 1) que el ácido mevalónico se incorpora en el veneno de sapos, pero solamente en la fracción "γ-sitosterol", al menos durante el tiempo que duró la experiencia.

Los valores de incorporación absoluta y de incorporación específica se calculan como se indica:

$$\text{Incorporación absoluta \%} = \frac{\text{actividad total en el producto aislado}}{\text{actividad total inoculada}} \times 100$$

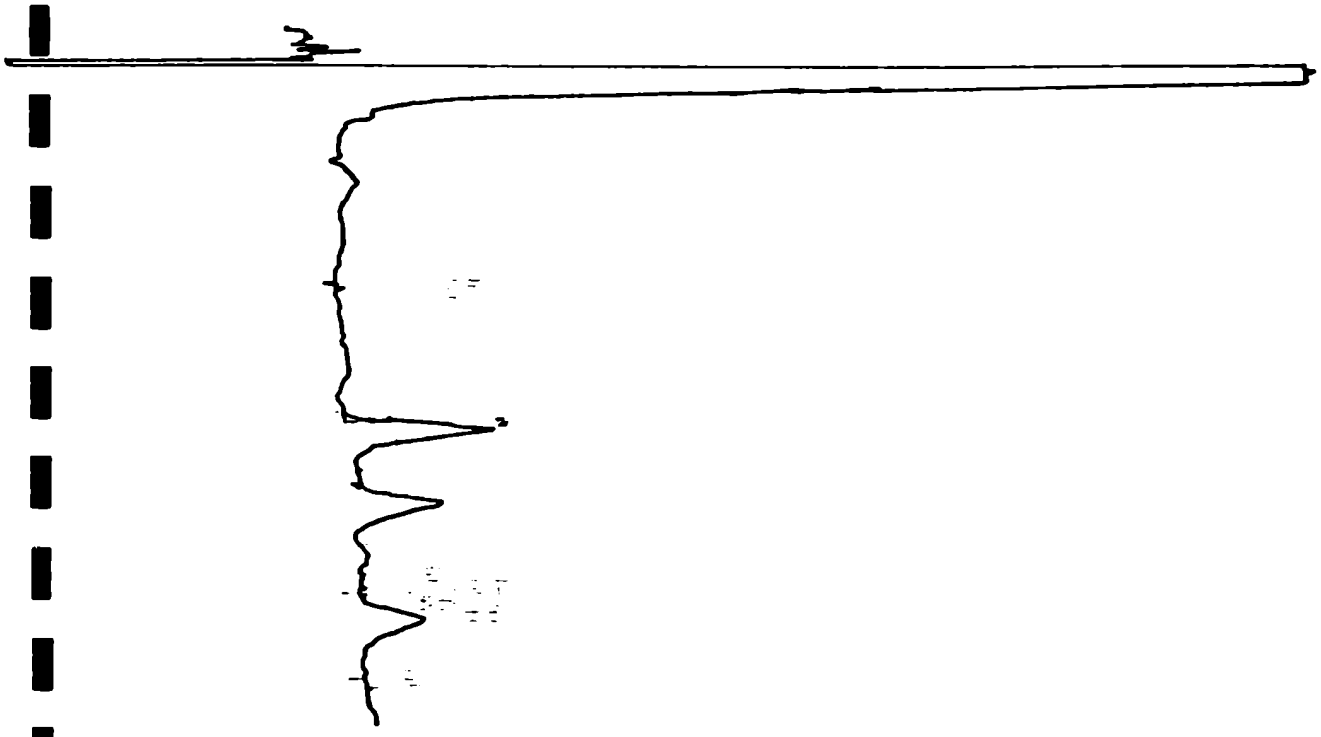
$$\text{Incorporación específica \%} = \frac{\text{act. esp. del producto aislado (dpm/mmol)}}{\text{act. esp. del trazador inoculado (dpm/mmol)}} \times 100$$

Cuando no se aísla un producto puro sino una mezcla (por ejemplo el veneno crudo) no puede determinarse el valor de actividad específica en dpm/mmol sino por unidad de masa (dpm/mg), por lo que no se puede calcular el valor de incorporación específica.

La separación de los esteroles componentes del producto llamado "γ-sitosterol", que como se dijo resultó infructuosa por cgl preparativa y se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (clar), permitió medir la actividad específica de cada esterol en la mezcla. Por cgl se comprobó que cada una de las bandas obtenidas por clar correspondía a un solo esterol.

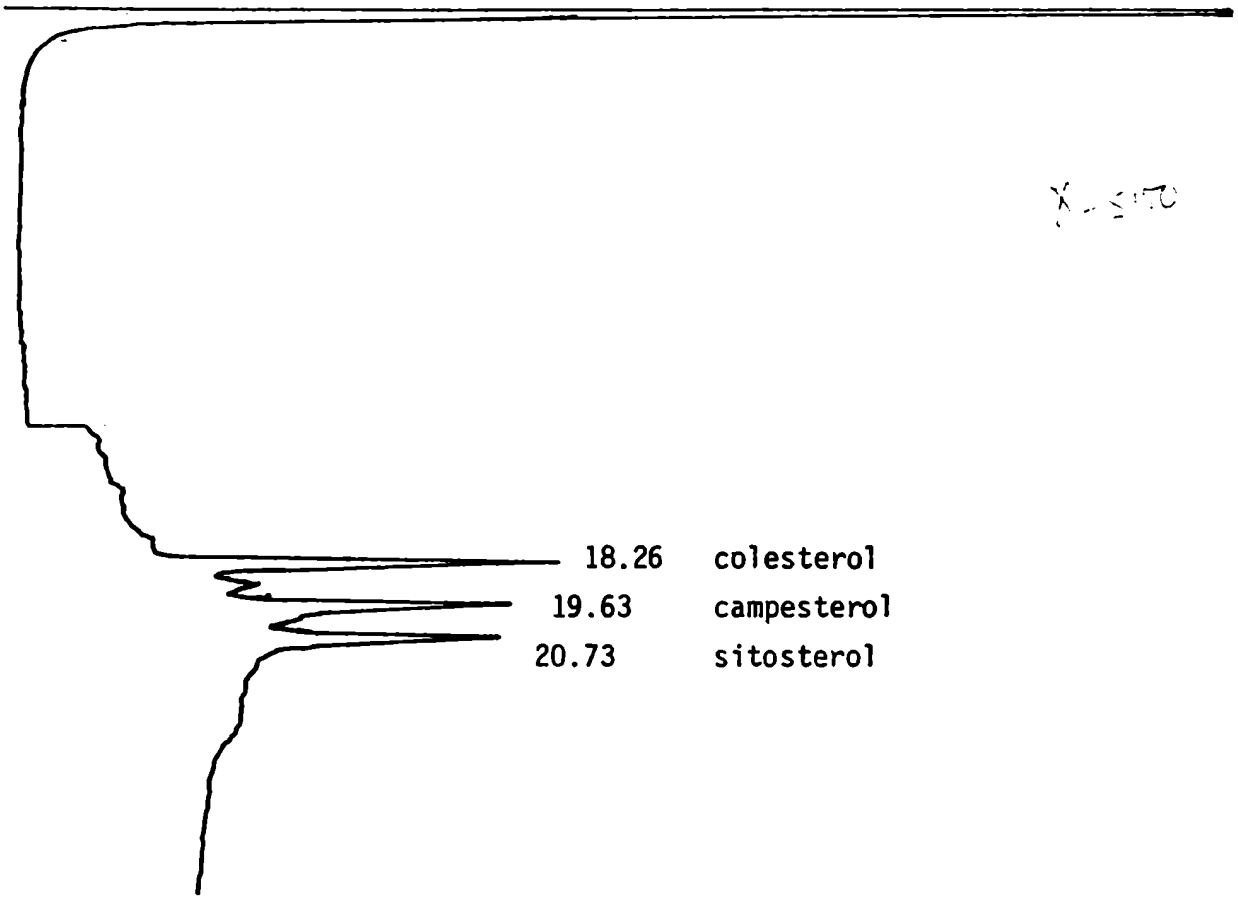
En el análisis por cgl analítico, el pico de estigmasterol (4) se observó superpuesto parcialmente con el de campesterol (3) y el de sitosterol (5), por lo que no fue integrado y en consecuencia no pudo determinarse su masa (ver Tabla 2).

A continuación se muestran cromatogramas típicos de clar y cgl para la mezcla "γ-sitosterol".



Cromatograma líquido de alta resolución (clar) del "γ-sitosterol" radiactivo (ver condiciones en "Parte experimental").

099



Cromatograma gaseoso (cgl) del "γ-sitosterol" radiactivo (ver condiciones en "Parte experimental").

Tabla 1. Inoculación de ácido [2-^{14}C] mevalónico a sapos *Bufo paracnemis*.

ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL TRAZADOR	ACTIVIDAD TOTAL INOCULADA	NUMERO DE ANIMALES	TIEMPO DE COLECCION DEL VENENO	VENENO CRUDO				EXTRACTO (Cl_3CH-MeOH)			
				MASA	ACT. TOTAL	ACT. ESP.	INCORP. ABSOL.	MASA	ACT. TOTAL	ACT. ESP.	INCORP. ABSOL.
dpm/mmol	dpm		días	mg	dpm	dpm/mg	%	mg	dpm	dpm/mg	%
$7,2\ 10^9$	$5,4\ 10^8$	10	14	9100	$1,1\ 10^5$	12	0,020	2490	$1,2\ 10^5$	48	0,022

"γ-SITOSTEROL"				BUFALINA	MARINO-BUFAGINA	TELOCINO-BUFAGINA	COLESTEROL DE HIGADO					
MASA	ACT. TOTAL	ACT. ESP.	INCORP. ABSOL.	ACT. ESP.	ACT. ESP.	ACT. ESP.	MASA	ACT. TOTAL	ACT. ESP.		INCORP. ABSOL.	INCORP. ESPEC.
mg	dpm	dpm/mg	%	dpm/mg	dpm/mg	dpm/mg	mg	dpm	dpm/mg	dpm/mmol	%	%
126	$1,2\ 10^5$	978	0,022	8	3	5	31	$2,2\ 10^6$	$7,1\ 10^4$	$2,7\ 10^7$	0,41	0,37

Tabla 2. Separación de los esteroles componentes del "γ-sitosterol" proveniente de la experiencia con ácido [2-^{14}C] mevalónico.

"γ- SITOSTEROL"		COLESTEROL (45%)*				CAMPESTEROL (29%)*			
MASA	ACTIVIDAD ESPECIFICA	ACTIVIDAD TOTAL	ACTIVIDAD ESPECIFICA		INCORPORACION ESPECIFICA	ACTIVIDAD TOTAL	ACTIVIDAD ESPECIFICA		INCORPORACION ESPECIFICA
mg	dpm/mg	dpm	dpm/mg	dpm/mmol	%	dpm	dpm/mg	dpm/mmol	%
1	978	542	1720	$6,7\ 10^5$	0,009	23	113	$4,5\ 10^4$	0,0006

ESTIGMASTEROL				SITOSTEROL (26%)*			
ACTIVIDAD TOTAL	ACTIVIDAD ESPECIFICA		INCORPORACION ESPECIFICA	ACTIVIDAD TOTAL	ACTIVIDAD ESPECIFICA		INCORPORACION ESPECIFICA
dpm	dpm/mg	dpm/mmol	%	dpm	dpm/mg	dpm/mmol	%
13	-	-	-	12	66	$2,7\ 10^4$	0,0004

* Determinado por cgl analítica.

b) |20-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (69).

Basado en experiencias anteriores[27] que indicaban que la biosíntesis de bufadienólidos en sapos era un proceso muy lento y que recién a partir de los 15-20 días comenzaba a notarse incorporación de un trazador (un precursor esteroidal como el colesterol) en el veneno total, éste se colectó a los 40 días de la inoculación.

Los resultados de incorporación se encuentran en la Tabla 3.

c) |1,2-^{3}H| Colesterol (2), d) |21-^{14}C| 3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona (86) y e) |21-^{14}C| 5β-colestan-3β-ol (88).

Como ya se mencionó anteriormente, el ensayo con colesterol tritiado se realizó como control, ya que se conocía[27] que el colesterol era precursor de los bufadienólidos. En consecuencia, el veneno radiactivo obtenido por inoculación de dicho colesterol, no fue fraccionado en sus componentes esteroidales.

Los resultados obtenidos en función del tiempo de colección del veneno, para cada uno de los trazadores radiactivos inoculados, se encuentran en la Tabla 3.

En el caso de la inyección de |21-^{14}C|5β-colestan-3β-ol (coprostanol radiactivo), se encontró veneno marcado a los 98 y 129 días después de la

inoculación, por lo que dicho veneno se fraccionó para observar si los bufadienólidos habían resultado con marcación.

Como se indica en la Tabla 4, el bufadienólido arenobufagina resultó el presente en mayor proporción, por lo cual fue aislado, purificado y calculada la incorporación específica del coprostanol en el mismo. Los restantes bufadienólidos presentes en la mezcla resultaron también radiactivos, pero debido a la escasa cantidad existente en dicha mezcla, no pudieron ser aislados en estado puro.

Tabla 3. Inoculación de trazadores radiactivos esteroidales.

COMPUESTO INOCULADO	ACT. ESP.	ESPECIE Y NUMERO DE SAPOS	ACTIVIDAD TOTAL INOCULADA	TIEMPO DE COLECCION DEL VENENO	ALICUOTA DE VENENO CRUDO		EXTRACTO (Cl_3CH-MeOH)	
					MASA	ACT. ESP.	MASA	ACT. ESP.
	dpm/mmol		dpm	días	mg	dpm/mg	mg	dpm/mg
|20-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona	$1,2\ 10^9$	*B. paracnemis* (10)	$2,0\ 10^8$	40	1760	3	350	18
|1,2-^{3}H| Colesterol	$1,2\ 10^{11}$	*B. arenarum* (2)	$1,8\ 10^8$	9	8	24	-	-
				15	9	155	-	-
				29	8	140	-	-
				98	3	970	-	-
				129	2	2440	-	-
|21-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona	$3,1\ 10^9$	*B. arenarum* (2)	$8,6\ 10^6$	15	8	0	*	*
				29	12	0	*	*
				98	4	0	*	*
|21-^{14}C| 5β-Colestan-3β-ol	$3,0\ 10^9$	*B. arenarum* (2)	$2,2\ 10^7$	15	10	0	*	*
				29	8	0	*	*
				98	87	19**	31	95**
				129	105	24**	41	117**

* La extracción no se realizó porque el veneno total no tenía radiactividad.

** Valores promedio de los dos animales.

Tabla 4. Incorporación de [21-^{14}C] 5β-colestan-3β-ol en el bufadienólido arenobufagina.

TIEMPO DE COLECCION DEL VENENO	BUFADIENOLIDO AISLADO	MASA DE BUFADIENOLIDO	ACTIVIDAD TOTAL	ACTIVIDAD ESPECIFICA		INCORPORACION ABSOLUTA DEL COPROSTANOL	INCORPORACION ESPECIFICA DEL COPROSTANOL
días		mg	dpm	dpm/mg	dpm/mmol	%	%
98	arenobufagina	3,2	723	226	$9,4\ 10^4$	0,0033	0,0031
129	arenobufagina	3,3	581	176	$7,3\ 10^4$	0,0027	0,0024

ENSAYOS CON HOMOGENEIZADOS Y CON CORTES DE TEJIDO DE GLANDULAS PAROTOIDES DE SAPOS *BUFO ARENARUM*.

a) Inoculación de |1-^{14}C| acetato de sodio y |5-^{3}H| mevalonolactona a cortes de tejido de glándula parotoide.

Los resultados de las incubaciones de una mezcla de estos trazadores radiactivos con cortes de tejido de glándula y de hígado, para dos sapos separadamente, se encuentran en la Tabla 5.

Se observa de dicha tabla, que solamente en las incubaciones de 16 hs con tejido de hígado, hubo incorporación apreciable. En los demás casos no se detectó radiactividad en las zonas de las placas cromatográficas correspondientes a colesterol.

El agregado de colesterol no marcado a los extractos de las incubaciones de 16 hs con tejido hepático y la recristalización de la mezcla total, condujo al aislamiento de colesterol con actividad específica constante de ^{14}C y de ^{3}H. Los valores de actividad específica y de porcentaje de conversión de los trazadores en colesterol, por unidad de masa de tejido, se encuentran en la Tabla 6.

Se observa que se logró obtener colesterol con actividad específica constante, igual a la obtenida en las aguas madres, recién luego de la 5° recristalización y que la actividad específica del derivado cristalino

Tabla 5. Incorporación de |1-^{14}C| acetato de sodio y |5-^{3}H| mevalonolactona en tejido de hígado y de glándula parotoide.

	Sapo 1				Sapo 2			
Tejido	Hígado		Glándula		Hígado		Glándula	
Tiempo de incubación (hs)	2	16	2	16	2	16	2	16
Masa de tejido (mg)	309	243	142	121	270	179	345	336
Actividad de |1-^{14}C| acetato de sodio (dpm)	$6,7\ 10^{6}$	$6,7\ 10^{6}$	$6,7\ 10^{6}$	$6,7\ 10^{6}$	$6,7\ 10^{6}$	$6,7\ 10^{6}$	$6,7\ 10^{6}$	$6,7\ 10^{6}$
Actividad de |5-^{3}H| mevalonolactona (dpm)	$4,9\ 10^{7}$	$4,9\ 10^{7}$	$4,9\ 10^{7}$	$4,9\ 10^{7}$	$4,9\ 10^{7}$	$4,9\ 10^{7}$	$4,9\ 10^{7}$	$4,9\ 10^{7}$
Incorporación de ^{14}C (dpm)	ND	$5,4\ 10^{4}$	ND	ND	ND	$8,7\ 10^{4}$	ND	ND
Incorporación de ^{3}H (dpm)	ND	$1,7\ 10^{6}$	ND	ND	ND	$3,1\ 10^{6}$	ND	ND

ND: no detectable

Tabla 6. Actividades específicas del colesterol biosintetizado en el tejido de hígado.

	Sapo 1		Sapo 2	
	^{3}H	^{14}C	^{3}H	^{14}C
Colesterol, 5° recristalización (dpm/µmol)	3300	85,3	2160	23,8
Colesterol, aguas madres (dpm/µmol)	3350	83,0	2140	23,0
Acetato de colesterol (dpm/µmol)	3300	84,2	2080	22,0
% de conversión/g de tejido	7,0	1,3	6,3	0,5

coincide, tanto para ^{3}H como para ^{14}C.

Los resultados para ambos sapos son muy similares cuando se tiene en cuenta la diferente masa de tejido empleada. Por lo tanto, los porcentajes de conversión de precursor en colesterol, por gramo de tejido, resultaron semejantes, para ambos animales.

Es importante destacar, que en los dos experimentos, incubaciones de 2 hs y de 16 hs, el consumo de los precursores marcados, ya sea acetato o mevalonato, fue menor que 10%, ya que más del 90% de la radiactividad inicial se recuperó en el medio de incubación.

b) Aislamiento de las lipoproteínas de sapo (t-LDL y t-HDL).

Las lipoproteínas aisladas según se detalla más atrás (ver pág. 192), constituyeron bandas únicas por electroforesis en geles de poliacrilamida y la concentración final de cada una de ellas fue 1,52 mg de proteína total/ml de solución de t-LDL y 8,45 mg de proteína total/ml de solución de t-HDL.

c) Marcación de las lipoproteínas con ^{125}I (ver pág. 194).

Los valores de incorporación absoluta porcentual de ^{125}I en las lipoproteínas, se observan en la siguiente tabla (Tabla N° 7).

Tabla 7. Incorporación de ^{125}I en las lipoproteínas de sapo.

	t-LDL			t-HDL		
ACTIVIDAD TOTAL DE ^{125}I AGREGADA	MASA DE PROTEINA	ACTIVIDAD ESPECIFICA	INCORP. ABSOL.	MASA DE PROTEINA	ACTIVIDAD ESPECIFICA	INCORP. ABSOL.
µCi	µg	µCi/ µg proteína	%	µg	µCi/ µg proteína	%
500	100	1,70	34	100	1,83	36,6

d) Ensayo de unión de las lipoproteínas iodadas a los receptores en la membrana.

Cuando se incubaron alícuotas de la preparación de membrana de glándulas parotoides con $|^{125}I|$-t-LDL o $|^{125}I|$-t-HDL, la cantidad de lipoproteína marcada unida a las membranas disminuyó al aumentar la concentración de los ligandos no marcados.

Esto indica la existencia de sitios de unión de alta afinidad para LDL y para HDL.

Las siguientes figuras muestran el análisis de estos sitios de unión por el método de Scatchard.

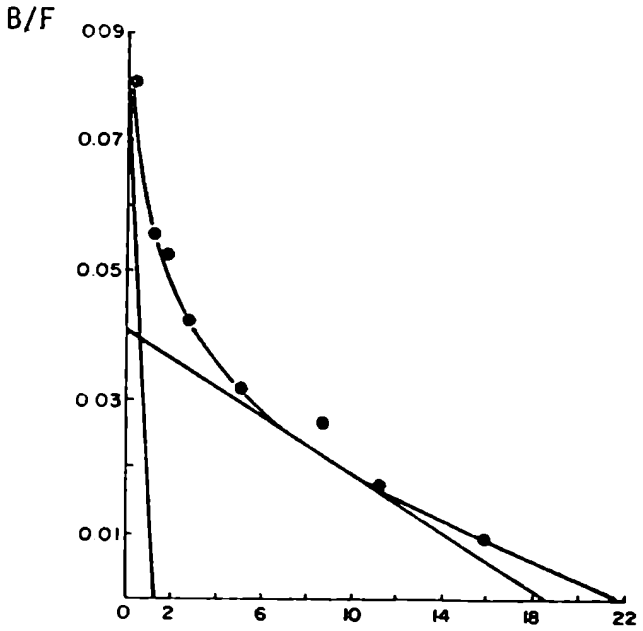


Figura 9: Gráfico de Scatchard para la unión de la t-LDL a membrana de glándula parotoide.

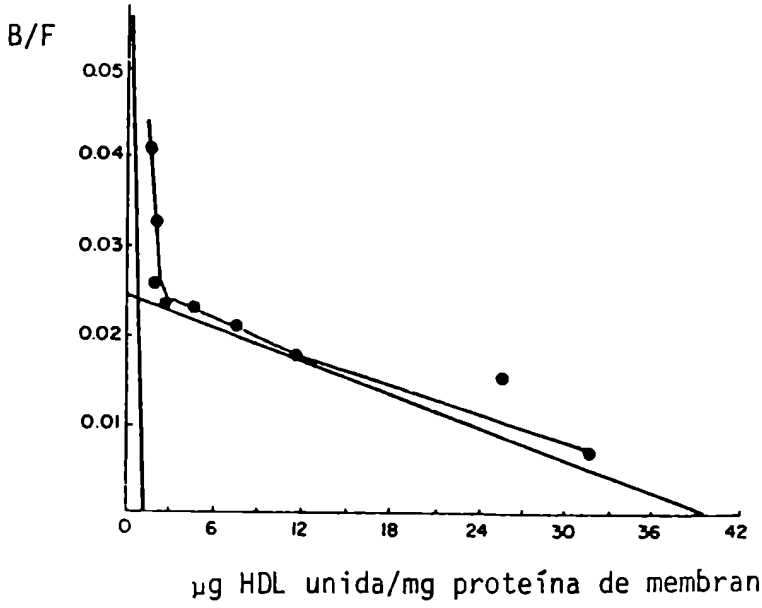


Figura 10: Gráfico de Scatchard para la unión de la t-HDL a membrana de glándula parotoide.

Se obtuvieron curvas que se resolvieron en dos componentes (considerando a cada curva como suma de dos rectas) para ambas lipoproteínas: una componente de alta afinidad (gran valor de pendiente, o sea pequeño valor de Kd) y una de baja afinidad.

Los valores de constante de disociación (Kd) y número de sitios de unión relativo a la masa total de proteína de membrana (Q), para las componentes de alta y baja afinidad para ambas lipoproteínas, se indican en la siguiente tabla (N°8).

Tabla 8. Constantes de disociación (Kd) y números de sitios de unión (Q) para t-LDL y t-HDL.

		Kd (µg/ml)	Q (µg/mg proteína)
t-LDL	Alta afinidad	3,0	1,7
	Baja afinidad	41,0	19,0
t-HDL	Alta afinidad	2,9	1,5
	Baja afinidad	155,0	47,0

e) Marcación de las lipoproteínas con linoleato de |1,2,6,7-^{3}H| colesterol.

Los contenidos en colesterol y actividades específicas de las lipoproteínas marcadas con colesterol tritiado, se indican en la siguiente tabla (N°9).

Tabla 9. Incorporación de colesterol tritiado en las lipoproteínas.

	MASA DE PROTEINA MARCADA	ACTIVIDAD TOTAL AGREGADA DEL LINOLEATO DE COLESTEROL TRITIADO	ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LIPOPROTEINA MARCADA	INCORPORACION ABSOLUTA	CONTENIDO DE COLESTEROL TOTAL
	mg	dpm	dpm/ mg proteína	%	mg/ mg proteína
t-LDL	1	$8,8\ 10^7$	$6,2\ 10^7$	70	0,034
t-HDL	1	$8,8\ 10^7$	$8,1\ 10^7$	92	0,086

f) Incubación de cortes de tejido de glándula parotoide con las lipoproteínas marcadas con linoleato de |1,2,6,7-^{3}H| colesterol.

Estos ensayos, realizados por triplicado, con y sin el agregado de colchicina, para ambas lipoproteínas, condujeron a los resultados indicados en la siguiente tabla (N°10).

Tabla 10. Incorporación de lipoproteínas marcadas en el tejido de glándula parotoide.

	CONCENTRACION DE COLCHICINA	RADIACTIVIDAD TOTAL INCORPORADA	ACTIVIDAD ESPECIFICA	CONTENIDO DE COLESTEROL TOTAL	INCORPORACION EN EL TEJIDO		HIDROLISIS DEL LINOLEATO DE COLESTEROL TRITIADO
					DE PROTEINA	DE COLESTEROL TOTAL	
	µM	dpm/ mg tejido	dpm/ mg proteína	mg/ mg proteína	ng/ mg tejido	ng/ mg tejido	%
t-LDL	-	2000 ± 500	$6,2\ 10^7$	0,034	32 ± 8	1,1 ± 0,3	4,3
	1	800 ± 60	$6,2\ 10^7$	0,034	13 ± 1	0,4 ± 0,1	18,3
t-HDL	-	1100 ± 500	$8,1\ 10^7$	0,086	14 ± 6	1,2 ± 0,5	13,9
	1	2200 ± 160	$8,1\ 10^7$	0,086	28 ± 2	2,3 ± 0,2	6,0

Los valores de concentración de lipoproteína y de colchicina se fijaron inicialmente y la actividad específica de cada lipoproteína era conocida.

La radiactividad total incorporada al tejido en cada caso, se midió en los extractos orgánicos, luego de las incubaciones.

Con estos últimos valores y los de actividad específica de las lipoproteínas, se obtuvieron las incorporaciones de t-LDL y t-HDL al tejido. A partir de dichas incorporaciones y conociendo la concentración de colesterol en cada lipoproteína, se calcularon los valores de incorporación de colesterol al tejido.

Cuando los extractos orgánicos se cromatografiaron en capa delgada y cada cromatograma se cortó en tiras transversales para su elución y posterior medición de radiactividad, se obtuvieron perfiles cromatográficos como el de la figura 11, en donde se representa radiactividad en función de número de fracción eluida.

Las bandas radiactivas comparadas con testigos correspondían a colesterol y a linoleato de colesterol, según Rf creciente. De la relación de la radiactividad presente en dichas bandas, se obtuvo el porcentaje de hidrólisis del linoleato de colesterol tritiado incorporado al tejido, en cada uno de los casos.

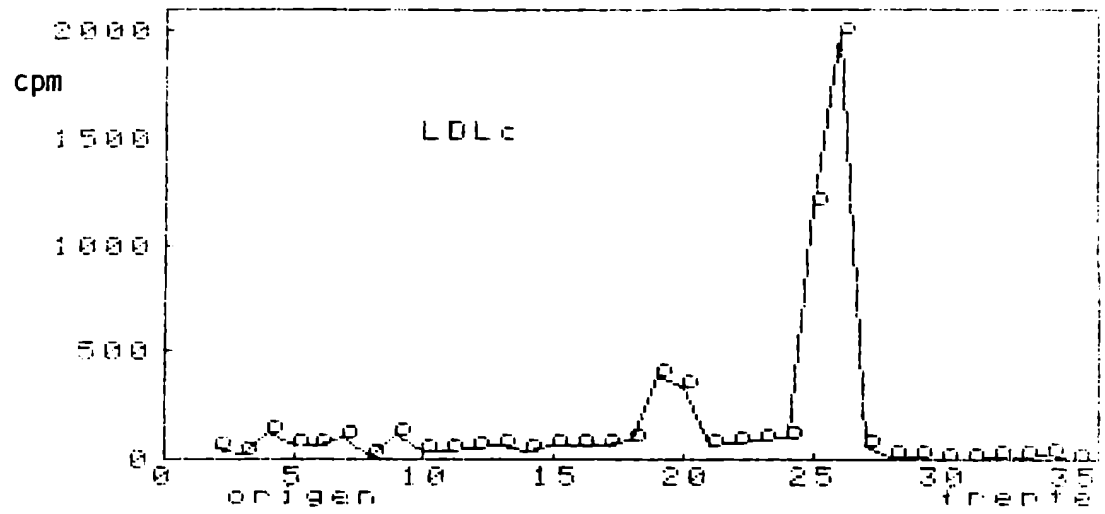


Figura 11: Perfil cromatográfico del extracto orgánico obtenido luego de la incubación de tejido de glándula parotoide con ^{3}H-t-LDL con agregado de colchicina.

CAPITULO 5

DISCUSION DE RESULTADOS

INOCULACION DE TRAZADORES RADIACTIVOS A ANIMALES INTACTOS.

a) Acido |2-^{14}C| mevalónico (22).

Los resultados presentados en la Tabla 1, indican que los bufadienólidos aislados presentaron una actividad específica casi nula, lo cual podría señalar que, al menos teóricamente, el "tiempo de reacción" no fue suficiente y que si se desearan obtener bufadienólidos radiactivos por inoculación de ácido mevalónico, uno de los factores a modificar sería el lapso desde la inoculación del trazador hasta la extracción del veneno, que posiblemente debería ser mucho mayor que el utilizado en esta experiencia.

Por otra parte, conocido el carácter de precursor biosintético del colesterol, respecto de los bufadienólidos y teniendo en cuenta el bajo valor de radiactividad del colesterol glandular, si hubiera existido transformación de éste en los bufadienólidos, sus respectivos valores de incorporación habrían sido excesivamente reducidos como para ser detectados con los métodos analíticos utilizados.

El ácido mevalónico se convirtió en colesterol en el hígado, con una incorporación específica de 0,37% y absoluta de 0,41%. Este era un resultado esperado, dado el reconocido carácter del ácido mevalónico como precursor biosintético del colesterol en tejido hepático[24].

En el caso del material extraído de glándulas parotoides, la incorpora-

ción absoluta del ácido mevalónico en el veneno total, el extracto clorofórmico-metanólico y la fracción "γ-sitosterol" aislada, fue de aproximadamente 0,02% en los tres casos, evidentemente un valor mucho menor que el obtenido para el colesterol de hígado. Recordando que el único componente de la mezcla total que había resultado marcado era el colesterol presente en el llamado "γ-sitosterol" (ver Tabla 2, pág. 106), es evidente que la incorporación de ácido mevalónico en colesterol, difiere notablemente si éste proviene del hígado o de las glándulas parotoides.

Varios factores podrían contribuir a producir esta diferencia:

- El ácido mevalónico podría llegar más rápidamente al hígado que a la glándula parotoide.
- El hígado podría biosintetizar colesterol más rápidamente que la glándula.
- El colesterol glandular podría provenir del exterior de la célula y no de una biosíntesis *de novo*, en cuyo caso sólo una parte del colesterol circulante se encontraría en la glándula. Tanto el colesterol circulante como el de la glándula podrían tener menor actividad específica, simplemente por dilución con el colesterol preexistente.

Un resultado intrigante proviene del conocimiento que el colesterol componente del "γ-sitosterol" era más de quince veces más radiactivo que los demás esteroles homólogos presentes en la mezcla, indicando, como ya se expresó, que era el único esterol biosintetizado por el sapo y haciendo presumir que

los demás (esteroles típicos de vegetales) podrían ingresar a través de la dieta del animal y llegar a la glándula mediante algún mecanismo desconocido.

El hecho de que esteroles como campesterol, estigmasterol y sitosterol estén presentes en el "veneno" de sapos, abre una nueva incógnita: aparentemente, aunque tienen distintas cadenas laterales, todos estos esteroles son tomados por la célula glandular desde el exterior de la misma, pero su posible función como precursores de los bufadienólidos de sapos no puede asegurarse. Presumiblemente, dado que la célula los acumula, alguna función deben cumplir. Además, si la cadena lateral se escindiera entre los carbonos 20 y 22, todos estos esteroles darían lugar a un mismo posible precursor, aunque no surge *a priori* una explicación lógica para que fueran utilizados como precursores de bufadienólidos en reemplazo de colesterol, dada la abundancia de este último en los tejidos del animal, salvo que constituyeran parte de algún camino biosintético secundario o alternativo.

b) |20-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (69).

En el caso de la inoculación de este compuesto radiactivo, los resultados obtenidos con sapos *Bufo paracnemis* indican que prácticamente no hubo incorporación en el veneno crudo o en el extracto clorofórmico-metanólico de dicho veneno, luego de un lapso de 40 días desde la administración del trazador.

Los pequeños valores de radiactividad obtenidos, sugirieron la necesidad de una experiencia adicional para confirmarlos, fundamentalmente en lo que respecta al tiempo de duración del ensayo. Dicha experiencia se realizó luego, con sapos *Bufo arenarum* inoculando el mismo producto, pero marcado en C-21, o sea con |21-^{14}C| 3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona.

c) |21-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (86).

Esta experiencia, con sapos *Bufo arenarum*, seguida durante tres meses, en la que se obtuvieron venenos totalmente inactivos, confirmó los resultados anteriores.

Aún teniendo en cuenta la diferencia en la especie de sapo y en el carbono elegido para la marcación isotópica del producto inoculado, los datos finales fueron esencialmente los mismos que en el caso b).

Este resultado indicaría que un producto esteroidal con cadena lateral de 2 carbonos, de tipo pregnano (marcado en C-20 o en C-21) con la relación de los anillos A/B *cis*, pero sin hidroxilar en C-14 con orientación β, no es precursor de los bufadienólidos en sapos, o por lo menos no puede llegar al sitio de biosíntesis de los mismos.

Teniendo en cuenta que el colesterol[27] y el coprostanol (88) (como ya se señaló) que tienen la cadena lateral de 8 carbonos intacta, son incorporados en los bufadienólidos, se podría postular que dicha cadena lateral es necesa-

ria para acceder al sitio de biosíntesis. Una alternativa sería suponer que un trazador con cadena lateral de 2 carbonos, sería precursor de los bufadienólidos, sólo si su sistema anular presentara la sustitución definitiva de los mismos, o sea, 20-ceto-pregnanos con isomería A/B *cis* y sustituyente oxigenado en C-14 con orientación β.

Si esta última posibilidad fuera correcta, el pregnano inoculado no podría ser un precursor adecuado y el esquema biosintético de colesterol a bufadienólidos seguiría otro camino sin utilizar a dicho pregnano como intermediario (ver figura 7, pág. 32).

Aquí es necesario destacar que el pregnano inoculado ni siquiera llegó a la glándula, pues se obtuvo veneno totalmente inactivo.

Sin llegar a descartar la alternativa anterior, dado que no existen datos como para hacerlo, aparenta ser más probable que el fracaso de la experiencia se deba a la imposibilidad para el trazador de llegar al sitio de biosíntesis debido a la cadena lateral degradada que presenta.

d) |1,2-^{3}H| Colesterol (2).

Como se esperaba según resultados anteriores[27], este producto resultó incorporado en el veneno glandular de sapos *Bufo arenarum* y los valores de actividad aumentaron con el tiempo desde su inoculación.

Los resultados obtenidos solamente indican que las condiciones experi-

mentales eran adecuadas para las tres experiencias realizadas en paralelo con sapos *Bufo arenarum*. No tienen valor comparativo ya que la actividad específica del colesterol tritiado era mucho mayor que la de los otros dos productos inoculados y también lo fue la actividad total inoculada.

e) |21-^{14}C| 5β-Colestan-3β-ol (88).

En el ensayo con este trazador radiactivo, que fue realizado con sapos *Bufo arenarum* en forma paralela a los dos anteriores, se lograron resultados positivos de incorporación, por lo que se deduce que el coprostanol (88) puede actuar como precursor de los bufadienólidos de origen animal (Tablas 3 y 4).

Este hallazgo es de significativa importancia pues estaría indicando, al menos para el caso de experiencias con animales intactos, la necesidad biológica de que los precursores biosintéticos de bufadienólidos, deban poseer una cadena lateral de por lo menos 8 carbonos, tipo colesterol, para poder ser transportados y acceder a las glándulas productoras de "veneno".

Considerando que el coprostanol, con sistema A/B saturado con configuración *cis*, está estructuralmente más relacionado con los bufadienólidos que el propio colesterol y como, además de poco probable, es desconocido un camino de coprostanol a colesterol, el coprostanol debería ser un precursor posterior a colesterol en el camino biosintético a bufadienólidos.

El valor de incorporación específica de coprostanol en el bufadienólido arenobufagina (0,003%) resulta menor que el descripto[27] para colesterol marcado en C-20, incorporado en marinobufagina (0,03 a 0,1% en sapos *Bufo paracnemis*). Las diferencias experimentales (especie de sapo, época de inoculación y duración de las experiencias) entre el ensayo descripto previamente y el realizado en este trabajo, no permiten efectuar una comparación válida entre ambos, en cuanto a una cuantificación de resultados.

Por otra parte, existe la posibilidad de que el coprostanol no sea un "precursor natural" sino que pertenezca a un camino secundario de biosíntesis de bufadienólidos, pero por poseer el elemento fundamental para acceder al sitio de biosíntesis, esto es, una cadena lateral idéntica a la de colesterol, los mecanismos involucrados en esos pasos no puedan diferenciarlo de colesterol. Una vez en la glándula, podría ser convertido en bufadienólido por un procedimiento biosintético aberrante, es decir, no natural.

ENSAYOS CON HOMOGENEIZADOS Y CON CORTES DE TEJIDO DE GLANDULAS PAROTOIDES DE SAPOS *BUFO ARENARUM*.

Inoculación de |1-^{14}C| acetato de sodio y |5-^{3}H| mevalonolactona a cortes de tejido de glándula parotoide.

Dados los valores ya presentados, es evidente que, en las condiciones experimentales empleadas, sólo el tejido de hígado fue capaz de biosintetizar colesterol, mientras que el tejido de glándula parotoide no produjo colesterol, a partir de acetato o mevalonato, durante las 16 hs de incubación.

En el caso de incorporación positiva con cortes de tejido de hígado, aunque en las incubaciones se agregó más cantidad de precursor tritiado (mevalonolactona) que de precursor con ^{14}C (acetato de sodio), el cálculo del porcentaje de conversión permitió establecer que la mevalonolactona es un precursor más eficaz que el acetato, resultado compatible con el camino biosintético establecido para el colesterol en tejido hepático.

Los resultados obtenidos con los cortes de tejido de hígado, señalan la existencia de un período de inducción durante al menos las primeras 2 hs de incubación, ya que no se observó colesterol radiactivo en las incubaciones de 2 hs.

Hellig y Savard[95], trabajando con cortes de tejido de cuerpo lúteo bovino, encontraron un período de inducción similar, aunque de menor extensión,

en la incorporación de $|1\text{-}^{14}C|$ acetato de sodio en colesterol. Estos autores atribuyeron dicho período de inducción, a la presencia de cierta cantidad de acetato no marcado endógeno, que podría ser utilizado por el tejido antes que el acetato exógeno pudiera metabolizarse.

En el presente caso, el mayor período previo a la formación de colesterol radiactivo en cortes de tejido de hígado de sapos, comparado con los de cuerpo lúteo bovino, se puede explicar por varios factores, entre ellos, la presencia de niveles mayores de precursores de colesterol endógenos, una difusión más lenta del sustrato dentro del tejido y la diferente temperatura de las experiencias de incubación: Hellig y Savard realizaron sus experiencias a 37°C, mientras que en este trabajo se realizaron a 25°C, por consiguiente, con una probable reducción del metabolismo que transforma los precursores en colesterol.

Como se dijo anteriormente, hay tres fuentes inmediatas de colesterol para las glándulas parotoides: síntesis *de novo*, colesterol de lipoproteínas y reservas intracelulares de ésteres de colesterol. Aunque esta última no se mencionó como fuente de aprovisionamiento de colesterol, es la forma habitual de almacenamiento dentro de la célula. Además, la cantidad de sustrato disponible en esa reserva de ésteres de colesterol, depende obviamente de la actividad del proceso previo de entrada, vía lipoproteínas y de la velocidad de la síntesis *de novo*.

Todos los tejidos esteroidogénicos estudiados, son capaces de sintetizar colesterol *de novo*, a pesar de lo cual, la cantidad de colesterol tomado de las lipoproteínas es, en general, mayor que la cantidad provista por dicha síntesis.

Sin embargo, la experiencia realizada *in vitro*, con acetato y mevalonato, indica que el tejido de glándula parotoide no biosintetiza colesterol en incubaciones de hasta 16 hs, mientras que, como se esperaba, el tejido hepático sí produce este esterol.

Este dato estaría indicando que el colesterol que se encuentra en el "veneno de sapos", extraído de las glándulas parotoides, no sería sintetizado en la propia glándula, sino obtenido en su mayor parte, de fuentes externas.

Unión de t-LDL y t-HDL a receptores en la membrana celular de glándula parotoide.

La investigación de la presencia de sitios de unión para las lipoproteínas en las membranas celulares de glándula parotoide de sapos *Bufo arenarum*, condujo a resultados compatibles con la presencia de sitios receptores para ambas lipoproteínas, con afinidades similares a aquéllas descriptas [96,97] para otros tejidos esteroidogénicos.

Por otro lado, otros estudios de unión de ^{125}I-HDL humana (h-HDL) a membranas de glándula parotoide [98] indicaron la existencia de sitios de unión de

alta afinidad, con Kd = 8,6 µg/ml y una máxima capacidad de unión Q = 2,2 µg/mg de proteína de HDL. Cuando se comparan estos valores con los obtenidos para las dos lipoproteínas de sapo (ver Tabla 8), se observa que la lipoproteína humana tiene menor afinidad (para el sitio de alta afinidad) pero una similar capacidad de unión.

Los gráficos de Scatchard se resolvieron en dos componentes, aplicando un modelo matemático para dos sitios de unión diferentes, uno de alta y otro de baja afinidad. No se puede descartar, sin embargo, que se trate de sitios idénticos pero no independientes y las curvas obtenidas correspondan a un caso de cooperatividad negativa (ver pág. 94).

Incorporación de lipoproteínas marcadas con linoleato de colesterol tritiado.

La incorporación y degradación de LDL por las células, consiste de un mecanismo específico mediado por receptores y una pinocitosis inespecífica (que involucra la endocitosis de fluidos o solutos vía pequeñas vesículas que se forman en la membrana).

Ostlum y colaboradores[94] informaron que la colchicina (89) inhibe selectivamente la incorporación de LDL mediada por receptores. Estos autores no observaron efecto en fibroblastos de pacientes afectados de hipercolesterolemia familiar (enfermedad hereditaria caracterizada por la falta de sín-

tesis de los receptores celulares para LDL y consecuentemente por los niveles muy altos de LDL, o sea de colesterol, en sangre). Además encontraron que el agregado de colchicina tampoco afectó la degradación de albúmina de suero bovino en células normales.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, en este trabajo se probó el efecto de la colchicina sobre la incorporación de lipoproteínas mediada por receptores.

Los resultados (ver Tabla 10) indican que el agregado de colchicina inhibe la incorporación de LDL en aproximadamente 60% y también produce un aumento en el porcentaje de hidrólisis del linoleato de colesterol incorporado a la glándula. Por otro lado, para HDL, el agregado de colchicina, aumenta en un 100% la incorporación de colesterol, reduciendo el porcentaje de hidrólisis del linoleato de colesterol.

Estos resultados muestran que, en condiciones normales, más de 70 ng de colesterol por 100 mg de tejido, deberían ser incorporados en 16 hs, por el camino de la LDL mediado por receptor y que, además, la entrada de colesterol por la vía de la LDL aumenta la esterificación de colesterol.

Se ha demostrado [99-101] que la adición de LDL, pero no de HDL, a fibroblastos preincubados en medios pobres en lipoproteínas, incrementa la incorporación de ácido oleico marcado con ^{14}C en ésteres de colesterol. Además, mediciones directas de la actividad de la enzima acil-CoA:colesterol aciltransfe-

rasa (ACAT, que cataliza la esterificación de colesterol) indicaron que la misma se incrementó cuando se cultivaron fibroblastos en presencia de LDL.

Estas observaciones están de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, en lo concerniente al incremento detectado de la hidrólisis cuando se inhibe la endocitosis de LDL mediada por receptor ("internalización") y también con un incremento similar de la hidrólisis producida cuando se usa HDL en lugar de LDL, a pesar de que en ambos casos la incorporación de colesterol resultó casi idéntica.

El medio de incubación en el que se trató el tejido glandular durante 16 hs, no fue capaz por sí solo, de degradar el linoleato de $|^{3}H|$ colesterol unido a las lipoproteínas (no se observó colesterol tritiado en los medios de incubación al finalizar las mismas) indicando que su hidrólisis no era consecuencia de la secreción de algún producto celular.

Por otra parte, a pesar de que el mecanismo de la incorporación de colesterol, vía la HDL, no se conoce completamente, parece ser diferente del camino de la LDL y la evidencia disponible indica que el camino de la HDL está mediado por un receptor que es distinto del receptor para la LDL.

Los cultivos de células del tumor adrenal Y-1 de ratón, normalmente no metabolizan HDL; sin embargo, el hecho de que utilicen colesterol de HDL cuando están inhibidos los microfilamentos, puede indicar que el citoesqueleto restringe, de alguna manera, la expresión de este camino *in vitro* [88].

Estos resultados previos, concuerdan con los obtenidos en las presentes incubaciones de $|^3H|$ t-HDL con tejido de glándula parotoide de sapo, que muestran un aumento de 100% en la incorporación de colesterol y una disminución en el porcentaje de hidrólisis, cuando el experimento se llevó a cabo con el agregado de colchicina (inhibidor del citoesqueleto), respecto al realizado sin colchicina.

Ya que el camino de la HDL ha sido demostrado convincentemente sólo en roedores[88], el significado fisiológico del último resultado no se puede explicar sobre la base del conocimiento presente.

Los datos anteriores combinados, llevan a establecer que en el proceso objeto de la presente investigación, el colesterol usado por las glándulas parotoides para la biosíntesis de bufadienólidos, debería ser producido principalmente por el hígado o absorbido por el intestino, transportado por las lipoproteínas circulantes e incorporado a la glándula por un mecanismo mediado por receptor.

CAPITULO 6

EXPERIMENTAL

GENERALIDADES

Los puntos de fusión fueron determinados con un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de absorción en el infrarrojo (IR) se realizaron utilizando espectrofotómetros Perkin-Elmer, modelo 421 o modelo 137 o modelo 710 B, dispersando la muestra en Nujol.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{1}H (RMN-^{1}H) se efectuaron a 60 MHz con un espectrómetro Varian A-60, o a 100 MHz con un espectrómetro Varian XL-100-15. Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (RMN-^{13}C) se efectuaron con el equipo Varian XL-100-15 a 25,2 MHz, por el método pulsado con transformada de Fourier, utilizando una computadora Varian 620/L-100 y una unidad de discos magnéticos Sykes 7000. El solvente utilizado fue cloroformo deuterado (Cl_3CD) salvo en los casos en que se indique lo contrario. En todas las determinaciones se usó tetrametilsilano (TMS) como señal de referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en unidades δ (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz); las señales se indican en cada caso como s: singulete, d: doblete, dd: doble doblete, t: triplete, c: cuadruplete, m: multiplete, ba: banda ancha, sa: singulete ancho.

Los espectros de masa (EM) se realizaron a 70 eV en un espectrómetro de masa Varian-MAT CH7-A, comandado por una computadora Varian-MAT Data System

166, con unidades de salida TRC Tektronix 4010 e impresora Tektronix 4631. En todos los casos los espectros se realizaron por introducción directa de las muestras.

Las mediciones de radiactividad (^{3}H o ^{14}C) se llevaron a cabo en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb 3003, o en un Tracor Analytic Mark III, o en un Beckman LS-100. Según la polaridad, las muestras se disolvieron empleando una solución centelleadora conteniendo 4,0 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 250 mg de 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil) benceno (dimetil-POPOP) por litro de solución en tolueno, o en una solución centelleadora conteniendo 100 g de naftaleno, 7,0 g de PPO y 300 mg de dimetil-POPOP por litro de solución en dioxano. Para muestras dispersables en agua, se realizó el agregado de 14 ml de solución centelleadora en dioxano a la muestra suspendida en 1 ml de agua.

Las mediciones de radiactividad de ^{125}I se realizaron en un contador de radiación gamma Beckman Gamma 4000.

Las radiocromatografías se realizaron utilizando un radiocromatógrafo Packard 7201 equipado con un contador Geiger, un registrador y un integrador.

Las cromatografías en capa delgada (ccd) analíticas se realizaron utilizando como fase fija silicagel G (Merck) y como reveladores vapores de iodo o solución acuosa de ácido sulfúrico al 50% con posterior calentamiento a 110°C. Para mayor resolución se utilizaron placas cromatográficas comercia-

les de silicagel 60 F_{254} sobre aluminio (Merck).

Las ccd preparativas (1-2 mm de espesor) se efectuaron utilizando silicagel PF_{254} (Merck), observándolas luego de desarrolladas a la luz ultravioleta (254 nm). Para mayor resolución, en muestras radiactivas, se utilizaron placas cromatográficas comerciales de silicagel 60 F_{254} (Merck) de 0,25 mm de espesor.

Los solventes de desarrollo para ccd fueron cloruro de metileno con proporciones variables de metanol (0 a 10%) y tolueno con proporciones variables de acetato de etilo. En otros casos, se indica el solvente utilizado.

Las cromatografías en columna se realizaron utilizando como adsorbente silicagel Davison (malla 100-200).

Las cromatografías gas-líquido (cgl) analíticas se efectuaron en un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard, modelo 5830 A, con detector de ionización de llama, equipado con columnas de vidrio de 1,80 ó 1,20 m de longitud y 2 mm de diámetro interno, empacadas con fases SE-30 (3%) u OV-17 (3%), sobre Chromosorb W-AW-DMCS, malla 60-80.

Las cromatografías gas-líquido preparativas se efectuaron en un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard, modelo 5750, con detector de conductividad térmica, con una unidad colectora de fracciones modelo 5797 B, equipado con columnas metálicas de 1,80 m de longitud y 3 mm de diámetro externo, empacadas con fase OV-17 (3%) sobre Chromosorb W-AW-DMCS, malla 60-80.

Las cromatografías líquido-líquido de alta resolución (clar) se efectuaron en un cromatógrafo líquido Hewlett-Packard modelo 1084 B, equipado con un detector de índice de refracción (RI) modelo 79877 A, un inyector automático de volumen variable modelo 79841 A y un colector automático de fracciones. Se utilizaron dos columnas RP8 (para cromatografía en fase inversa) en serie, una de 5 µm y la otra de 10 µm de tamaño de partícula, de 200 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno cada una. El solvente de desarrollo utilizado fue acetonitrilo:agua (85:15) con un caudal de 2 ml/minuto.

Las ultracentrifugaciones se realizaron utilizando una centrífuga Beckman L5-50.

Los homogeneizados se efectuaron utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax y las incubaciones se realizaron en un incubador modelo Dubnofs.

El cianuro de potasio marcado con ^{14}C fue adquirido al Commisariat a l' Energie Atomique, Francia.

El ioduro de metilo marcado con ^{14}C fue adquirido a The Radiochemical Centre Ltd., Amersham, Inglaterra.

El $|1\text{-}^{14}C|$ acetato de sodio, $|5\text{-}^{3}H|$ mevalonolactona, ácido $|2\text{-}^{14}C|$ mevalónico como sal de DBED (dibenciletilendiamina), $|1,2\text{-}^{3}H|$ colesterol, linoleato de $|1,2,6,7\text{-}^{3}H|$ colesterol y el $|^{125}I|$ ioduro de sodio en hidróxido de sodio fueron adquiridos a New England Nuclear Corp., EE.UU.

Todas las drogas radiactivas comerciales se adquirieron por intermedio

de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Los solventes fueron evaporados a presión reducida a temperaturas por debajo de 50°C.

3β-Acetoxi-17ξ-hidroxiandrost-5-en-17ξ-carbonitrilo (57).

Método A:

3β-Acetoxiandrost-5-en-17-ona (56) (330 mg) se suspendió en etanol (6 ml) en un tubo de vidrio Pyrex, se le agregaron 650 mg de cianuro de potasio (relación KCN:esteroide = 10:1) y 1,5 ml de ácido acético manteniéndose todo en un baño frío (hielo y sal) y cerrándose inmediatamente el tubo a la llama. La mezcla de reacción se colocó en un horno cilíndrico eléctrico a 80°C y se mantuvo a esa temperatura durante 45 minutos. Se volcó sobre una solución acuosa de ácido clorhídrico (5 ml de HCl (c) en 50 ml de agua) y se filtró. El sólido se disolvió en acetato de etilo (50 ml), se lavó con agua (3 x 50 ml) y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvo un sólido cristalino (335 mg) que por ccd reveló ser una mezcla con un rendimiento menor que 40% en el producto buscado.

Al intentar purificar la cianhidrina por ccd preparativa o por cromatografía en columna con silicagel o alúmina neutra, o por cromatografía gaseosa, se recuperaba sólo el material de partida por lo que se dedujo que la cianhidrina se descomponía perdiendo ácido cianhídrico.

Método B:

Se utilizó un sistema como el de la figura 12.

En el balón se colocaron 120 mg de 3β-acetoxiandrost-5-en-17-ona (56) y 4 ml de etanol. En el fondo del tubo se colocaron 120 mg de cianuro de potasio (relación 5:1 con el esteroide) y en la tubuladura lateral 1 ml de ácido sulfúrico (c). Se enfrió el balón sumergiéndolo en aire líquido y se evacuó el sistema (1 torr) abriendo las llaves A, B y C. Luego se cerró la llave A y se giró el tubo para poner en contacto el ácido con el cianuro.

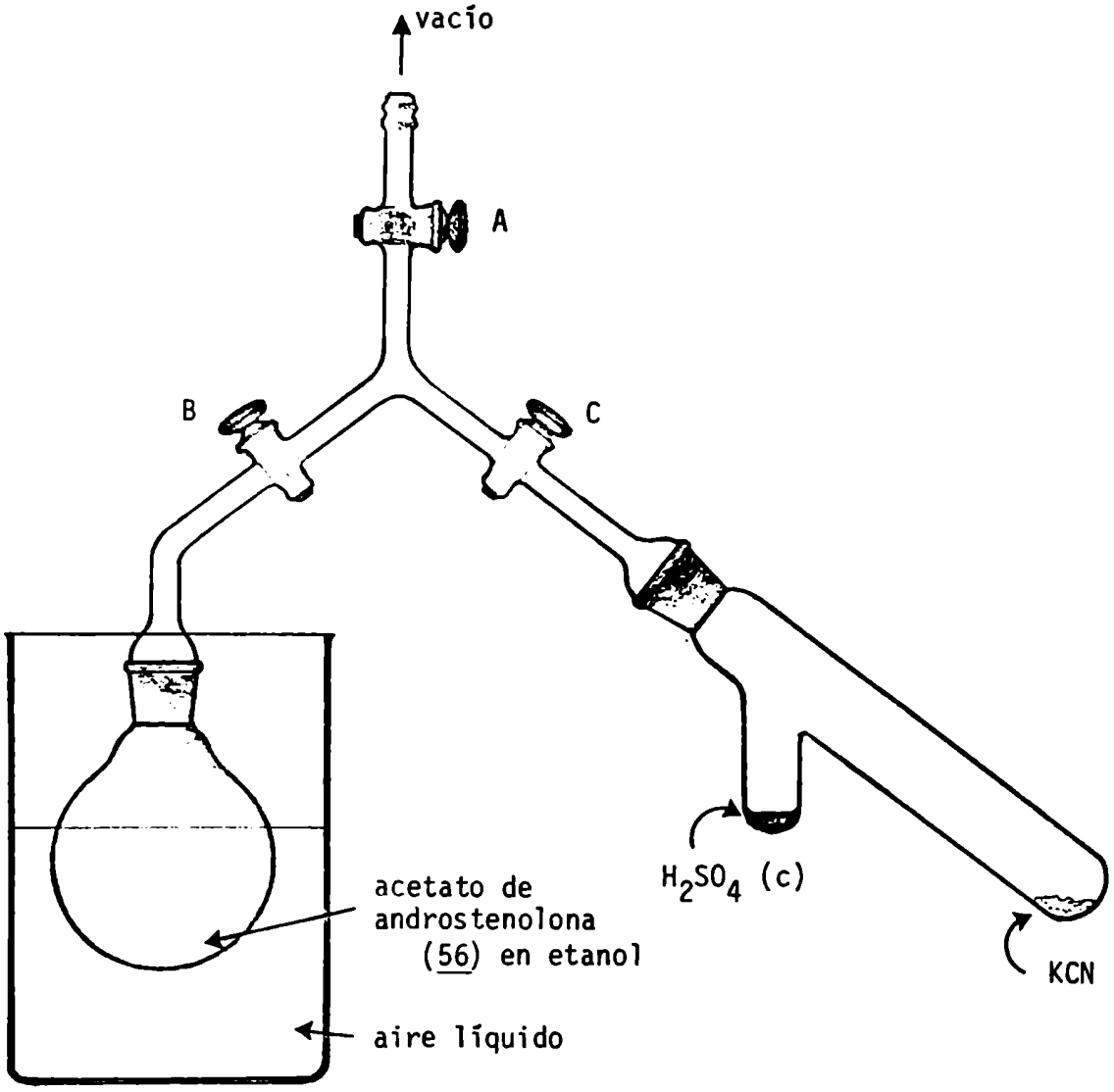


Figura 12: Equipo de reacción para la síntesis de la cianhidrina 57.

Se calentó el tubo unos minutos y se cerró la llave B. Por último se sacó el baño refrigerante, se dejó llegar a temperatura ambiente con agitación magnética y se mantuvo en estas condiciones durante 2 hs.

El producto se aisló como en el caso anterior (método A) recuperándose 118 mg de material de partida como se comprobó por cromatografía.

Método C:

3β-Acetoxiandrost-5-en-17-ona (56) (120 mg) se suspendió en 3 ml de etanol y se agregaron 120 mg de cianuro de potasio (relación 5:1 con el esteroide). La mezcla de reacción se mantuvo a 10°C en un balón tapado con un tapón de látex y con buena agitación. Se inyectó una gota de ácido acético a través del tapón. Luego de 15 minutos se agregaron 0,7 ml más de ácido acético, gota a gota a una velocidad de 6 gotas durante 1 hora y el resto durante una segunda hora. Se llevó a temperatura ambiente y se mantuvo así 2 horas más.

El producto total se aisló como en el método A (pág. 141).

Se obtuvieron 116 mg (conversión aproximada de 90% según ccd) de un producto de menor Rf que el de partida en ccd, que recristalizado de etanol resultó ser la cianhidrina buscada (57) con un p.f. 185-187°C (lit.[102]: 195 y 203-206°C, para los dos epímeros en C-17).

IR (cm^{-1}): 3300 (O-H), 2210 (C≡N), 1730 (C=O, éster), 1250 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,94 (s, 3H, CH_3-18), 1,03 (s, 3H, CH_3-19), 2,02 (s, 3H, CH_3COO-), 3,12 (sa, 1H, OH), 4,60 (m, 1H, H-3), 5,40 (m, 1H, H-6).

EM, m/z(%): 297 (M - AcOH, 100), 282 (M - AcOH - CH_3, 20), 270 (M - AcOH - CNH, 22), 264 (M - AcOH - CH_3 - H_2O, 13), 255 (M - AcOH - CH_3 - CNH, 7), 237 (M - AcOH - CH_3 - H_2O - CNH, 5), 213 (M - AcOH - CNH - anillo D - H, 11).

Método D:

Se usó el mismo método C pero con una relación 1:1 de cianuro de sodio a esteroide y agregando trozos de vidrio que dificultaban pero no impedían la agitación. Este añadido se realizó para simular la introducción del cianuro de sodio marcado por ruptura de la ampolla en que se provee. Las cantidades utilizadas fueron: 100 mg del compuesto 56, 14,7 mg de cianuro de sodio, 4 ml de etanol y 0,2 ml de ácido acético.

Luego de aislado el producto de la reacción, se observó un bajo rendimiento en la cianhidrina (20-30% por ccd).

Método E:

Se utilizó el método D pero con relación 2:1 de cianuro de sodio a esteroide y agregando también los trozos de vidrio.

En este caso se determinó, por ccd, que la conversión en cianhidrina fue aproximadamente 60%.

Método F:

Se usó el método D con una relación 2,5:1 de cianuro de sodio a esteroide, agregando los trozos de vidrio.

Por ccd se determinó que la conversión en cianhidrina fue aproximadamente 80%.

3β-Acetoxiandrosta-5,16-dien-17-carbonitrilo (58).

Método A:

3β-Acetoxi-17ξ-hidroxiandrost-5-en-17ξ-carbonitrilo (57) (14 mg) se disolvió en 0,3 ml de piridina anhidra, la solución se enfrió a -8°C y se adicionó 0,1 ml de cloruro de tionilo recién destilado. La reacción se

mantuvo en el congelador de una heladera común durante 21 hs. Se volcó cuidadosamente sobre hielo picado y se extrajo con éter etílico (2 x 30 ml); se lavó la capa etérea con solución al 10% de ácido clorhídrico acuoso (2 x 30 ml) y finalmente con agua hasta neutralidad de la fase acuosa; el extracto orgánico se secó y se evaporó el solvente.

Se obtuvieron 16 mg de un producto impuro que por ccd mostró ser el reactivo de partida en una proporción mayor que 90%.

Método B:

Se usó el método A anterior, pero a temperatura ambiente durante 20 hs.

El rendimiento de la reacción fue muy bajo.

Método C:

Se ensayó nuevamente el método A (pág.144) a dos temperaturas distintas: a 78°C durante 1 hora y a 127°C durante 1 hora. Se comprobó en ambos casos, por ccd, que había desaparecido el material de partida y se había formado un producto viscoso que quedaba en el origen de la siembra.

Como se sabe que el producto esperado debe tener mayor Rf que el reactivo de partida, se desecharon estas dos condiciones técnicas.

Método D:

El compuesto 57 (102 mg) se colocó en un tubo de vidrio Pyrex y se disolvió con 5 ml de piridina, se agregaron 0,2 ml de oxicloruro de fósforo y se cerró el tubo a la llama. Se calentó en un horno tubular eléctrico a 150°C durante 90 minutos con agitación ocasional. Se rompió el tubo y se volcó el contenido sobre una solución de ácido clorhídrico en agua (10:40 ml). Se extrajo con cloruro de metileno y se lavó el extracto con agua hasta neutralidad de la fase acuosa. El extracto orgánico se secó y se evaporó el sol-

vente.

Se obtuvieron 94 mg de producto impuro con aproximadamente 50% del compuesto buscado 58 según se observó por ccd.

El compuesto se purificó por ccd preparativa sobre silicagel, obteniéndose 50 mg del mismo.

Se recristalizó de etanol y los cristales obtenidos tenían un p.f. 204-206°C (lit.[54] : 206°C).

IR (cm^{-1}): 2210 (C≡N), 1745 (C=O, éster), 1260 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,95 (s, 3H, CH_3-18), 1,07 (s, 3H, CH_3-19), 2,02 (s, 3H, CH_3COO-), 4,60 (m, 1H, H-3), 5,40 (m, 1H, H-6), 6,60 (m, 1H, H-16).

EM, m/z(%): 279 (M - AcOH, 100), 264 (M - AcOH - CH_3, 39), 105 (anillo D + CH_3-18 + CN, 27).

3β,17ξ-Diacetoxiandrost-5-en-17ξ-carbonitrilo (57a).

3β-Acetoxi-17ξ-hidroxiandrost-5-en-17ξ-carbonitrilo (57) (60 mg) se disolvió en 4 ml de anhídrido acético y se calentó a reflujo durante 24 hs.

Por ccd se comprobó que la cianhidrina de partida había reaccionado completamente.

Se evaporó el anhídrido acético a presión reducida con la ayuda de agregados de etanol (5 ml cada vez), obteniéndose 65 mg de producto impuro, que fueron purificados por ccd preparativa sobre silicagel, lográndose 34 mg de un producto esencialmente puro (57a). Luego de recristalizado de etanol acuoso dicho producto tenía p.f. 207-209°C (lit.[103]:203-206°C, para el AcO-17β)

IR (cm^{-1}): 1745 (C=O, éster), 1720 (C=O, éster), 1245 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,91 (s, 3H, CH_3-18), 1,04 (s, 3H, CH_3-19), 2,03 (s, 3H, CH_3COO- en

C-3), 2,10 (s, 3H, CH_3COO- en C-17), 4,59 (m, 1H, H-3), 5,38 (m, 1H, H-6).

EM, m/z(%): 339 (M - AcOH, 100), 324 (M - AcOH - CH_3, 12), 297 (M - AcOH - 42(CH_2CO o CH_3+CNH), 5), 282 (M - AcOH - 42 - CH_3, 5), 279 (M - 2AcOH, 10), 264 (M - 2AcOH - CH_3, 12), 237 (M - 2AcOH - CH_3 - CNH, 5), 213 (M - AcOH - cad. lat. - anillo D - H, 6).

3β-Hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (59).

3β-Acetoxiandrosta-5,16-dien-17-carbonitrilo (58) (80 mg) se disolvió en 1,5 ml de benceno anhidro y la solución se agregó lentamente con jeringa a través de un tapón de látex al reactivo de Grignard preparado de la siguiente manera: en un balón de tres bocas (una con tapón de látex, otra con un refrigerante conectado a una corriente de nitrógeno seco y con un cierre de mercurio, y la tercera boca con un burbujeador para entrada de bromuro de metilo secado a través de pasaje por hidróxido de potasio) se colocaron 750 mg de virutas de magnesio, un cristalito de iodo y 20 ml de éter etílico anhidro; con el magnesio, el iodo y el éter en ambiente de nitrógeno con agitación y enfriando externamente con hielo, se comenzó el burbujeo de bromuro de metilo seco proveniente de un tubo que se colocó a temperatura ambiente (p.e. CH_3Br = 4°C); luego de 2 hs de burbujeo lento se observó que había reaccionado todo el magnesio; la reacción fue enérgica y se observó reflujo de éter; cuando cesó, la solución era gris oscura y turbia; entonces se llevó a temperatura ambiente y se inyectó el esteroide disuelto en benceno anhidro.

La mezcla de reacción se calentó a reflujo por 46 hs, se enfrió a 0°C

y se agregaron 6 ml de ácido acético lentamente y luego 9 ml de agua. Se evaporaron los solventes más volátiles a presión reducida. Se calentó a reflujo durante 20 minutos y se volcó sobre hielo picado. Se extrajo con cloruro de metileno (3 x 30 ml); el extracto orgánico se lavó con agua (3 x 30 ml) y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvo un producto impuro (80 mg) que se recristalizó de etanol dando 43 mg del producto deseado (59) con p.f. 205-207°C (lit.[54] : 216°C)

IR (cm^{-1}): 3600-3100 (O-H), 1660 (C=O, cetona conjugada), 1590 (C=C conj.).

RMN-^{1}H: δ 0,92 (s, 3H, CH_3-18), 1,05 (s, 3H, CH_3-19), 2,06 (s, 3H, CH_3-21), 3,48 (m, 1H, H-3), 5,34 (m, 1H, H-6), 6,68 (m, 1H, H-16).

RMN-^{13}C: δ 36,6 (C-1), 30,2 (C-2), 71,6 (C-3), 42,3 (C-4), 141,2 (C-5), 120,8 (C-6), 31,5 (C-7 ó C-8), 31,6 (C-8 ó C-7), 50,4 (C-9), 37,1 (C-10), 20,7 (C-11), 34,6 (C-12), 46,0 (C-13), 56,4 (C-14), 32,2 (C-15), 155,2 (C-16), 144,2 (C-17), 15,7 (C-18), 19,3 (C-19), 196,5 (C-20), 27,1 (C-21).

EM, m/z(%): 314 (M, 100), 299 (M - CH_3, 35), 296 (M - H_2O, 25), 281 (M - CH_3 - H_2O, 32), 271 (M - CH_3CO, 15), 253 (M - H_2O - CH_3CO, 13), 239 (M - H_2O - CH_3CO - CH_3 + H, 6), 229 (M - anillo A - CH_3 + 2H, 23), 203 (M - H_2O - C_7H_9, 32)

3β-Acetoxi-5β-androstan-17-ona (61).

3β-Hidroxi-5β-androstan-17-ona (60) (500 mg) se disolvió en 3ml de piridina anhidra y se agregaron 3 ml de anhídrido acético; se dejó 20 hs en reposo y luego se volcó sobre ácido clorhídrico acuoso (6 ml de HCl (c) en 40 ml de agua); se extrajo con cloruro de metileno (3 x 50 ml), se lavó el

extracto orgánico con agua hasta pH neutro (3 x 50 ml) y se secó. Por evaporación del solvente se obtuvieron 570 mg de producto puro por ccd, que recristalizado de etanol tuvo un p.f. 160°C (lit.[104]: 161-163°C)

IR (cm^{-1}): 1740 (C=O, éster), 1700 (C=O, cetona), 1250 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,88 (s, 3H, CH_3-18), 1,01 (s, 3H, CH_3-19), 2,05 (s, 3H, CH_3COO-), 5,10 (m, 1H, H-3)

RMN-^{13}C: δ 30,5 (C-1 ó C-4), 24,9 (C-2), 70,3 (C-3), 30,7 (C-4 ó C-1), 37,3 (C-5), 26,2 (C-6), 25,0 (C-7), 35,0 (C-8 ó C-10), 40,2 (C-9), 35,2 (C-10 ó C-8), 20,3 (C-11), 31,7 (C-12), 47,7 (C-13), 51,4 (C-14), 21,7 (C-15), 35,8 (C-16), 223,9 (C-17), 13,8 (C-18), 23,7 (C-19), 21,4 ($\underline{C}H_3COOR$), 170,2 ($CH_3\underline{C}OOR$).

EM, m/z(%): 332 (M, 6), 272 (M - AcOH, 100), 257 (M - AcOH - CH_3, 44), 244 (M - AcOH - 28(CO o C_2H_4), 20), 239 (M - AcOH - CH_3 - H_2O, 6), 230 (M - AcOH - CH_2CO, 6), 229 (M - AcOH - 28 - CH_3, 6), 228 (M - AcOH - CH_2CO - 2H, 4), 218 (M - AcOH - C_4H_6, 7), 216 (M - AcOH - anillo D, 17), 215 (M - AcOH - anillo D - H, 17), 213 (M - AcOH - CH_3 - CH_2CO - 2H, 9), 201 (M - AcOH - anillo D - CH_3, 13).

3β-Acetoxi-17ξ-hidroxi-5β-androstan-17ξ-carbonitrilo (62).

Siguiendo la técnica que se indica en la síntesis del compuesto 57, método F (pág. 144) y utilizando en este caso 202 mg de 3β-acetoxi-5β-androstan-17-ona (61), 79 mg de cianuro de sodio (relación 2,5:1 de cianuro de sodio a esteroide) y 0,7 ml de ácido acético en 8 ml de etanol, se obtuvieron 219 mg de producto (mezcla epimérica en C-17) con aproximadamente 80% del compuesto buscado (62) según se determinó por ccd, que no fueron purificados.

P.f.: 139-160°C (lit.[104]: isómero 17β hidroxilado, 192°C; isómero 17α hidroxilado, 224°C).

IR (cm^{-1}): 3350 (O-H), 2210 (C≡N), 1740 (C=O, éster), 1700 (C=O, cetona).

RMN-^{1}H: δ 0,86 (s, 3H, CH_3-18), 0,99 (s, 3H, CH_3-19), 2,05 (s, 3H, CH_3COO-), 5,09 (m, 1H, H-3).

EM, m/z(%): 359 (M, 2), 332 (M - CNH, 6), 299 (M - AcOH, 75), 284 (M - AcOH - CH_3, 35), 272 (M - AcOH - CNH, 100), 257 (M - AcOH - CNH - CH_3, 58), 244 (M - AcOH - CNH - 28(CO o C_2H_4), 27), 230 (M - AcOH - CNH - CH_2CO, 13), 229 (M - AcOH - CNH - 28 - CH_3, 11), 228 (M - AcOH - CNH - CH_2CO - 2H, 8), 218 (M - AcOH - CNH - C_4H_6, 11), 216 (M - AcOH - CNH - anillo D, 30), 215 (M - AcOH - CNH - anillo D - H, 60), 213 (M - AcOH - CNH - CH_2CO - 2H, 15), 201 (M - AcOH - CNH - anillo D - CH_3, 23).

3β,17ξ-Diacetoxi-5β-androstan-17ξ-carbonitrilo (62a).

Método A:

3β-Acetoxi-17ξ-hidroxi-5β-androstan-17ξ-carbonitrilo (62) (30 mg) se disolvió en 3 ml de anhídrido acético y se calentó a reflujo durante 20 hs. Se evaporó el anhídrido acético a presión reducida (con agregado de etanol) obteniéndose 35 mg de material crudo, que se recristalizó de etanol acuoso dando un p.f. 197-200°C (lit.[104]: 199-201).

RMN-^{1}H: δ 0,89 (s, 3H, CH_3-18), 0,99 (s, 3H, CH_3-19), 2,05 (s, 3H, CH_3COO- en C-3), 2,10 (s, 3H, CH_3COO- en C-17), 5,10 (m, 1H, H-3).

RMN-^{13}C: δ 30,5 (C-1), 25,0 (C-2), 70,5 (C-3), 30,8 (C-4), 37,2 (C-5), 25,7 (C-6), 26,2 (C-7), 35,7 (C-8), 39,4 (C-9), 34,9 (C-10), 20,7 (C-11),

33,9 (C-12), 47,7 (C-13), 49,3 (C-14), 23,6 (C-15), 35,9 (C-16), 82,8 (C-17), 13,1 (C-18), 23,7 (C-19), 118,6 (C-20), 21,5 y 20,6 ($\underline{C}H_3COOR$), 170,4 y 168,9 ($CH_3\underline{C}OOR$).

EM, m/z(%): 341 (M - AcOH, 69), 326 (M - AcOH - CH_3, 25), 299 (M - AcOH - CNH - CH_3, 18), 287 (M - AcOH - C_4H_6, 9), 281 (M - 2AcOH, 7), 272 (M - AcOH - CH_2CO - CNH, 9), 257 (M - AcOH - CH_2CO - CNH - CH_3, 30), 244 (M - AcOH - CH_2CO - CNH - 28(CO o C_2H_4), 11), 215 (M - AcOH - cad. lat. - anillo D - H, 32), 201 (M - AcOH - cad. lat. - anillo D - CH_3, 15), 57 (C_4H_9, 100).

Método B:

El compuesto 62 (27 mg) se disolvió en 2 ml de anhídrido acético y se le agregó 0,1 g de ácido *p*-toluensulfónico; se calentó a reflujo durante 3 hs, lapso durante el cual la mezcla de reacción se oscureció mucho.

Se volcó sobre agua, se agitó durante 15 minutos y se extrajo con cloruro de metileno (2 x 30 ml); el extracto orgánico se lavó con agua hasta neutralidad (3 x 30 ml) y se secó. Por ccd se observaron muchas manchas a lo largo de toda la placa, por lo que se descartó este método.

Método C:

Se usó el método B pero con ácido clorhídrico en lugar de ácido *p*-toluensulfónico y un reflujo de 22 hs en lugar de 3 hs.

Se obtuvo el compuesto buscado 62a con rendimiento similar al del método A.

3β-Acetoxi-5β-androst-16-en-17-carbonitrilo (63).

Método A:

3β-Acetoxi-17ξ-hidroxi-5β-androstan-17ξ-carbonitrilo (62) (33 mg) se disolvió en 2 ml de etanol, se le agregaron 0,2 ml de ácido clorhídrico (c) y se calentó a reflujo durante 1 hora.

Por ccd se comprobó que había desaparecido la cianhidrina de partida para dar un producto más polar que presentaba el siguiente espectro de RMN-^{1}H δ 0,85 (s, 3H, CH_3-18), 0,97 (s, 3H, CH_3-19), 4,10 (m, 1H, H-3).

Del espectro de RMN-^{1}H se comprueba que no hay señal de acetato ni de protones olefínicos; además los metilos 18 y 19 aparecen aproximadamente al mismo valor de desplazamiento químico que en el compuesto 62; todo esto indica que en el material de partida sólo se había hidrolizado el acetato en C-3 y que el hidroxilo terciario no se había eliminado, por lo que esta técnica se descartó.

Método B:

El diacetato 62a (20 mg) se sublimó en alto vacío (0,1 torr) y a 160°C pero el producto sublimado resultó sin variación como se comprobó por RMN-^{1}H, que mostró las dos señales para metilos de acetatos (δ = 2,05 y δ = 2,10).

Método C:

El diacetato 62a (12 mg) se trató con 50 mg de acetato de potasio y 0,8 ml de N,N-dimetilformamida calentando a 105°C durante 8 hs bajo atmósfera de nitrógeno [57]. Sólo se obtuvo el material de partida algo impurificado con un producto más polar según se observó por ccd. El RMN-^{1}H de la mezcla presentaba las dos señales de metilos (δ = 2,05 y δ = 2,10) de acetatos diferentes.

Método D:

El compuesto 62 (30 mg) se disolvió en 1,5 ml de cloruro de

metileno y se le agregó una solución de 0,05 ml de tribromuro de fósforo en 0,5 ml de cloruro de metileno. Se dejó a temperatura ambiente durante 15 hs.

Se observó por ccd la aparición de varias manchas, entre ellas la del material de partida, pero ninguna coincidente con la del producto buscado.

Método E:

El compuesto 62 (103 mg) se disolvió en 2 ml de piridina, se agregó 0,1 ml de oxicloruro de fósforo y la mezcla se calentó en un tubo cerrado a 150°C durante 30 minutos. Se volcó luego sobre ácido clorhídrico acuoso (4 ml de HCl(c) en 30 ml de agua) y se extrajo con cloruro de metileno (2 x 40 ml). El extracto se lavó con agua hasta neutralidad y se secó.

Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo (94 mg) que por ccd mostraba una mancha importante del producto deshidratado deseado 63. Se purificó dicho residuo por ccd preparativa de silicagel, aislándose 56 mg (aproximadamente 60% de rendimiento) de producto 63, que recristalizado de etanol tenía un p.f. 196-200°C (lit.[104]: 198-203°C).

IR (cm^{-1}): 2195 (C≡N), 1730 (C=O, éster), 1240 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,91 (s, 3H, CH_3-18), 1,01 (s, 3H, CH_3-19), 2,03 (s, 3H, CH_3COO-), 5,06 (m, 1H, H-3), 6,56 (dd, J=2 y J=3,5, 1H, H-16).

RMN-^{13}C: δ 30,6 (C-1), 25,0 (C-2), 70,4 (C-3), 30,6 (C-4), 37,3 (C-5), 26,1 (C-6), 26,3 (C-7), 35,1 (C-8), 40,4 (C-9), 35,1 (C-10), 20,8 (C-11), 32,8 (C-12), 48,3 (C-13), 56,0 (C-14), 35,1 (C-15), 147,0 (C-16), 127,5 (C-17), 16,30 (C-18), 23,7 (C-19), ~120 (C-20, enmascarado con fondo), 21,4 ($\underline{C}H_3COOR$), 170,4 ($CH_3\underline{C}OOR$).

EM, m/z(%): 341 (M, 1), 281 (M - AcOH, 89), 266 (M - AcOH - CH_3, 96), 240 (M - AcOH - CH_3 - CN, 14), 239 (M - AcOH - CH_3 - CNH, 15), 227 (M - AcOH - C_4H_6, 26), 212 (M - AcOH - C_4H_6 - CH_3, 58), 105 (100).

3β-Hidroxi-5β-pregn-16-en-20-ona (64).

Se empleó la técnica utilizada para obtener 3β-hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (59). Se partió de 58 mg del compuesto 63 disueltos en 1,5 ml de benceno anhidro que se inyectaron al balón con el bromuro de metilmagnesio en éter etílico preparado como se indicó en dicha técnica (pág.147).

Se obtuvo un producto impuro que se cromatografió en columna de silicagel eluyendo con cloruro de metileno, para dar 47 mg (aproximadamente 80%) del producto deseado (64), que se recristalizó de etanol acuoso.

P.f.: 181-184°C (lit.[105]: 188-190°C).

IR (cm^{-1}): 3400 (O-H), 1670 (C=O, cetona conj.), 1590 (C=C, conj.).

RMN-^{1}H: δ 0,88 (s, 3H, CH_3-18), 1,00 (s, 3H, CH_3-19), 2,03 (s, 3H, CH_3-21), 4,07 (m, 1H, H-3), 6,62 (dd, J=1 y J=1,5, 1H, H-16).

RMN-^{13}C: δ 29,8 (C-1), 27,8 (C-2), 67,0 (C-3), 33,5 (C-4), 36,6 (C-5), 26,3 (C-6), 26,7 (C-7), 35,3 (C-8), 40,3 (C-9), 35,0 (C-10), 20,9 (C-11), 34,0 (C-12), 46,4 (C-13), 56,6 (C-14), 32,2 (C-15), 155,4 (C-16), 144,3 (C-17), 15,9 (C-18), 23,8 (C-19), 196,6 (C-20), 27,1 (C-21).

EM, m/z(%): 316 (M, 88), 301 (M - CH_3, 19), 283 (M - CH_3 - H_2O, 31), 273 (M - CH_3CO, 72), 255 (M - CH_3CO - H_2O, 39), 201 (M - H_2O - CH_3CO - anillo D - CH_3, 7), 43 (CH_3CO, 100).

3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (65).

El compuesto 64 (25 mg) se disolvió en 10 ml de acetato de etilo y se hidrogenó con paladio 10% sobre carbón por 12 hs a temperatura ambiente y presión atmosférica. Se filtró para eliminar el catalizador y se lavó éste

con acetato de etilo.

Por evaporación del solvente se obtuvieron 25 mg de producto esencialmente puro por ccd, que se recristalizó de etanol acuoso, dando un p.f. 141,5 -144°C (lit.[106]: 149°C).

IR (cm^{-1}): 3250 (O-H), 1700 (C=O).

RMN-^{1}H: δ 0,62 (s, 3H, CH_3-18), 0,97 (s, 3H, CH_3-19), 2,11 (s, 3H, CH_3-21), 4,13 (m, 1H, H-3).

RMN-^{13}C: δ 30,0 (C-1), 27,9 (C-2), 66,9 (C-3), 33,5 (C-4), 36,4 (C-5), 26,0 (C-6), 26,3 (C-7), 35,7 (C-8), 39,8 (C-9), 35,7 (C-10), 21,0 (C-11), 39,3 (C-12), 44,4 (C-13), 56,8 (C-14), 24,5 (C-15), 22,9 (C-16), 64,0 (C-17), 13,5 (C-18), 23,9 (C-19), 209,6 (C-20), 31,5 (C-21).

EM, m/z(%): 318 (M, 57), 303 (M - CH_3, 24), 300 (M - H_2O, 94), 285 (M - H_2O - CH_3, 30), 275 (M - CH_3CO, 5), 260 (M - CH_3 - CH_3CO, 12), 257 (M - H_2O - CH_3CO, 21), 242 (M - H_2O - CH_3 - CH_3CO, 11), 233 (M - CH_3CO - anillo D - H, 26), 215 (M - H_2O - CH_3CO - anillo D - H, 62), 201 (M - H_2O - CH_3CO - anillo D - CH_3, 9), 43 (CH_3CO, 100).

[20-^{14}C] 3β-Acetoxi-17ξ-hidroxi-5β-androstan-17ξ-carbonitrilo (66).

Se usó la técnica indicada para la síntesis del compuesto inactivo 57, método F (pág. 144). En este caso se usaron 200 mg de 3β-acetoxi-5β-androstan-17-ona (61), una mezcla de 99 mg de cianuro de potasio y 1,06 mg de [^{14}C] cianuro de potasio (1 mCi) y 0,7 ml de ácido acético en 3 ml de etanol.

Se obtuvieron 198 mg de producto con propiedades físicas (IR, EM) idénticas a aquéllas del producto no marcado (62) y con una actividad específica de 0,65 mCi/mmol.

|20-^{14}C| 3β-Acetoxi-5β-androst-16-en-17-carbonitrilo (67).

Se utilizó la técnica descripta para la síntesis del compuesto 63, método E (pág. 153). El compuesto 66 (190 mg) se disolvió en 4 ml de piridina anhidra; se trató con 0,2 ml de oxicloruro de fósforo y la mezcla se calentó en tubo cerrado a 150°C durante 30 minutos. El producto se extrajo de la manera indicada en la técnica mencionada.

Se obtuvo un residuo de 187 mg que se purificó a través de una columna con silicagel, dando el producto buscado (67) (164 mg) con propiedades físicas (IR, EM) idénticas a aquéllas de una muestra no marcada (63) y con una actividad específica de 0,66 mCi/mmol.

|20-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregn-16-en-20-ona (68).

Siguiendo la técnica utilizada para obtener el compuesto inactivo 59, se preparó una solución de ioduro de metilmagnesio a partir de 1,5 g de magnesio, 0,1 mg de iodo y 4,4 ml de ioduro de metilo en 25 ml de éter etílico anhidro. A esa solución se le añadieron 158 mg del compuesto 67 disueltos en 3 ml de benceno. La mezcla se reflujó durante 48 hs y el producto se extrajo como se indicó en la técnica antes mencionada (pág. 147). El residuo obtenido se purificó por una columna de silicagel eluyendo con benceno y benceno-acetato de etilo (95:5 y 90:10). Se obtuvo el producto 68 puro, de p.f. 170-173°C que resultó indistinguible por IR y por EM de una muestra auténtica de 64 y con una actividad específica de 0,66 mCi/mmol.

|20-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (69).

El compuesto 68 (93,5 mg) se disolvió en 20 ml de acetato de etilo y se hidrogenó con la técnica utilizada para el producto 65 (pág. 154).

Se obtuvieron así 93 mg del producto buscado 69 que se recristalizaron de etanol acuoso. Dicho producto era homogéneo por ccd y tenía p.f. 141-144°C con propiedades físicas (IR, EM) idénticas a aquéllas de una muestra no marcada (65) y con una actividad específica de 0,65 mCi/mmol.

3β,21-Diacetoxipregn-5-en-20-ona (70).

A 1,000 g de 3β-acetoxipregn-5-en-20-ona (75) (acetato de pregnenolona) se le agregó una solución de 4,000 g de tetraacetato de plomo en 45 ml de benceno, 3 ml de metanol y 8 ml de eterato de trifluoruro de boro. El balón con la mezcla de reacción se mantuvo cerrado durante 17 hs a temperatura ambiente y con agitación. Se volcó el contenido sobre 100 ml de agua, se extrajo con benceno (3 x 40 ml), el extracto orgánico se lavó con agua y se secó.

Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo (1,180 g) con una conversión en 70 de aproximadamente 90% según se observó por ccd.

Se recristalizó de etanol, obteniéndose 800 mg del producto 70 con p.f. 151-155°C (lit.[107] : 165-167°C).

IR (cm^{-1}): 1750 (C=O, éster), 1720 (C=O, cetona), 1250 (C-O, acetato), 1245 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,68 (s, 3H, CH_3-18), 1,03 (s, 3H, CH_3-19), 2,04 (s, 3H, CH_3COO- en C-3), 2,17 (s, 3H, CH_3COO- en C-21), 4,60 (m, 1H, H-3), 4,52 (d, J= 16, 1H, H-21), 4,75 (d, J=16, 1H, H-21), 5,28 (m, 1H, H-6).

RMN-^{13}C: δ 38,0 (C-1), 27,7 (C-2), 73,7 (C-3), 38,5 (C-4), 139,5 (C-5), 122,0 (C-6), 31,7 (C-7 ó C-8), 31,8 (C-8 ó C-7), 49,8 (C-9), 37,0 (C-10), 20,5 (C-11), 36,6 (C-12), 44,6 (C-13), 56,9 (C-14), 24,6 (C-15), 22,9 (C-16), 59,2 (C-17), 13,1 (C-18), 19,3 (C-19), 203,4 (C-20), 69,1 (C-21), 21,4 y 21,0 ($\underline{CH_3}COOR$), 170,2 y 170,0 ($CH_3\underline{COOR}$).

EM, m/z(%): 416 (M, 1), 356 (M - AcOH, 100), 341 (M - AcOH - CH_3, 9), 282 (M - AcOH - CH_2OCOCH_3 + H, 17), 255 (M - AcOH - cad. lat., 56).

3β,21-Dihidroxipregn-5-en-20-ona (71).

El compuesto 70 (700 mg) se disolvió en 50 ml de etanol caliente y se agregó 0,1 ml de ácido sulfúrico (c). Se calentó a reflujo durante 16 hs y se volcó sobre 150 ml de agua. Se extrajo con éter etílico (2 x 50 ml), el extracto se lavó con agua (3 x 50 ml) y se secó.

Por evaporación del solvente se obtuvieron 551 mg de residuo, que luego de dos recristalizaciones con etanol produjeron 470 mg de producto 71 puro por ccd, con p.f. 165-167°C (lit.[108] : 155-160°C).

IR (cm^{-1}): 3500-3200 (O-H), 1710 (C=O).

RMN-^{1}H (Cl_3CD + MeOD, TMS): δ 0,66 (s, 3H, CH_3-18), 1,00 (s, 3H, CH_3-19), 3,40 (m, 1H, H-3), 4,16 (s, 2H, CH_2-21), 5,28 (m, 1H, H-6).

RMN-^{13}C (Cl_3CD + MeOD, TMS): δ 38,5 (C-1), 31,3 (C-2), 71,4 (C-3), 42,0 (C-4), 140,7 (C-5), 121,1 (C-6), 31,8 (C-7 ó C-8), 32,0 (C-8 ó C-7), 49,9 (C-9), 37,2 (C-10), 21,0 (C-11), 36,5 (C-12), 44,7 (C-13), 56,9 (C-14), 24,6 (C-15), 22,9 (C-16), 59,2 (C-17), 13,3 (C-18), 19,4 (C-19), 210,1 (C-20), 69,2 (C-21).

EM, m/z(%): 332 (M, 39), 314 (M - H_2O, 5), 301 (M - CH_2OH, 81), 273 (M - cad.

lat., 11), 255 (M - H_2O - cad. lat., 84), 213 (M - H_2O - cad. lat. - anillo D - H, 12), 84 (100).

Acido 3β-hidroxiandrost-5-en-17β-carboxílico (72).

El compuesto 71 (200 mg) se disolvió en 20 ml de metanol y se agregó una solución de 800 mg de periodato de sodio en 8 ml de agua. La solución, dejada a temperatura ambiente con agitación, se enturbió en menos de 5 minutos y luego apareció un precipitado. Se dejó 2 hs en total, luego se volcó sobre 50 ml de agua, se extrajo con cloruro de metileno (3 x 50 ml), el extracto se lavó con agua (2 x 50 ml) y se secó.

Evaporando el solvente se obtuvieron 170 mg de producto 72 que demostraron ser homogéneos por ccd. Se recristalizó de etanol obteniéndose un p.f. 269-271,5°C (lit.[109] : 270-275°C).

IR (cm^{-1}): 3500-2600 (O-H, ácido), 1710 (C=O, ácido dímero).

RMN-^{1}H (piridina-d5, TMS): δ 0,94 (s, 3H, CH_3-18), 1,04 (s, 3H, CH_3-19), 3,84 (m, 1H, H-3), 5,42 (m, 1H, H-6).

RMN-^{13}C (Cl_3CD + MeOD, TMS): δ 38,3 (C-1), 31,3 (C-2), 71,4 (C-3), 42,0 (C-4), 141,0 (C-5), 121,3 (C-6), 32,0 (C-7 ó C-8), 32,2 (C-8 ó C-7), 50,3 (C-9), 37,5 (C-10), 21,1 (C-11), 36,7 (C-12), 43,9 (C-13), 56,4 (C-14), 24,7 (C-15), 23,8 (C-16), 55,3 (C-17), 13,2 (C-18), 19,5 (C-19), 176,7 (C-20).

EM, m/z(%): 318 (M, 100), 303 (M - CH_3, 20), 300 (M - H_2O, 93), 285 (M - H_2O - CH_3, 97), 261 (M - CHCOOH + H, 12), 258 (M - CH_3 - COOH, 14), 233 (M - COOH - anillo D + H, 80), 213 (M - H_2O - COOH - anillo D - H, 12).

Anhídrido mixto acético y 3β-acetoxiandrost-5-en-17β-carboxílico (72a).

El compuesto 72 (50 mg) se suspendió en 5 ml de anhídrido acético, se agregaron 2 gotas de ácido clorhídrico (c) y se calentó a reflujo durante 1 hora. Se volcó sobre 50 ml de agua, se agitó 10 minutos y se extrajo con cloruro de metileno (2 x 30 ml). El extracto orgánico se lavó con agua (3 x 30 ml), se secó y se evaporó el solvente.

Por ccd del residuo se observó más que 95% de conversión en un producto menos polar que el de partida, que se recristalizó de benceno-éter de petróleo dando p.f. 253-254°C.

IR (cm^{-1}): 1805 y 1750 (C=O, anhídrido), 1735 (C=O, éster), 1250 (C-O, acetato).

EM, m/z(%): 343 (M - AcO, 66), 342 (M - AcOH, 99), 327 (M - AcOH - CH_3, 22), 300 (M - AcO - CH_3CO, 24), 299 (M - AcOH - CH_3CO, 17), 285 (M - AcO - CH_3CO - CH_3, 21), 255 (M - AcOH - cad. lat., 17), 254 (M - AcOH - cad. lat. - H, 20), 239 (M - AcOH - cad. lat. - H - CH_3, 18), 43 (CH_3CO, 100).

Acido 3β-acetoxiandrost-5-en-17β-carboxílico (73).

Método A:

El anhídrido mixto 72a (30 mg) se suspendió en 2 ml de piridina y 2 ml de agua y se calentó a 90°C por 3 hs.

Por ccd se determinó que el reactivo de partida no se había modificado.

Método B:

El ácido 72 (100 mg) se disolvió en 1 ml de piridina, se agre-

gó 1 ml de anhídrido acético y se dejó en oscuridad durante 20 hs a temperatura ambiente. Se volcó sobre 10 ml de ácido clorhídrico diluido (2 ml de HCl (c) en 8 ml de agua), se agitó 10 minutos y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 20 ml). El extracto se lavó con agua (4 x 30 ml), se secó y por evaporación del solvente se obtuvo un residuo que mostró por ccd dos manchas de menor polaridad que el compuesto de partida 72. Como la acetilación debería dar un producto fundamentalmente, se desechó esta técnica.

Método C:

Se usó la misma técnica que en el método B, pero menor cantidad (0,2 ml) de anhídrido acético. El resultado fue el mismo: dos productos menos polares que el de partida.

Método D:

Se usó la misma técnica pero con 0,1 ml de anhídrido acético. El resultado fue similar, pero en este caso había además un producto minoritario de igual Rf que el de partida, indicando una reacción incompleta.

Método E:

Se repitió la técnica B, pero con los siguientes reactivos: 0,5 ml de piridina, 0,5 ml de ácido acético y 0,5 ml de anhídrido acético. El resultado obtenido fue semejante al de los ensayos B y C.

Método F:

El compuesto 72 (100 mg) se disolvió en 10 ml de ácido acético caliente y se mantuvo a reflujo durante 72 hs.

Se volcó sobre agua (50 ml), se extrajo con cloruro de metileno (2 x 30 ml), el extracto se lavó con agua (4 x 30 ml) y se secó.

El producto obtenido por evaporación del solvente resultó ser el compuesto 73 puro por ccd, que se recristalizó de etanol dando un p.f. 248-250°C (lit.[110]: 241-242°C).

IR (cm^{-1}): 3300-2400 (O-H, ácido), 1735 (C=O, éster), 1710 (C=O, ácido dímero), 1260 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,76 (s, 3H, CH_3-18), 1,04 (s, 3H, CH_3-19), 2,05 (s, 3H, CH_3COO-), 4,68 (m, 1H, H-3), 5,45 (m, 1H, H-6), 9,90 (ba, 1H, COOH).

RMN-^{13}C (Cl_3CD + MeOD, TMS): δ 38,0 (C-1), 27,7 (C-2), 74,0 (C-3), 38,0 (C-4), 139,5 (C-5), 122,1 (C-6), 31,8 (C-7 ó C-8), 32,0 (C-8 ó C-7), 50,0 (C-9), 37,0 (C-10), 20,9 (C-11), 36,6 (C-12), 43,8 (C-13), 56,1 (C-14), 24,5 (C-15), 23,5 (C-16), 55,0 (C-17), 13,0 (C-18), 19,3 (C-19), 177,3 (C-20), 21,3 ($\underline{C}H_3COOR$), 170,7 ($CH_3\underline{C}OOR$).

EM, m/z(%): 300 (M - AcOH, 100), 285 (M - AcOH - CH_3, 31), 213 (M - AcOH - COOH - anillo D - H, 4).

Cloruro de 3β-acetoxiandrost-5-en-17β-carboxililo (74).

El compuesto 73 (180 mg) se suspendió en 2 ml de benceno anhidro y se le agregó una solución de 1 ml de cloruro de oxalilo en 2 ml de benceno anhidro.

Se dejó en reposo, tapado y a temperatura ambiente durante 2 hs. Se evaporó a sequedad a presión reducida y se completó el secado utilizando alto vacío.

El producto así obtenido (74) se utilizó sin posterior purificación.

IR (cm^{-1}): 1795 (C=O, cloruro de ácido), 1735 (C=O, éster), 1250 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,74 (s, 3H, CH_3-18), 0,97 (s, 3H, CH_3-19), 1,97 (s, 3H, CH_3COO-), 2,81 (t, J=9, 1H, H-17), 4,55 (m, 1H, H-3), 5,30 (m, 1H, H-6).

EM, m/z(%): 320 y 318 (M - AcOH, 34 y 100), 305 y 303 (M - AcOH - CH_3, 7 y 21), 267 (M - AcOH - CH_3 - HCl, 9), 255 (M - AcOH - COCl, 10),

254 (M - AcOH - COCl - H, 9), 239 (M - AcOH - CH_3 - COCl - H, 10).

3β-Acetoxipregn-5-en-20-ona (75). (Acetato de pregnenolona).

Método A:

a) Preparación del ioduro de metilmagnesio.

En un tubo de 20 cm de largo por 10 mm de diámetro con un esmeril macho Ŝ 14/26, se colocaron 15 mg de magnesio previamente desengrasados con éter y se agregó una barrita magnética. Se secó en estufa a 110°C durante 1 hr y se tapó el tubo con un tapón de látex. Se hizo vacío dentro del tubo a través de una aguja inyectada en el tapón. Una vez retirada la aguja, se inyectó 1 ml de éter etílico anhidro y luego 33 µl de ioduro de metilo (previamente secado por pasaje a través de una columna de alúmina neutra de 30 cm de largo).

Se mantuvo con agitación y a temperatura ambiente 1 hora durante la cual se consumió la mayor parte del magnesio, resultando una solución turbia de color gris claro.

b) Preparación del dimetilcadmio.

En un balón se colocaron 220 mg de cloruro de cadmio anhidro y una barrita magnética. Se tapó con un tapón de látex, se hizo vacío dentro del balón y se agregó 1 ml de éter etílico anhidro.

Al tubo que contenía la solución de ioduro de metilmagnesio se le inyectó nitrógeno seco y se extrajo la solución con jeringa, para inyectarla inmediatamente en el balón con cloruro de cadmio. La mezcla de reacción se dejó durante 2 hs a temperatura ambiente para completar la formación de dimetilcadmio.

c) Reacción del dimetilcadmio con el cloruro de 3β-acetoxiandrost-5-en-17β-carboxililo (74).

A la solución de dimetilcadmio que contenía cloruro de cadmio en exceso sin disolver, se le inyectó éter etílico anhidro (2 ml) y luego una solución bencénica del cloruro de ácido 74 (189 mg en 1 ml de benceno anhidro).

Se mantuvo la reacción a temperatura ambiente con agitación durante 18 hs y luego se calentó cuidadosamente a 50°C durante 1 hora.

Se volcó sobre 20 ml de ácido clorhídrico acuoso (1:10) y se extrajo con cloruro de metileno (2 x 30 ml); el extracto se lavó con agua (2 x 30 ml) y se secó.

Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo que contenía aproximadamente 40-50% del producto buscado (75) según se determinó por ccd. Se cromatografió en columna de silicagel obteniéndose el producto 75 puro (67 mg).

P.f. 147-149°C (etanol) (lit.[111]: 146-148°C).

IR (cm^{-1}): 1735 (C=O, éster), 1705 (C=O, cetona), 1240 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,64 (s, 3H, CH_3-18), 1,03 (s, 3H, CH_3-19), 2,03 (s, 3H, CH_3COO-), 2,14 (s, 3H, CH_3-21), 4,60 (m, 1H, H-3), 5,42 (m, 1H, H-6).

EM, m/z(%): 299 (M - AcO, 54), 298 (M - AcOH, 100), 283 (M - AcOH - CH_3, 30), 255 (M - AcOH - $COCH_3$, 13), 213 (M - AcOH - $COCH_3$ - anillo D - H, 20).

Pureza por cgl: mayor que 99,6% (columna rellena con fase OV-17 3%).

Método B:

a) Preparación del ioduro de metilmagnesio.

Se hizo utilizando la misma técnica y la misma cantidad de cada uno de los reactivos que en el método A,a (pág. anterior).

b) Preparación del ioduro manganoso anhidro.

En un balón se colocaron 550 mg de manganeso en polvo, 2,54 g de iodo, se tapó con un tapón de látex, se hizo vacío a través del tapón, se inyectaron 10 ml de éter etílico anhidro y se dejó a temperatura ambiente durante una noche; la reacción fue exotérmica inicialmente y se observó desaparición del color metálico del manganeso y aparición de una sal rosada. Se inyectó nitrógeno seco, se extrajo el éter con jeringa, se secó utilizando vacío y se guardó seco, al vacío y en oscuridad.

c) Preparación del ioduro de metilmanganeso.

Se inyectó el reactivo de Grignard, preparado en a), a una suspensión de ioduro manganoso (170 mg) en 2 ml de éter etílico anhidro, contenida en un balón tapado con tapón de látex y previamente evacuado. Se agitó con una barrita magnética a temperatura ambiente durante 2 hs y se inyectaron 2 ml de éter etílico anhidro para diluir el ioduro de metilmanganeso formado.

d) Reacción del ioduro de metilmanganeso con el cloruro de ácido 74.

A la solución de ioduro de metilmanganeso recién preparada según c), se le inyectó una solución del cloruro de ácido 74 (190 mg) en 2 ml de benceno anhidro.

Se mantuvo la reacción a temperatura ambiente durante 18 hs. Se volcó sobre 20 ml de ácido clorhídrico acuoso (1:10) y se extrajo como en la técnica A,c (pág. anterior).

El residuo aislado mostró por ccd muy baja conversión en el compuesto buscado (75).

Método C:

Utilizando un tubo de 20 cm de largo por 10 mm de diámetro,

con esmeril macho ȝ 14/26, un adaptador de esmeril 14/26 a 10/30 y un tubo Kitasato de aproximadamente 10 ml de capacidad, con esmeril hembra ȝ 10/30, se diseñó un equipo de reacción como se indica en la figura 13a.

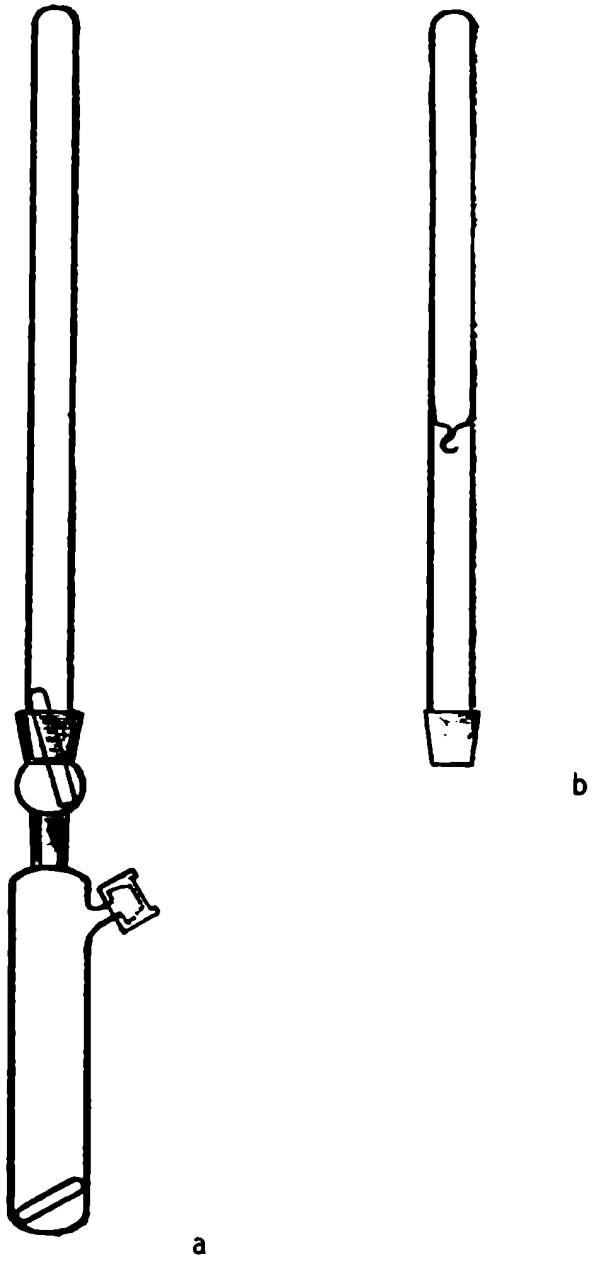


Figura 13: Equipo de reacción utilizado para la síntesis de las metilcetonas 75, 77 y 85 a partir de los correspondientes cloruros de ácidos.

a) Preparación del ioduro de metilmagnesio.

Se colocó magnesio (15 mg), desengrasado con éter etílico, en el fondo del tubo Kitasato y se secaron los componentes del equipo de reacción en estufa a 110°C durante 1 hora.

Se siliconaron los esmeriles y se armó el equipo de reacción.

Se efectuó vacío a través del tapón de látex y luego se inyectó una solución de 35 µl de ioduro de metilo (secado sobre pentóxido de fósforo) en 1 ml de éter etílico anhidro (destilado sobre sodio y sobre hidruro de aluminio y litio en el momento de usarse).

Se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos, observándose el consumo de casi todo el magnesio.

b) Preparación del dimetilcadmio.

Se destapó el tubo Kitasato empleado en a), por la parte superior en un ambiente de nitrógeno anhidro, se agregó rápidamente cloruro de cadmio anhidro (220 mg, molidos y secados a 110°C durante 1 día) a través de un embudo pequeño con esmeril Ŝ 10/30, se tapó nuevamente con un tapón de vidrio siliconado y se dejó 2 hs a temperatura ambiente con agitación.

c) Reacción del dimetilcadmio con el cloruro de 3β-acetoxiandrost-5-en-17β-carboxililo (74).

A la solución de dimetilcadmio en éter, se le inyectó a través del tapón de látex (de la salida lateral del tubo Kitasato) una solución del compuesto 74 (190 mg) en 2 ml de benceno anhidro.

Se mantuvo la suspensión a temperatura ambiente con agitación durante 18 hs y luego se calentó cuidadosamente a 50°C durante otra hora.

Se agregó ácido clorhídrico (c) (0,5 ml) gota a gota, enfriando y luego se agregó agua (2 ml). Se extrajo con cloruro de metileno (2 x 20 ml), se

lavó la fase orgánica con agua (2 x 20 ml) hasta neutralidad al papel indicador, se secó con sulfato de magnesio anhidro y se evaporó a sequedad.

El residuo obtenido (158,5 mg) contenía aproximadamente 50% del producto buscado (75) como se observó por ccd, estando el resto constituido fundamentalmente por otro producto más polar no identificado.

Dicho residuo impuro se cromatografió en columna de silicagel obteniéndose el compuesto 75 puro (70 mg).

Los datos de p.f. y características espectroscópicas fueron coincidentes con los obtenidos para el mismo compuesto, sintetizado por el método A (pág. 163).

Colesta-5,20(22)-dien-3β-ol (76).

a) Preparación del bromuro de isohexilo.

En un balón se colocó ácido bromhídrico 48% p/p (5,6 ml) con ácido sulfúrico (c) (1,4 ml), se añadió isohexanol (5 ml) y por último se añadió más ácido sulfúrico (c) (1,1 ml) lentamente y con agitación.

Se calentó a reflujo durante 6 hs y se destiló. Se separó la capa orgánica inmiscible con agua, se lavó primero con agua (5 ml), luego con ácido sulfúrico (c) (2 ml) y finalmente con una solución de carbonato de sodio acuoso al 10% (5 ml). Se secó durante 12 hs con una pequeña cantidad de cloruro de calcio anhidro (1%) y se destiló sobre pentóxido de fósforo, obteniéndose bromuro de isohexilo puro (4 ml).

P.e.: 145-147°C (lit.[112]: 147-148°C).

IR (cm^{-1}) en film: 2900 (C-H), 1475 (C-H), 1390 y 1370 (C-H, isopropilo).

RMN-^{1}H: δ 0,91 (d, J=5,5, 6H, $(CH_3)_2CH$), 3,34 (t, J=7, 2H, CH_2Br).

b) Preparación del bromuro de isohexilmagnesio.

Bromuro de isohexilo (0,5 ml) se añadió a una suspensión de magnesio (100 mg) en éter etílico anhidro (15 ml) en ambiente de nitrógeno seco.

Se calentó a ebullición y se mantuvo así, con agitación, durante 2 hs. Se observó la consumición de la mayor parte del magnesio y la formación de una solución gris.

c) Reacción del bromuro de isohexilmagnesio con acetato de pregnenolona (75).

3β-Acetoxipregn-5-en-20-ona (acetato de pregnenolona (75), 100 mg) se disolvió en benceno anhidro (2 ml) y se inyectó a la solución de Grignard preparada en b). Se formó inmediatamente una suspensión que se mantuvo a reflujo por 12 hs.

Se agregó ácido clorhídrico (c) (1,5 ml) gota a gota, enfriando y luego se añadió agua (20 ml). Se extrajo con cloruro de metileno (3 x 20 ml), lavó con agua hasta neutralidad (2 x 20 ml), secó con sulfato de magnesio anhidro y evaporó a sequedad.

El residuo crudo consistía de por lo menos 4 productos, todos más polares que el acetato de pregnenolona (75), según se estableció por ccd. El menos polar y mayoritario de los 4, se separó por columna de silicagel y se obtuvieron 52 mg, homogéneos por ccd, del producto buscado (76), el que por RMN-^{13}C demostró ser fundamentalmente el isómero E. Se recristalizó de etanol dando p.f. 98-103°C (lit.[113]: 135-138°C).

IR (cm^{-1}): 1730 (C=O, éster), 1240 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,55 (s, 3H, CH_3-18), 0,89 (d, J=7, 6H, CH_3-26 y CH_3-27), 1,01 (s, 3H, CH_3-19), 1,62 (s, 3H, CH_3-21), 3,50 (m, 1H, H-3), 5,12 (ta, J=7, 1H, H-22), 5,30 (m, 1H, H-6).

RMN-^{13}C: δ 37,3 (C-1), 31,7 (C-2 ó C-7 ó C-8), 71,7 (C-3), 42,3 (C-4), 140,7 (C-5), 121,5 (C-6), 31,9 (C-7 ó C-8 ó C-2), 32,2 (C-8 ó C-7 ó C-2), 50,4 (C-9), 36,6 (C-10), 21,1 (C-11), 39,2 (C-12), 43,4 (C-13), 56,2 (C-14), 24,3 (C-15), 27,7 (C-16), 58,9 (C-17), 12,9 (C-18), 19,4 (C-19), 133,8 (C-20), 17,82 (C-21), 125,7 (C-22), 24,7 (C-23), 38,7 (C-24), 27,9 (C-25), 22,6 (C-26), 22,6 (C-27).

EM, m/z(%): 384 (M, 95), 369 (M - CH_3, 40), 366 (M - H_2O, 20), 351 (M - CH_3 - H_2O, 50), 299 (M - H_2O - C_5H_7, 50), 273 (M - cad. lat., 10), 271 (M - cad. lat. - 2H, 100), 258 (M - H_2O - C_8H_{12}, 40), 253 (M - H_2O - cad. lat. - 2H, 60), 231 (M - cad. lat. - anillo D - H, 20), 229 (M - H_2O - cad. lat. - C_2H_3 + H, 30), 213 (M - H_2O - cad. lat. - anillo D - H, 30).

3β-Acetoxi-5β-pregnan-20-ona (77).

3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (65) (1,000 g) se acetiló en las condiciones usadas para obtener el compuesto 61 (pág. 148).

Se obtuvieron 1,126 g de producto 77 puro por ccd, que se recristalizaron de etanol, para dar un p.f. 117-120°C (lit.[114]: 121°C).

IR (cm^{-1}): 1735 (C=O, éster), 1700 (C=O, cetona), 1260 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,62 (s, 3H, CH_3-18), 0,98 (s, 3H, CH_3-19), 2,05 (s, 3H, CH_3COO-), 2,12 (s, 3H, CH_3-21), 5,10 (m, 1H, H-3).

RMN-^{13}C: δ 30,4 (C-1), 24,8 (C-2), 70,3 (C-3), 30,6 (C-4), 37,1 (C-5), 26,0 (C-6), 26,3 (C-7), 35,5 (C-8), 39,7 (C-9), 34,7 (C-10), 20,9 (C-11), 39,1 (C-12), 44,1 (C-13), 56,6 (C-14), 24,3 (C-15), 22,7 (C-16), 63,6 (C-17), 13,3 (C-18), 23,6 (C-19), 208,8 (C-20), 31,3 (C-21),

21,3 ($\underline{CH_3}COOR$), 170,1 ($CH_3\underline{C}OOR$).

EM, m/z(%): 360 (M, 1), 342 (M - H_2O, 2), 300 (M - AcOH, 100), 285 (M - AcOH - CH_3, 22), 257 (M - AcOH - $COCH_3$, 11), 246 (M - AcOH - C_4H_6, 6), 242 (M - AcOH - $COCH_3$ - CH_3, 9), 230 (M - AcOH - $CH_3COCHCH_2$, 19), 215 (M - AcOH - $COCH_3$ - anillo D - H, 32), 201 (M - AcOH - $COCH_3$ - anillo D - CH_3, 5).

3β,21-Diacetoxi-5β-pregnan-20-ona (78).

El compuesto 77 (550 mg) se trató con 2,5 g de tetraacetato de plomo en 25 ml de benceno anhidro, 1,5 ml de metanol y 4 ml de eterato de trifluoruro de boro, en las condiciones empleadas para obtener el compuesto 70 (pág. 157).

Se obtuvo un residuo que se cromatografió en columna de silicagel, dando 450 mg de producto 78 homogéneo por ccd, que se recristalizaron de etanol-agua; p.f.: 115-118°C (lit.[115]: 145-146°C).

IR (cm^{-1}): 1750 (C=O, éster), 1730 (C=O, éster), 1710 (C=O, cetona), 1250 y 1230 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,66 (s, 3H, CH_3-18), 0,98 (s, 3H, CH_3-19), 2,06 (s, 3H, CH_3COO- en C-3), 2,17 (s, 3H, CH_3COO- en C-21), 2,53 (t, J=8,5, 1H, H-17), 4,50 (d, J=17, 1H, H-21), 4,74 (d, J=17, 1H, H-21), 5,08 (m, 1H, H-3).

RMN-^{13}C: δ 30,6 (C-1), 25,0 (C-2), 70,5 (C-3), 30,7 (C-4), 37,2 (C-5), 26,1 (C-6), 26,4 (C-7), 35,6 (C-8), 38,9 (C-9), 34,9 (C-10), 20,4 (C-11), 39,8 (C-12), 45,0 (C-13), 56,9 (C-14), 24,5 (C-15), 22,6 (C-16), 59,4 (C-17), 13,3 (C-18), 23,7 (C-19), 203,4 (C-20), 69,1 (C-21), 21,4 y 21,0 ($\underline{CH_3}COOR$), 170,4 y 170,0 ($CH_3\underline{C}OOR$).

EM, m/z(%): 418 (M, 3), 358 (M - AcOH, 23), 345 (M - CH_2OAc, 88), 298 (M -

2AcOH, 8), 285 (M - AcOH - CH_2OAc, 9), 257 (M - AcOH - cad. lat., 98), 215 (M - AcOH - cad. lat. - anillo D - H, 6), 75 (100).

3β,21-Dihidroxi-5β-pregnan-20-ona (79).

El compuesto 78 (450 mg) se disolvió en 30 ml de etanol caliente y se agregó 0,1 ml de ácido sulfúrico (c). Se calentó a reflujo durante 16 hs y se volcó sobre 150 ml de agua. Se extrajo con éter etílico (2 x 50 ml), el extracto se lavó con agua (3 x 50 ml) y se secó.

Por evaporación del solvente se obtuvieron 335 mg de producto 79 puro por ccd, que se recristalizaron de etanol dando un p.f. 138-140°C.

IR (cm^{-1}): 3500-3200 (O-H), 1700 (C=O, cetona).

RMN-^{1}H: δ 0,63 (s, 3H, CH_3-18), 0,97 (s, 3H, CH_3-19), 3,30 (m, 1H, H-3), 4,18 (s, 2H, CH_2-21).

RMN-^{13}C: δ 29,9 (C-1), 27,7 (C-2), 69,3 (C-3), 33,4 (C-4), 36,4 (C-5), 26,2 (C-6), 26,5 (C-7), 35,6 (C-8), 39,7 (C-9), 35,1 (C-10), 21,0 (C-11), 38,9 (C-12), 45,0 (C-13), 56,8 (C-14), 24,5 (C-15), 23,8 (C-16), 59,4 (C-17), 13,5 (C-18), 23,0 (C-19), 210,1 (C-20), 66,9 (C-21).

EM, m/z(%): 334 (M, 1), 303 (M - CH_2OH, 100), 257 (M - H_2O - cad. lat., 99), 215 (M - H_2O - cad. lat. - anillo D - H, 4).

Acido 3β-hidroxi-5β-androstan-17β-carboxílico (80).

El compuesto 79 (500 mg) se disolvió en 50 ml de metanol y se agregó una solución de 2 g de periodato de sodio en 12 ml de agua. Esta solución, en las condiciones empleadas para obtener el producto 72 (pág. 159) condujo

al compuesto buscado 80 (420 mg), puro por ccd, que recristalizado de etanol dio un p.f. 240-242°C (lit.[116] : 226-228°C)

IR (cm^{-1}): 3500-2500 (O-H, ácido), 1700 (C=O, ácido dímero).

RMN-^{1}H (Cl_3CD + MeOD, TMS): δ 0,71 (s, 3H, CH_3-18), 0,97 (s, 3H, CH_3-19), 4,09 (m, 1H, H-3).

RMN-^{13}C (Cl_3CD + MeOD, TMS): δ 30,1 (C-1), 27,7 (C-2), 67,0 (C-3), 33,5 (C-4), 36,6 (C-5), 26,4 (C-6), 26,7 (C-7), 36,0 (C-8), 40,0 (C-9), 35,3 (C-10), 21,1 (C-11), 38,7 (C-12), 44,2 (C-13), 56,3 (C-14), 24,6 (C-15), 23,9 (C-16), 55,4 (C-17), 13,4 (C-18), 23,9 (C-19), ∿179 (C-20, enmascarado con fondo).

EM, m/z(%): 320 (M, 4), 305 (M - CH_3, 17), 302 (M - H_2O, 100), 287 (M - H_2O - CH_3, 60), 257 (M - H_2O - COOH, 5), 215 (M - H_2O - COOH - anillo D - H, 48), 201 (M - H_2O - COOH - anillo D - CH_3, 5).

Acido 3β-acetoxi-5β-androstan-17β-carboxílico (81).

El hidroxiácido 80 (220 mg) se disolvió en ácido acético (20 ml) y se calentó a reflujo durante 24 hs.

Se extrajo el producto de la reacción con la técnica utilizada para el compuesto 73, método F (pág. 161).

El residuo obtenido se cromatografió en columna de silicagel, aislándose 190 mg del producto 81 puro por ccd. Se recristalizó de etanol acuoso obteniéndose un p.f. 167-169°C (lit.[117]: 162-174°C).

IR (cm^{-1}): 3300-2500 (O-H, ácido), 1750 (C=O, éster), 1700 (C=O, ácido dímero), 1250 (C-O, acetato).

RMN-^{1}H: δ 0,73 (s, 3H, CH_3-18), 0,99 (s, 3H, CH_3-19), 2,06 (s, 3H, CH_3COO-),

5,10 (m, 1H, H-3).

RMN-^{13}C: δ 30,6 (C-1), 25,0 (C-2), 70,6 (C-3), 30,8 (C-4), 37,3 (C-5), 26,2 (C-6), 26,4 (C-7), 35,9 (C-8), 40,0 (C-9), 35,0 (C-10), 20,9 (C-11), 38,4 (C-12), 44,4 (C-13), 56,1 (C-14), 24,5 (C-15), 23,8 (C-16), 55,2 (C-17), 13,4 (C-18), 23,6 (C-19), 179,2 (C-20), 21,5 ($\underline{CH_3}COOR$), 170,5 ($CH_3\underline{C}OOR$).

EM, m/z(%): 302 (M - AcOH, 35), 287 (M - AcOH - CH_3, 15), 215 (M - AcOH - COOH - anillo D - H, 8), 43 (100).

Cloruro de 3β-acetoxi-5β-androstan-17β-carboxililo (82).

El compuesto 81 (180 mg) se suspendió en benceno anhidro (2 ml) y se agregó cloruro de oxalilo (1 ml). Se dejó en reposo, tapado y a temperatura ambiente durante 2 hs. Se evaporó a sequedad y se utilizó sin posterior purificación.

IR (cm^{-1}): 1795 (C=O, cloruro de ácido), 1730 (C=O, éster), 1250 (C-O, acetato).

3β-Acetoxi-5β-pregnan-20-ona (77).

Se efectuó la reacción del cloruro de 3β-acetoxi-5β-androstan-17β-carboxililo (82) (190 mg) con dimetilcadmio, empleando la misma técnica utilizada para la síntesis de acetato de pregnenolona, método C (pág. 165) y las mismas cantidades de reactivos descriptas en dicha técnica.

El residuo final obtenido (165 mg) mostró una conversión de aproximadamente 40-50% en el producto buscado 77 según se determinó por ccd. Por cro-

matografía en columna de silicagel se obtuvo el producto 77 puro (73 mg).

Los datos de p.f. y características espectroscópicas fueron coincidentes con aquéllos obtenidos para el mismo compuesto sintetizado por acetilación (pág. 170).

5β-Colest-20(22)-en-3β-ol (83).

3β-Acetoxi-5β-pregnan-20-ona (77) (50 mg) se disolvió en benceno anhidro (1 ml) y se inyectó esta solución a una solución etérea de bromuro de isohexilmagnesio preparada como se indicó para el compuesto 76 (pág. 169) con 0,25 ml de bromuro de isohexilo y 50 mg de magnesio. Se formó inmediatamente una suspensión que se mantuvo a reflujo por 12 hs. Se agregó ácido clorhídrico (c) (1 ml) gota a gota y enfriando sobre hielo; luego se agregó agua (20 ml), se extrajo con cloruro de metileno (3 x 20 ml), se lavó la fase orgánica con agua hasta neutralidad (2 x 20 ml), se secó el extracto etéreo con sulfato de magnesio anhidro y se evaporó a sequedad.

El residuo crudo presentaba, por ccd, por lo menos 4 productos, todos más polares que el compuesto de partida (77). Se separaron por ccd preparativa de silicagel los dos productos de mayor Rf que eran mayoritarios. De estos dos productos, el de menor Rf (15 mg) se disolvió en etanol (10 ml), se agregó ácido sulfúrico (c) (0,2 ml) y se calentó a reflujo durante 3 hs. Esta solución se volcó sobre agua (20 ml), se extrajo con cloruro de metileno (3 x 30 ml), se lavó el extracto con agua (2 x 20 ml), se secó y se evaporó el solvente. El producto obtenido tenía igual comportamiento cromatográfico que el producto de mayor Rf que se había obtenido en el residuo crudo anterior. Se juntaron esas dos fracciones dando 26,5 mg de producto puro

por ccd.

Este producto no cristalizó y por RMN-^{13}C se estableció que consistía fundamentalmente del isómero E.

IR (cm^{-1}): 3500-3200 (O-H)

RMN-^{1}H: δ 0,52 (s, 3H, CH_3-18), 0,89 (d, J=7, 6H, CH_3-26 y CH_3-27), 0,98 (s, 3H, CH_3-19), 1,62 (s, 3H, CH_3-21), 4,09 (m, 1H, H-3), 5,15 (ta, J=6,5, 1H, H-22).

RMN-^{13}C: δ 30,0 (C-1), 27,7 (C-2 ó C-25), 67,1 (C-3), 33,5 (C-4), 36,6 (C-5), 26,3 (C-6), 26,7 (C-7), 36,0 (C-8), 39,7 (C-9), 35,1 (C-10), 21,1 (C-11), 40,1 (C-12), 43,8 (C-13), 56,2 (C-14), 24,3 (C-15), 27,1 (C-16), 59,0 (C-17), 13,1 (C-18), 23,9 (C-19), 133,9 (C-20), 17,8 (C-21), 125,5 (C-22), 24,8 (C-23), 39,0 (C-24), 27,9 (C-25 ó C-2), 22,6 (C-26), 22,6 (C-27).

EM, m/z(%): 386 (M, 11), 371 (M - CH_3, 2), 273 (M - cad. lat. - 2H, 6), 257 (M - H_2O - cad. lat., 5), 215 (M - H_2O - cad. lat. - anillo D - H, 5), 83 (100).

5β-Colestan-3β-ol (84). (Coprostanol)

La mezcla de olefinas isoméricas (83) (6,5 mg) se disolvió en acetato de etilo (5 ml) y se hidrogenó con paladio 10% sobre carbón por 5 hs a temperatura ambiente y presión atmosférica. Se filtró para eliminar el catalizador y se lavó éste con acetato de etilo.

Por evaporación del solvente se obtuvieron 6 mg de producto puro por ccd. Este producto (84) era una mezcla de epímeros en C-20. Se recristalizó de etanol para dar un p.f. 98-99°C (lit.[118] : 101°C).

IR (cm^{-1}): 3600-3200 (O-H).

RMN-^{1}H: δ 0,70 (s, 3H, CH_3-18), 0,90 (d, J=7, 3H, CH_3-21), 0,92 (d, J=7,5, 6H, CH_3-26 y CH_3-27), 1,02 (s, 3H, CH_3-19), 4,14 (m, 1H, H-3).

RMN-^{13}C para el epímero 20-R: δ 29,9 (C-1), 27,9 (C-2), 67,1 (C-3), 33,5 (C-4), 36,6 (C-5), 26,3 (C-6), 26,7 (C-7), 35,7 (C-8), 39,8 (C-9), 35,1 (C-10), 21,1 (C-11), 40,3 (C-12), 42,7 (C-13), 56,7 (C-14), 24,2 (C-15), 28,3 (C-16), 56,4 (C-17), 12,1 (C-18), 23,9 (C-19), 35,8 (C-20), 18,7 (C-21), 36,2 (C-22), 23,9 (C-23), 39,5 (C-24), 28,0 (C-25), 22,5 (C-26), 22,7 (C-27). El espectro muestra también señales correspondientes al epímero 20-S, en los carbonos 17, 18 y 20 con $\Delta\delta \sim 0,3$-$0,4$ ppm.

EM, m/z(%): 388 (M, 94), 373 (M - CH_3, 49), 370 (M - H_2O, 17), 355 (M - CH_3 - H_2O, 24), 316 (M - H_2O - C_4H_6, 3), 273 (M - cad. lat. - 2H, 64), 257 (M - H_2O - cad. lat., 9), 255 (M - H_2O - cad. lat. - 2H, 14), 248 (M - cad. lat. - C_2H_3, 12), 233 (M - cad. lat. - anillo D - H, 100), 215 (M - H_2O - cad. lat. - anillo D - H, 72), 201 (M - H_2O - cad. lat. - anillo D - CH_3, 12).

|21-^{14}C| 3β-Acetoxi-5β-pregnan-20-ona (85).

Se utilizó nuevamente la técnica C usada para la síntesis del compuesto 75 (pág. 165), con las diferencias que se indican a continuación:

En lugar del tubo invertido mostrado en el esquema de la figura 13a, se colocó otro tubo de forma similar que contenía en su interior (protegido por un cierre de vidrio) 1 mCi de |^{14}C| ioduro de metilo de actividad específica 58 mCi/mmol (figura 13b).

a) Preparación del ioduro de metilmagnesio radiactivo.

Como en la técnica C mencionada (pág. 165), se secaron los componentes del equipo de reacción (incluidos 15 mg de magnesio), se montó dicho equipo y se hizo vacío a través del tapón.

Se inyectó una solución de 20 µl de ioduro de metilo (anhidro, secado sobre pentóxido de fósforo) en 1 ml de éter etílico anhidro (secado sobre sodio y sobre hidruro de aluminio y litio y destilado antes de usar).

Se mantuvo con agitación durante 30 minutos, lapso durante el cual se consumió parte del magnesio y se formó una solución de color gris claro.

Se congeló el medio de reacción, sumergiendo el fondo del tubo Kitasato en aire líquido.

La barrita magnética ubicada en la parte superior del equipo, que tenía un diámetro mayor que el paso que permitía el menor esmeril y de esa manera no podía caer en el tubo Kitasato, se movió con ayuda de un imán externo, de tal modo de romper el cierre de vidrio del tubo invertido que contenía el ioduro de metilo radiactivo.

Mientras se mantenía congelado el fondo del tubo Kitasato, se calentó con una microllama el tubo invertido, flameándolo durante 15 minutos, para asegurar por diferencia de presión el pasaje del reactivo radiactivo al tubo Kitasato.

Se inyectó el resto de ioduro de metilo no marcado (13 µl) y se dejó llegar a temperatura ambiente. Se continuó la agitación durante otros 30 minutos y de esa manera se consumió prácticamente todo el magnesio (que estaba en un ligero exceso).

b) Preparación del dimetilcadmio radiactivo.

Se repitió el método C, parte b (pág. 167) a partir del reactivo de

Grignard recién preparado.

c) Reacción de dimetilcadmio radiactivo con el cloruro de 3β-acetoxi-5β-androstan-17β-carboxililo (82).

Se empleó el método C, parte c (pág. 167) pero usando el cloruro de ácido 82 (180 mg) en lugar de 74.

El sólido obtenido (170 mg) contenía aproximadamente 40-50% del producto buscado (85) como se estableció por ccd. La actividad específica del producto crudo era 8,90 x 10^6 dpm/mg y en consecuencia, su actividad total 1,51 x 10^9 dpm.

Por cromatografía en columna de silicagel se obtuvo el producto 85 puro (68 mg).

P.f. 117-119°C (lit.[114] : 121°C). Actividad específica: 8,60 x 10^6 dpm/mg ó 3,10 x 10^9 dpm/mmol ó 1,40 mCi/mmol.

1° Recristalización (etanol): p.f. 117-120°C. Actividad específica: 8,75 x 10^6 dpm/mg ó 3,15 x 10^9 dpm/mmol ó 1,43 mCi/mmol.

2° Recristalización (etanol): p.f. 117-119°C. Actividad específica: 8,72 x 10^6 dpm/mg ó 3,14 x 10^9 dpm/mmol ó 1,42 mCi/mmol.

Las características espectroscópicas (IR, EM) fueron coincidentes con aquéllas del compuesto no marcado 77.

|21-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (86).

El compuesto 85 (5,0 mg) se disolvió en etanol (10 ml), se agregó ácido sulfúrico (c) (3 gotas) y se calentó a reflujo durante 24 hs.

Se volcó sobre agua (30 ml) y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 20 ml). Luego de lavar el extracto con agua, secarlo y evaporar el solvente,

se obtuvo un residuo que se purificó por ccd preparativa sobre silicagel, aislándose 2,85 mg del producto buscado (86) puro. Se recristalizó de etanol obteniéndose un p.f. 141-144°C (lit.[106] : 149°C).

Actividad específica: $10,12 \times 10^6$ dpm/mg ó $3,22 \times 10^9$ dpm/mmol ó 1,46 mCi/mmol.

Los datos espectroscópicos (IR, EM) coincidieron con los del compuesto no marcado 65.

|21-^{14}C| 5β-colest-20(22)-en-3β-ol (87).

El producto 85 (50 mg) se disolvió en benceno anhidro (1 ml) y se inyectó esta solución a una solución etérea de bromuro de isohexilmagnesio siguiendo la técnica usada para obtener el compuesto 83. El residuo crudo de la reacción de Grignard se disolvió en etanol (10 ml), se agregó ácido sulfúrico (c) (0,2 ml) y se calentó a reflujo durante 3 hs. Se volcó sobre agua (20 ml), se extrajo con cloruro de metileno (3 x 30 ml), se lavó con agua (2 x 20 ml), se secó y evaporó el solvente.

El nuevo residuo se cromatografió en placa preparativa de silicagel, separándose el compuesto de mayor Rf, que era el producto 87 puro por ccd (27 mg) y que no cristalizó.

Actividad específica: $8,36 \times 10^6$ dpm/mg ó $3,23 \times 10^9$ dpm/mmol ó 1,47 mCi/mmol.

Las características espectroscópicas (IR, EM) coincidieron con las del producto no marcado 83.

|21-^{14}C| 5β-Colestan-3β-ol (88). (|21-^{14}C| Coprostanol).

El producto 87 (27 mg) se disolvió en acetato de etilo (10 ml) y se hidrogenó a temperatura ambiente y presión atmosférica con catalizador paladio 10% sobre carbón y durante 5 hs.

Se filtró a través de un crisol filtrante y se lavó éste con acetato de etilo. Por evaporación del solvente se obtuvieron 27 mg de producto 88 puro por ccd, que se recristalizó de etanol para dar un p.f. 95-98°C (lit.[118] : 101°C).

Actividad específica: 8,10 x 10^6 dpm/mg ó 3,15 x 10^9 dpm/mmol ó 1,43 mCi/mmol.

Los datos espectroscópicos (IR, EM) fueron coincidentes con aquéllos del producto no marcado 84.

INOCULACION DE PRODUCTOS RADIACTIVOS A ANIMALES INTACTOS

a) Acido |2-^{14}C| mevalónico (22) como sal de DBED (N,N'-dibencileti-lendiamina).

El compuesto radiactivo (20 mg, 7,2 10^9 dpm/mmol) se disolvió en 10 ml de agua y se inyectó 1 ml de la solución a cada uno de diez sapos *Bufo paracnemis*.

La inyección se realizó en forma subcutánea en la región inguinal de cada sapo.

Los animales se mantuvieron en un recipiente común con circulación de agua y fueron alimentados en forma forzada y periódicamente con carne vacuna cruda.

Luego de 14 días, se extrajo el veneno de nueve sapos (previo comprobar que el mismo era radiactivo, por medición de una muestra) que una vez seco (ver pág.105), pesaba 9,100 g y tenía una actividad específica de 11 dpm/mg.

El veneno seco se molió con arena y se extrajo en un Soxhlet con una mezcla de cloroformo y metanol (95:5) durante 12 hs.

Por evaporación del solvente se obtuvo un residuo (2,490 g) con una actividad específica de 48 dpm/mg.

Dicho residuo se cromatografió en columna de alúmina (eluida con benceno conteniendo cantidades crecientes de cloroformo) y se obtuvieron las siguientes fracciones en el orden indicado: "γ-sitosterol" (ver pág.105; 126 mg, act. esp.: 978 dpm/mg), bufalina (35) (act. esp.: 8 dpm/mg), marinobufagina (24) (act. esp.: 3 dpm/mg) y telocinobufagina (25) (act. esp.:

5 dpm/mg).

La única fracción significativamente radiactiva, "γ-sitosterol", se separó en sus esteroles componentes como se indica posteriormente.

Uno de los animales fue sacrificado y se le extrajeron el hígado y la vesícula biliar. Esas vísceras se cortaron en pequeños trozos en un vaso con metanol y se realizó una reacción de saponificación con hidróxido de potasio 4% en metanol.

La fracción insaponificable obtenida por extracción de la solución alcalina con éter de petróleo constituyó un residuo amarillo.

Por cromatografía en columna de alúmina eluida con acetona, se obtuvieron 31 mg de un producto homogéneo por ccd, con características cromatográficas idénticas a las de colesterol.

Se recristalizó de etanol obteniéndose colesterol puro (p.f. 145-147°C; lit.[118] :149°C) de actividad específica 7,1 10^4 dpm/mg (2,7 10^7 dpm/mmol), que se acetiló en las condiciones usuales (1 ml de piridina + 1 ml de anhídrido acético, a temperatura ambiente durante una noche), para dar acetato de colesterol (p.f. 117-119°C; lit.[118] : 116°C) de actividad específica 2,6 10^7dpm/mmol.

a1) Separación de los componentes del "γ-sitosterol" obtenido de la experiencia anterior.

Intento de separación por cromatografía gaseosa preparativa:

Se prepararon soluciones al 1% de colesterol, de sitosterol y de estigmasterol. Una mezcla de las tres soluciones se intentó separar por cromatografía gaseosa preparativa utilizando un cromatógrafo gaseoso con detector

de conductividad térmica y una unidad colectora de fracciones.

Se usó una columna con fase fija OV-17 3%, analítica de 3 mm de diámetro externo (debido a la pequeña cantidad de muestra a separar) que permitió la resolución del cromatograma en tres bandas razonablemente separadas.

La colección de los vapores a la salida del detector y su posterior análisis por cgl permitió comprobar (a pesar de repetir la experiencia varias veces) que se producían mezclas en la etapa de colección.

Esto podía deberse a alguna mala operación del equipo o a que la unidad colectora está diseñada para separar cantidades mayores de sustancias, utilizando para ello columnas preparativas, por ejemplo de 8 mm de diámetro interno.

Separación por cromatografía líquida de alta resolución:

Se preparó una solución de 1 mg de "γ-sitosterol" (act. esp. 978 dpm/mg) en 1 ml de acetonitrilo purificado y bidestilado. Se filtró a través de filtros Millipore de 0,45 µm y se efectuaron tres inyecciones de 100 µl cada una de esta solución, en un cromatógrafo líquido de alta resolución, en fase inversa, con un solvente de elución acetonitrilo-agua (85:15).

En cada uno de los tres cromatogramas se detectaron cuatro bandas correspondientes a colesterol (2), campesterol (3), estigmasterol (4) y sitosterol (5), según su valor de tiempo de retención comparado con el de testigos auténticos.

Se colectaron juntas las fracciones correspondientes a los mismos esteroles en los tres cromatogramas.

Se verificó por cgl que correspondían a sustancias puras (aunque en el caso de estigmasterol no se detectó) y se midió la radiactividad de una alícuota de las mismas.

Para conocer la actividad específica debía conocerse la masa de cada fracción que se calculó a partir de la masa inicial de producto inyectado en el cromatógrafo líquido (0,3 mg) y de la composición de la solución inicial (según se vio por cgl, la relación colesterol:campesterol:sitosterol resultó 45:29:26).

De esa manera se obtuvieron las siguientes actividades específicas: 1720 dpm/mg para colesterol, 113 dpm/mg para campesterol y 66 dpm/mg para sitosterol.

b) |20-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (69).

El producto 69 (52 mg, 1,20 10^9dpm/mmol) se suspendió en una mezcla de 1 ml de Tween 80 y 4 ml de agua. Se inyectaron 0,5 ml de dicha suspensión a cada uno de diez sapos *Bufo paracnemis*.

Las condiciones experimentales (forma de inoculación, mantenimiento de los animales, colección del veneno) fueron las mismas que las de la experiencia anterior.

Luego de 40 días se extrajo el veneno de dos animales separadamente.

En ambos casos el veneno resultó inactivo y se dio por finalizada la experiencia.

c) |1,2-^{3}H| Colesterol (2).

Este producto comercial de actividad específica 1,2 10^{11} dpm/mmol fue inoculado en las condiciones antes presentadas, a dos ejemplares machos del sapo *Bufo arenarum* (0,29 mg, 9 10^7 dpm a cada animal).

Dicho producto, se provee en forma de una solución bencénica, de la cual, la alícuota correspondiente a la masa deseada se evaporó a sequedad y se disolvió en 0,5 ml de aceite de maíz, para su inoculación.

El veneno se extrajo en la forma indicada (ver pág. 72) a los 9, 15, 29, 98 y 129 días de la inoculación, obteniéndose en todos los casos veneno radiactivo. Los valores de actividad específica de los venenos fueron: 24, 155, 140, 970 y 2440 dpm/mg respectivamente.

d) |21-^{14}C| 3β-Hidroxi-5β-pregnan-20-ona (86).

El compuesto radiactivo (86) de actividad específica 3,14 10^9 dpm/mmol fue inoculado a dos sapos machos *Bufo arenarum* (0,43 mg, 4,3 10^6 dpm a cada animal), en forma de solución en aceite de maíz (0,5 ml a cada uno).

Esta experiencia se realizó conjuntamente con la anterior y en iguales condiciones.

El veneno obtenido a los 15, 29 y 98 días resultó inactivo.

e) |21-^{14}C| 5β-Colestan-3β-ol (88).

Esta experiencia efectuada con sapos *Bufo arenarum*, fue realizada en paralelo con las dos anteriores.

El producto 88 con actividad específica 3,00 10^9 dpm/mmol se inoculó a dos ejemplares machos del sapo mencionado (1,45 mg, 1,1 10^7 dpm a cada animal, en 0,5 ml de aceite de maíz).

Se extrajo veneno a los 15, 29, 98 y 129 días. En los casos en que éste era radiactivo (98 y 129 días), se colectó todo el veneno posible por presión

manual de las glándulas parotoides de ambos animales separadamente. Los venenos presentaban actividades específicas (promedio de ambos animales) de 19 y 24 dpm/mg respectivamente.

Como se trataba de poca masa de veneno (87 mg en total a los 98 días y 105 mg a los 129 días), se decidió unir el proveniente de ambos sapos y obtener luego los extractos clorofórmico-metanólicos de 98 y de 129 días.

En este caso los extractos con cloroformo-metanol (95:5) correspondientes a la colección a los 98 días (ambos sapos) y a los 129 días (los mismos sapos, colectando el veneno residual y el que pudiera haberse sintetizado en los 31 días de diferencia) se obtuvieron por agitación a 50°C de los venenos secos con la solución clorofórmico-metanólica durante 1 hora y posterior filtración.

Por evaporación a sequedad de las soluciones filtradas se obtuvieron los correspondientes extractos de 98 y 129 días que pesaban 31 y 41 mg respectivamente.

Ambos extractos se cromatografiaron en capa delgada preparativa (solvente de desarrollo, cloroformo-metanol, 93:7) obteniéndose en cada placa cuatro zonas bien definidas y un residuo en el origen.

Se eluyeron las cuatro zonas con cloruro de metileno-metanol (80:20), se midieron sus actividades específicas y se analizaron por ccd utilizando testigos de bufadienólidos, colesterol y coprostanol y los siguientes solventes de desarrollo: cloroformo-metanol (93:7), acetato de etilo-metanol (97:3) y acetato de etilo.

La fracción eluida, mayoritaria en masa (3,2 y 3,3 mg para los dos extractos respectivamente) resultó ser arenobufagina pura (ver pág. 8) , uno de los principales bufadienólidos en el sapo *Bufo arenarum*.

Su identificación contra una muestra testigo auténtica se realizó por el valor de Rf, color característico de la mancha en el cromatograma al utilizar como revelador ácido sulfúrico y calentamiento a 110°C, velocidad de aparición del color y cambio del mismo con el tiempo (incoloro y sólo visible a la luz UV en un comienzo, a amarillo intenso luego). Las propiedades fueron coincidentes con las de la muestra auténtica de arenobufagina con todos los solventes de desarrollo elegidos.

De las otras fracciones eluidas (de menor masa en todos los casos) se pudo detectar por ccd en las condiciones mencionadas y con los testigos correspondientes, que una de ellas consistía en una mezcla de por lo menos tres compuestos, entre ellos bufalina y marinobufagina (ver pág. 8) . Otra de las fracciones eluidas contenía una mezcla de arenobufagina y telocinobufagina (ver pág. 8).

Para ambos extractos (de 98 y 129 días) todas estas fracciones eran radiactivas,lo que indicaba un valor de incorporación definido aunque pequeño del trazador radiactivo en los bufadienólidos (ver pág. 110).

INOCULACION DE PRODUCTOS RADIACTIVOS A HOMOGENEIZADOS Y CORTES DE TEJIDO DE GLANDULA PAROTOIDE.

a) Experiencia de inoculación de |1-^{14}C| acetato de sodio y |5-^{3}H| mevalonolactona a cortes de tejido de glándula parotoide.

Se usaron ejemplares adultos hembras del sapo *Bufo arenarum*, que pesaban aproximadamente 100 g y que se mantuvieron a 22-24°C durante los 30 días previos a la experiencia, con períodos de luz de 12 hs diarias, sin alimentación pero con suficiente agua.

Se sacrificaron dos de dichos animales por decapitación, se separaron las glándulas parotoides, se les quitó la piel y se cortaron en trozos lo más delgados posibles con un bisturí. Además, se les extrajo el hígado, del cual se obtuvieron también cortes de tejido.

Estas labores se realizaron con los dos sapos separadamente aunque en iguales condiciones.

Durante toda la etapa de la preparación de los cortes de tejido, se mantuvieron los mismos sobre cápsulas de Petri refrigeradas sobre hielo.

Se preparó una solución de incubación (MEM, minimum essential medium según Eagle[119]) que contenía sales, aminoácidos esenciales y glucosa entre otros componentes, aunque con el 70% de la concentración normalmente recomendada para tejidos de mamíferos[72].

Dicha solución se equilibró en atmósfera de oxígeno-dióxido de carbono (95:5) y se llevó a pH 7,6 por agregado de una solución acuosa de bicarbonato de sodio.

Los cortes de tejido de glándula y de hígado de cada sapo se preincuba-

ron separadamente con 2 ml de esta solución (formando entonces cuatro preincubaciones diferentes) durante 2 hs con agitación y en atmósfera de oxígeno-dióxido de carbono (95:5). Luego de este lavado previo del tejido, se retiró el mismo de la solución y se secó cada corte de tejido con un papel de filtro.

La masa sólida de cada preincubación se dividió en dos partes y se pesó separadamente, para expresar el resultado por gramo de tejido húmedo, preparando de esa manera ocho ensayos diferentes que se destinarían a cuatro incubaciones de 2 hs y a otras cuatro de 16 hs con los trazadores radiactivos.

Cada montículo de tejido, pesando entre 100 y 300 mg aproximadamente (ver Tabla 5 en el capítulo "Resultados obtenidos", pág. 112) se resuspendió en 2 ml de la solución preparada anteriormente y se agregó a cada uno de los ocho tubos de incubación una mezcla de $|1\text{-}^{14}C|$ acetato de sodio (act. esp. 2 mCi/mmol, actividad total agregada a cada tubo: 6,7 10^6 dpm) y $|5\text{-}^{3}H|$ mevalonolactona (act. esp. 6 Ci/mmol, actividad total agregada a cada tubo: 4,9 10^7 dpm).

Las incubaciones se realizaron a 25°C [72] con agitación y bajo la misma atmósfera gaseosa mencionada. Cuatro de ellas se detuvieron a las 2 hs y las otras cuatro a las 16 hs.

Una vez terminadas las incubaciones, cada ensayo se sometió al siguiente tratamiento:

El tejido se retiró de las soluciones (más del 90% de la radiactividad agregada permaneció en las mismas) y se lo lavó con 4 ml de medio (MEM) fresco, por agitación durante 10 minutos. Estas soluciones se descartaron y los cortes de tejido se colocaron en nuevos tubos con 2 ml de MEM y 0,3 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 50%. Se calentaron las mezclas por 30 minutos a 50°C (el tejido se disgregó completamente) y se extrajeron con

cloroformo- metanol (2:1) (3 x 4 ml). Las capas orgánicas se lavaron con solución acuosa de hidróxido de sodio 1%, luego con agua, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron a sequedad.

Los ocho residuos así obtenidos, se cromatografiaron en capas de silicagel, usando cloroformo-metanol (93:7) como solvente de desarrollo y colesterol como testigo.

La radiactividad presente en las placas cromatográficas se determinó por medio de un analizador automático (radiocromatógrafo) y las zonas de las mismas con Rf coincidentes con el de colesterol y que eran radiactivas se eluyeron con cloroformo-metanol (3:1). Mediante un contador de centelleo líquido se determinó la radiactividad de una alícuota de estos eluidos, en dos condiciones diferentes de medición para obtener valores que permitieran calcular radiactividad debida a ^{14}C y radiactividad debida a ^{3}H.

A cada una de estas soluciones se les agregó colesterol inactivo (100 mg) para luego recristalizar el total hasta actividad específica constante de ^{14}C y de ^{3}H.

Se realizaron cinco recristalizaciones de etanol comprobándose que la actividad específica (^{14}C y ^{3}H) del sólido cristalino y de aquél disuelto en las aguas madres de la última recristalización no diferían en valores mayores que 3%.

Los sólidos obtenidos (última recristalización en cada caso) se acetilaron en las condiciones habituales (anhídrido acético-piridina) y el acetato de colesterol obtenido se recristalizó de etanol comprobándose que se mantenía constante el valor de la actividad específica para cada caso (ver Tabla 6, pág. 113).

b) Aislamiento de lipoproteínas del suero sanguíneo de sapos *Bufo arenarum*

Se mantuvieron 11 ejemplares adultos hembras del sapo *Bufo arenarum* durante 15 días de ayuno, con suficiente agua y períodos de luz de 12 hs diarias.

Fueron luego sacrificados por decapitación y se colectaron 125 ml de sangre total en una probeta conteniendo 1 ml de solución de EDTA 0,3 M.

Se centrifugó a 2800 rpm durante 15 minutos y se obtuvieron 74 ml de plasma límpido con d = 1,019 g/ml.

Todas las centrifugaciones siguientes se hicieron a 10°C, utilizando una ultracentrífuga preparativa a 214000 x g[120].

Se realizó una primera centrifugación durante 12 hs separándose una fase superior incolora que contenía lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que se descartó.

Se llevó la densidad a 1,063 g/ml por agregado de bromuro de potasio sólido[121], se centrifugó durante 30 hs y se separó la fase superior que contenía las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Se ajustó la densidad a 1,090 g/ml, se centrifugó durante 20 hs y se descartó la fase superior.

Nuevamente se ajustó la densidad con bromuro de potasio hasta d = 1,215 g/ml y luego de una centrifugación durante 30 hs, se obtuvo la fase superior constituida por las lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Para el lavado de las lipoproteínas, en el caso de la LDL se colocó la misma en un tubo de centrífuga y se agregó, en la parte superior, cuidadosamente y sin remover, solución fisiológica de d = 1,005 g/ml. Para la HDL se

realizó lo mismo pero con una solución de bromuro de potasio de d = 1,060 g/ml. En ambos casos se centrifugó durante 20 hs y se descartó la fase superior.

Para un segundo lavado con soluciones de alta densidad, se colocó una solución de bromuro de potasio de d = 1,090 g/ml en un tubo de centrífuga y se agregó sin remover la LDL. En el caso de la HDL se realizó el mismo procedimiento con una solución de bromuro de potasio de d = 1,230 g/ml. En ambos casos se centrifugó durante 20 hs y se descartó la fase inferior[122].

Ambas lipoproteínas se colocaron en bolsas de diálisis y se dializaron durante 36 hs a 4°C contra tres cambios de 50 volúmenes de solución de cloruro de sodio 0,15 M y EDTA 0,3 mM (pH = 7,4).

Posteriormente, ambas lipoproteínas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

Para ello se prepararon geles cilíndricos de poliacrilamida con la siguiente composición: gel separador (poro fino): 3% de acrilamida; gel concentrador (poro grueso): 2,5% de acrilamida. La solución de siembra era la muestra teñida con Sudan Black B en dietilenglicol que tiñe la fracción lipídica. Las electroforesis se desarrollaron con una solución reguladora conteniendo Tris (tris(hidroximetil)aminometano) y glicina (pH = 8,2) durante 2 hs a intensidad constante de 2,5 mA. Se observaron bandas únicas para LDL y para HDL confirmando un buen procedimiento separativo.

Las dos lipoproteínas se filtraron a través de filtros Millipore de 0,45 µm y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

c) Marcación de las lipoproteínas con iodo (^{125}I).

Se colocaron en un tubo 10 µl de solución reguladora de fosfato 0,5 M, 5 µl de solución de $|^{125}I|$ ioduro de sodio (libre de portador) en hidróxido de sodio 0,1 N (500 µCi de actividad total para cada lipoproteína), un volumen de solución de lipoproteína (LDL o HDL) equivalente a 100 µg de proteína total (según se determinó por el método de Lowry [90] como se indica posteriormente), 10 µl de solución de lactoperoxidasa (Calbiochem, grado B) de concentración 2,7 mg/ml en solución reguladora de fosfato 0,5 M (pH = 7,4) y 10 µl de agua oxigenada (300 volúmenes diluidos 1:10000 en agua bidestilada).

Se agitó durante 2 minutos, se diluyó con 200 µl de solución reguladora de fosfato 0,05 M (pH = 7,4) y se transfirió a una columna de poliacrilamida agarosa (ACA-54) previamente equilibrada con la solución de elución (solución reguladora de fosfato con albúmina de suero bovino 1%, pH = 7,4).

Se eluyeron las lipoproteínas marcadas con ^{125}I separándose del ^{125}I libre que quedó retenido.

Para calcular la eficiencia de la marcación, como para verificar que las lipoproteínas iodadas separadas por la columna, no estuvieran impurificadas con ^{125}I libre, se realizó una cromatografía en papel utilizando ácido tricloroacético como solvente de elución de acuerdo al método de Ceska y colaboradores [123]. El ácido tricloroacético produce la precipitación de la proteína, por lo que ésta queda en el origen y desplaza al $|^{125}I|$ ioduro de sodio, produciendo su separación. Por este método se estableció que toda la radiactividad quedaba en el origen y en consecuencia no era necesaria una posterior purificación.

La determinación de proteína total de las lipoproteínas, se realizó por

el método de Lowry [90] modificado por Markwell [124] (extrayendo los lípidos con cloroformo, luego del desarrollo del color) y utilizando albúmina de suero bovino (fracción V de Sigma) como patrón.

Por este método se determinó que 10 µl de la solución original de LDL contenían 15,2 µg de proteína y que el mismo volumen de solución original de HDL contenía 84,5 µg de proteína.

El valor de radiactividad de ^{125}I, medida con un contador gamma, permitió obtener las actividades específicas de las lipoproteínas marcadas, siendo para LDL de 1,7 µCi/µg de proteína y para HDL 1,83 µCi/µg de proteína, lo que implicó una incorporación absoluta porcentual de 34 y 36,6% respectivamente.

d) Ensayo de unión de las lipoproteínas a los receptores en la membrana.

Las glándulas parotoides sin piel, correspondientes a dos sapos *Bufo arenarum*, se homogeneizaron en 1 ml de solución de bicarbonato de sodio 1 mM (pH = 8) y se centrifugó dicho homogeneizado a 3000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 27000 x g y el sólido depositado se resuspendió en el volumen original de una solución de fosfato de pH = 7,4.

Esta preparación de membrana, se utilizó como fuente de receptores de lipoproteínas.

Las incubaciones de las lipoproteínas con la preparación de membrana se realizaron en tubos de plástico descartables. El volumen final en cada tubo fue 0,4 ml conteniendo solución reguladora de fosfato (pH = 7,4), 2% de albúmina de suero bovino, 100 µg de proteína de membrana (el volumen equivalente a esa masa, de acuerdo a la determinación de proteína total según el método de Lowry), las lipoproteínas de sapo iodadas (^{125}I-t-LDL o ^{125}I-t-HDL

según el caso; aproximadamente 1 µg de proteína/ml y 2000 cpm/ng de proteína) y cantidades variables de t-LDL o t-HDL sin marcar respectivamente (desde 0,75 µg hasta 125 µg de proteína por ml de solución).

El valor de unión inespecífica se determinó realizando incubaciones paralelas conteniendo respectivamente 500 µg de proteína/ml, de t-LDL o t-HDL sin marcar.

Los tubos conteniendo las distintas composiciones se incubaron a 37°C durante 2 hs.

Luego de las incubaciones, se separaron los complejos receptor-lipoproteína de los ligandos libres (t-LDL o t-HDL marcadas y no marcadas) por agregado de 2 ml de solución reguladora de fosfato de pH = 7,4 a cada tubo, seguido de filtración a través de filtros Millipore de 0,45 µm, previamente saturados con albúmina de suero bovino al 5%. Los tubos y los filtros se lavaron con albúmina de suero bovino al 1% (3 x 3 ml) en el mismo medio.

El control de tiempo cero, con y sin lipoproteínas sin marcar, fue restado del valor de unión específica (ver pág. 98).

Los ensayos se hicieron por duplicado y con los valores obtenidos se construyeron gráficos de Scatchard (ver pág. 116).

Los datos fueron procesados en una computadora HP-86 (Hewlett-Packard) utilizando un programa desarrollado por el Dr. J. C. Calvo (Instituto de Biología y Medicina Experimental).

e) Marcación de las lipoproteínas con linoleato de |1,2,6,7-^{3}H| colesterol.

El linoleato de |1,2,6,7-^{3}H| colesterol (act. esp. 100 Ci/mmol) se

incorporó a las lipoproteínas usando el método de Faust *et. al.*[93].

Para cada lipoproteína se procedió de la manera siguiente:

Se evaporó a sequedad el linoleato de colesterol tritiado (40 µCi, 40 nmoles) que se provee comercialmente en solución en tolueno. El residuo se disolvió en 0,1 ml de dimetilsulfóxido y la solución se agitó enérgicamente durante 1 minuto. Se añadieron 0,9 ml de una solución reguladora (20 mM en Tris/cloruro, pH = 8, 0,15 M en cloruro de sodio y 0,3 mM en EDTA) y luego se agregó la lipoproteína (t-LDL o t-HDL; 1 mg de proteína en 25 µl de una solución 0,15 M en cloruro de sodio y 0,3 mM en EDTA).

Esta solución se incubó durante 2 hs a 40°C, luego de lo cual se dializó a 4°C durante 72 hs contra cuatro cambios de 250 ml de solución reguladora (20 mM en Tris/cloruro, pH = 7,4, 0,15 M en cloruro de sodio y 0,3 mM en EDTA). Se retiró la solución de la diálisis y se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C. La solución sobrenadante contenía la lipoproteína marcada.

Se determinó el contenido de colesterol total en cada lipoproteína por el método de Searcy *et. al.*[125] y la actividad específica de cada una (ver pág. 118).

f) Incubación de cortes de tejido de glándula parotoide con ^{3}H-t-LDL y con ^{3}H-t-HDL (las lipoproteínas marcadas con el linoleato de colesterol tritiado)

Se realizaron incubaciones de 16 hs en las condiciones empleadas en el ensayo a con acetato y mevalonato (ver pág. 189).

En cada tubo se colocaron entre 10 y 30 mg de tejido húmedo con las lipoproteínas marcadas (aproximadamente 7,5 10^{6} dpm de cada una) por separado,

con y sin el agregado de colchicina (89 , 1 µM).

Estos ensayos se hicieron por triplicado.

Cuando finalizaron las incubaciones, los cortes de tejido se extrajeron como se describió en a, excluyendo el paso de hidrólisis alcalina y los lavados con solución alcalina.

La radiactividad incorporada por mg de tejido se determinó por centelleo líquido a partir de alícuotas de los extractos orgánicos. Estos extractos fueron evaporados y los residuos se cromatografiaron como en a, pero usando acetato de etilo como solvente de desarrollo, con colesterol tritiado y linoleato de colesterol tritiado como testigos. Las placas cromatográficas se cortaron en tiras transversales de 0,5 cm que se eluyeron separadamente con cloroformo-metanol (3:1) para medir su radiactividad por centelleo líquido.

En el capítulo "Resultados obtenidos" se muestra un perfil cromatográfico típico para este experimento (ver pág. 121).

Los valores de incorporación de cada lipoproteína en el tejido, de incorporación de colesterol total y el porcentaje de hidrólisis del linoleato de colesterol tritiado incorporado se indican en la Tabla 10.

RESUMEN

Muy poco es conocido acerca de la biosíntesis de bufadienólidos de sapo: el resultado más significativo es que el colesterol resulta un adecuado precursor biosintético de los mismos.

A partir de ahí se deben descubrir todos los intermediarios de la secuencia biosintética, investigando el posible rol como precursores de compuestos esteroidales que resulten de una modificación adecuada del colesterol en el camino a bufadienólidos.

Puesto que el colesterol marcado con ^{14}C en C-20 resultaba incorporado en los bufadienólidos del veneno de sapos y el mismo compuesto marcado en C-24 no se incorporaba, era muy probable que la cadena lateral de colesterol se escindiera entre C-20 y C-22 durante el proceso biosintético.

Partiendo de esa premisa, en el presente trabajo se decidió realizar la síntesis de compuestos esteroidales marcados en C-20 o en C-21, que estuvieran estructuralmente más relacionados con los bufadienólidos que el colesterol.

Se sintetizaron: |20-^{14}C| 3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona, el mismo compuesto pero marcado con ^{14}C en C-21 y |21-^{14}C| 5β-colestan-3β-ol (coprostanol 21-^{14}C). Estos tres compuestos fueron inoculados a sapos intactos con el objeto de verificar si producían bufadienólidos radiactivos. El coprostanol radiactivo resultó incorporado en el bufadienólido arenobufagina, mientras que los

otros dos compuestos produjeron veneno inactivo.

Se inoculó en forma paralela colesterol tritiado, como control del ensayo.

También se inoculó ácido $|2\text{-}^{14}C|$ mevalónico, comprobándose la formación de "γ-sitosterol" radiactivo, mezcla de esteroles (colesterol, campesterol, estigmasterol y sitosterol) que se separó en sus componentes, para verificar que el único esterol radiactivo (o sea biosintetizado a partir del ácido mevalónico marcado) era el colesterol y que los demás (esteroles típicos de vegetales) no resultaban marcados.

Con el objeto de conocer el origen biosintético del colesterol en las glándulas productoras del veneno se hicieron ensayos con homogeneizados y con cortes de tejido de glándula parotoide.

Se incubaron cortes de tejido de glándula parotoide y de hígado de sapos con $|1\text{-}^{14}C|$ acetato de sodio y con $|5\text{-}^{3}H|$ mevalonolactona, observándose que en las condiciones experimentales empleadas, sólo los cortes de tejido de hígado sintetizaban colesterol radiactivo. Como no se producía biosíntesis evidente de colesterol *de novo* en las glándulas parotoides, era de esperar un aprovisionamiento de colesterol desde el exterior de las células glandulares.

Por ello se aislaron las lipoproteínas de suero sanguíneo de sapos, se las marcó con ^{125}I y se efectuaron ensayos de unión de las lipoproteínas a la membrana celular, midiéndose las constantes de disociación de los complejos

lipoproteína-receptor así como las capacidades máximas de unión. De esta manera se observó la presencia de sitios de unión de alta afinidad para las lipoproteínas transportadoras de colesterol.

Para evaluar la posible "internalización" de las lipoproteínas, se las marcó con linoleato de |1,2,6,7-^{3}H| colesterol y se incubaron cortes de tejido de glándula con esas lipoproteínas, con y sin el agregado de colchicina (un inhibidor de la "internalización"). Se observó la presencia de colesterol tritiado y linoleato de colesterol tritiado dentro del tejido, por lo que se confirmó el aporte externo de colesterol.

BIBLIOGRAFIA

1 E. Iseli, M. Kotake, Ek. Weiss y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 48, 1093 (1965).

2 H. Wieland y R. Alles, *Ber.*, 55, 1789 (1922).

3 H. Linde y K. Meyer, *Pharm. Acta Helv.*, 33, 327 (1958).

4 K. Meyer, *Pharm. Acta Helv.*, 24, 222 (1949).

5 R. Zelnik, L.M. Ziti y C.V. Guimarães, *J. Chromatogr.*, 15, 9 (1964).

6 H. Linde, N. Ergenc y K. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, 49, 1246 (1966).

7 F. Märki, J. Axelrod y B. Witkop, *Biochem. Biophys. Acta*, 58, 367 (1962).

8 H.M. Lee y K.K. Chen, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 102, 286 (1951).

9 J.J. Abel y D.I. Macht, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 3, 319 (1911-1912).

10 S. Udenfriend, C.T. Clark y E. Titus, *Experientia*, 8, 379 (1952).

11 V. Erspamer, *Pharmacol. Rev.*, 6, 425 (1954).

12 V. Erspamer, T. Vitali, M. Roseghini y J.M. Cei, *Experientia*, 21, 504 (1965).

13 R. Tschesche, *Planta Med.*, Sup. 4, 34 (1971).

14 R. Tschesche y B. Brassat, *Z. Naturforsch.*, 20b, 707 (1965).

15 H. Jensen, *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 767 (1937).

16 R. Tschesche, H. Scholten y M. Peters, *Z. Naturforsch.*, 24b, 1492 (1969).

17 E.G. Gros y A.M. Porto, *An. Asoc. Quím. Argent.*, 55, 177 (1967).

18 A.M. Porto y E.G. Gros, *Experientia*, 26, 11 (1970).

19 L.R. Galagovsky, A.M. Porto, G. Burton, M.S. Maier, A.M. Seldes y E.G. Gros, *An. Asoc. Quím. Argent.*, 70, 327 (1982).

20 L.R. Galagovsky, A.M. Porto, G. Burton y E.G. Gros, *Z. Naturforsch.*, 39c, 38 (1984).

21 R. Tschesche, H. Hulpke y H. Scholten, *Z. Naturforsch.*, 22b, 677 (1967).

22 J. Doull, K.P. Dubois y E.M.K. Geiling, *Arch. Internat. Pharmacodynamie*, 86, 454 (1951).

23 M.D. Siperstein, A.W. Murray y E. Titus, *Arch. Biochem. Biophys.*, 67, 154 (1957).

24 G. Popják y J.W. Cornforth, *Advances in Enzymology*, 22, 281 (1960).

25 C. Chen y M.V. Osuch, *Biochem. Pharmacol.*, 18, 1797 (1969).

25a A.M. Porto y E.G. Gros, *J. Lab. Compds.*, 4, 276 (1968).

26 M.V. Osuch y C. Chen, *Biochem. Pharmacol.*, 18, 1803 (1969).

27 A.M. Porto, F.E. Baralle y E.G. Gros, *J. Steroid Biochem.*, 3, 11 (1972).

27a A.M. Porto y E.G. Gros, *Experientia*, 27, 506 (1971).

28 A.M. Porto y E.G. Gros, *J. Lab. Compds.*, 6, 369 (1970).

29 G.A.D. Haslewood, *Biol. Rev.*, 39, 537 (1964).

30 E. Staple en *Biogenesis of Natural Compounds* (Editor: P. Bernfeld), Pergamon Press, N.Y., p. 233 (1967).

31 I. Björkhem, *Acta Chem. Scand.*, 21, 2561 (1967).

31a A.O. Colonna y E.G. Gros, *J. Steroid Biochem.*, 4, 171 (1973).

32 G. Burton y E.G. Gros, *J. Steroid Biochem.*, 8, 69 (1977).

33 G. Burton y E.G. Gros, *J. Lab. Compds. & Radiopharm.*, 13, 627 (1977).

34 H.M. Garraffo, G. Burton, A.M. Porto y E.G. Gros, *An. Asoc. Quím. Argent.*, 70, 743 (1982).

35 H.H. Rees y T.W. Goodwin en *Biosynthesis, A Specialist Periodical Report*, The Chemical Society, Vol. 1, p. 59 (1972).

36 Referencia *35*, p. 84.

37 Referencia *30*, p. 207.

38 Referencia *35*, p. 44.

39 M. Hayano en *Oxygenases* (Editor: O. Hayaishi), Academic Press, N.Y., p. 182 (1962). Citado en referencia *46*.

40 H. Gregory y E. Leete, *Chem. Ind. (London)*, 1242 (1960).

41 E. Leete, H. Gregory y E.G. Gros, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 3475 (1965).

42 J. v. Euw y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 47, 711 (1964).

43 R. Tschesche y B. Brassat, *Z. Naturforsch.*, 21b, 984 (1966).

44 E. Caspi, D.O. Lewis, D.M. Piatak, K.V. Thimann y A. Winter, *Experientia*, 22, 506 (1966).

45 R.D. Bennett, H.H. Sauer y E. Heftmann, *Phytochemistry*, 7, 41 (1968).

46 E. Caspi y D.O. Lewis, *Phytochemistry*, 7, 683 (1968).

47 K. Nakanishi, M. Koreeda, S. Sasaki, M.L. Chang y H.Y. Hsu, *Chem. Commun.*, 915 (1966).

48 M.N. Galbraith y D.H.S. Horn, *Chem. Commun.*, 905 (1966).

49 R. Tschesche y G. Lilienweiss, *Z. Naturforsch.*, 19b, 265 (1964).

50 E. Caspi y D.O. Lewis, *Science*, 156, 519 (1967).

51 L. Canonica, F. Ronchetti y G. Russo, *Chem. Commun.*, 1675 (1970).

52 D.H. Aberhart, J.G. Lloyd-Jones y E. Caspi, *Phytochemistry.*, 12, 1065 (1973).

53 R. Tschesche y U. Kleff, *Phytochemistry*, 12, 2375 (1973).

54 A. Butenandt y J. Schmidt-Tomé, *Ber.*, 72, 182 (1939).

55 L. Miramontes, P. Aguinaco y M. Romero, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 6153 (1960).

56 R.L. Augustine en *Organic Reactions in Steroid Chemistry* (Editor: J. Fried y J.A. Edwards), Van Nostrand Reinhold Company, N.Y., Vol. 1, p. 111 (1972).

57 L. Salce, G.G. Hazen y E.F. Schoenewaldt, *J. Org. Chem.*, 35, 1681 (1970).

58 J.D. Cocker, H.B. Henbest, G.H. Phillips, G.P. Slater y D.A. Thomas, *J. Chem. Soc.*, 6 (1965).

59 L. Fieser y M. Fieser, *Steroids*, Reinhold Publishing Corporation, N.Y., p. 566 (1959).

60 G. Burton, *Síntesis del ácido 3β-hidroxicol-5-énico-24-^{14}C y su aplicación al estudio de la biosíntesis de bufadienólidos en sapos*, Tesis, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (1977), p. 150.

61 L. Fieser y M. Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Inc., Vol. 1, p. 767 (1967).

62 H.B. Mac Phillamy y C.R. Scholz, *J. Biol. Chem.*, 178, 37 (1949).

63 H.O. House y T.M. Bare, *J. Org. Chem.*, 33, 943 (1968).

64 D.A. Shirley en *Organic Reactions* (Editor: R. Adams, A.H. Blatt, A.C. Cope, D.Y. Curtin, F.C. Mc Grew y C. Niemann), John Wiley and Sons, Inc., Vol. 8, p. 28 (1954).

65 G. Cahiez, A. Masuda, D. Bernard y J.F. Normant, *Tetrahedron Lett.*, 3155 (1976).

66 G. Cahiez, D. Bernard y J.F. Normant, *Synthesis*, 130 (1977).

67 G. Cahiez, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1239 (1981).

68 F. Ducelliez, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 13, 815 (1913).

69 D.M. Piatak y J. Wicha, *Chem. Rev.*, 78, 199 (1978).

70 O. Kamm y C.S. Marvel en *Organic Syntheses* (Editor: H. Gilman y A.H. Blatt), John Wiley and Sons, Inc., N.Y., Col. Vol. 1, p. 28 (1941).

71 O. Warburg, *Biochem. Z.*, 142, 317 (1923).

72 K. Wolf y M.C. Quimby, *Science*, 144, 1578 (1964).

73 C.O. Warren, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 19, 193 (1942).

74 K.A.C. Elliott y M.Henry, *J. Biol. Chem.*, 163, 351 (1946).

75 F.A. Fuhrman y J. Field, 2nd., *Arch. Biochem.*, 6, 337 (1945).

76 K.A.C. Elliott en *Methods in Enzymology* (Editor: S.P. Collowick y N.O. Kaplan), Academic Press, Inc., N.Y., Vol. 1, Sec. 1, p. 3 (1955).

77 K.A.C. Elliott y M.K. Birmingham, *J. Biol. Chem.*, 177, 51 (1949).

78 V.R. Potter y C.A. Elvehjem, *J. Biol. Chem.*, 144, 495 (1936).

79 V.R. Potter, *J. Biol. Chem.*, 141, 775 (1941).

80 V.R. Potter, *J. Biol. Chem.*, 169, 17 (1947).

81 V.R. Potter, *J. Biol. Chem.*, 163, 437 (1946).

82 G.H. Hogeboom, W.C. Schneider y G.E. Palade, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 65, 320 (1947).

83 W.C. Schneider y V.R. Potter, *J. Biol. Chem.*, 149, 217 (1943).

84 V.R. Potter, *J. Biol. Chem.*, 165, 311 (1946).

85 R.O. Recknagel y V.R. Potter, *J. Biol. Chem.*, 191, 263 (1951).

86 P. Siekevitz y V.R. Potter, *J. Biol. Chem.*, 201, 1 (1953).

87 V.R. Potter, R.O. Recknagel y R.B. Hurlbert, *Federation Proc.*, 10, 646 (1951).

88 J.T. Gwynne y J.F. Strauss III, *Endocrine Rev.*, 3, 299 (1982).

89 O.P. Pignataro y E.H. Charreau, *Resultados no publicados.*

90 O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).

91 I. Tinoco Jr., K. Sauer y J.C. Wang, *Fisicoquímica, principios y aplicaciones en las ciencias biológicas*, Prentice Hall Internacional, Editorial Dossat, S.A., Madrid, p. 490 (1980).

92 G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51, 660 (1949).

93 J.R. Faust, J.L. Goldstein y M.S. Brown, *J. Biol. Chem.*, 252, 4861 (1977).

94 R.E. Ostlum Jr., B. Pfleger y G.J.Schonfeld, *J. Clin. Invest.*, 63, 75 (1979).

95 H.R. Hellig y K. Savard, *Biochemistry*, 5, 2944 (1966).

96 P.G. Quinn, L.J. Dombrausky, Y.D.I. Chen y A.H. Payne, *Endocrinology*, 109, 1790 (1981).

97 Y.D.I. Chen, F.B. Kraemer y G.M. Reaven, *J. Biol. Chem.*, 255, 9162 (1980).

98 O.P. Pignataro, T.A. Santa Coloma, H.M. Garraffo, E.H. Charreau y E.G. Gros, *Resultados no publicados*.

99 J.L. Goldstein, S.E. Dana y M.S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 4288 (1974).

100 S.R. Bates, *Atherosclerosis*, 32, 165 (1979).

101 M.S. Brown, S.E. Dana y J.L. Goldstein, *J. Biol. Chem.*, 250, 4025 (1975).

102 A. Butenandt y J. Schmidt-Tomé, *Ber.*, 71, 1487 (1938).

103 H. Heusser, P. Th. Herzig, A. Fürst y Pl. A. Plattner, *Helv. Chim. Acta*, 33, 1093 (1950).

104 K. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, 29, 1580 (1946).

105 R.E. Marker, *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 3350 (1940).

106 R.E. Marker, *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 1841 (1937).

107 L. Ruzicka, T. Reichstein y A. Fürst, *Helv. Chim. Acta*, 24, 76 (1941).

108 T. Reichstein (Roche-Organon, Inc.), patente, *Chem. Abstr.*, 37, 1230^5 (1943).

109 L. Carroll King, *J. Am. Chem. Soc.*, 66, 1612 (1944).

110 M. Steiger y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 20, 1040 (1937).

111 R.E. Marker, *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 2395 (1947).

112 *Handbook of Chemistry and Physics* (Editor: R.C. Weast), 1968-1969, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, Compuesto N° p96.

113 N.K. Chaudhuri, R. Nickolson, J.G. Williams y M. Gut, *J. Org. Chem.*, 34, 3767 (1969).

114 A. Ruff y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 34, 70 (1951).

115 R.E. Marker, H.M. Crooks, Jr. y R.B. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 213 (1942).

116 L. Ruzicka, Pl. A. Plattner y G. Balla, *Helv. Chim. Acta*, 25, 65 (1940).

117 T. Reichstein y H.G. Fuchs, *Helv. Chim. Acta*, 23, 658 (1940).

118 Referencia *59*, p. 28.

119 H. Eagle, *Science*, 130, 432 (1959).

120 R.J. Havel, H.A. Eder y J.H. Bragdon, *J. Clin. Invest.*, 34, 1345 (1955).

121 C.M. Radding y D. Steinberg, *J. Clin. Invest.*, 39, 1560 (1960).

122 J. Huang y K.M. Menon, *J. Biol. Chem.*, 258, 8020 (1983).

123 M. Ceska, A.V. Sjodin y F. Grossmuller, *Biochem. J.*, 121, 139 (1971).

124 M.A.K. Markwell, S.M. Haas, L.L. Beiber y N.F. Tolbert, *Anal. Biochem.*, 87, 207 (1978).

125 R.L. Searcy y L.M. Bergquist, *Clin. Chim. Acta*, 5, 192 (1960).

INDICE DE FIGURAS

pág.

Figura 1..... 6

Figura 2..... 7

Figura 3..... 8

Figura 4..... 10

Figura 5..... 13

Figura 6..... 18

Figura 7..... 36

Figura 8..... 93

Figura 9.....116

Figura 10.....116

Figura 11.....121

Figura 12.....142

Figura 13.....166

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.....105

Tabla 2.....106

Tabla 3.....109

Tabla 4.....110

Tabla 5.....112

Tabla 6.....113

Tabla 7.....115

Tabla 8.....117

Tabla 9.....118

Tabla 10.....119