

Tesis Doctoral

# Síntesis, actividad biológica y bases moleculares de acción de análogos rígidos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales

Alvarez, Lautaro Damián

2009

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Alvarez, Lautaro Damián. (2009). Síntesis, actividad biológica y bases moleculares de acción de análogos rígidos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Alvarez, Lautaro Damián. "Síntesis, actividad biológica y bases moleculares de acción de análogos rígidos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Orgánica

SÍNTESIS, ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y BASES MOLECULARES  
DE ACCIÓN DE ANÁLOGOS RÍGIDOS DE ESTEROIDES  
NEUROACTIVOS Y HORMONAS ESTEROIDALES

Tesis Presentada Para Optar por el Título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área de Química Orgánica

Lautaro Damián Álvarez

Director de Tesis: Dr. Gerardo Burton  
Director Asistente: Dra. Adriana S. Veleiro

Buenos Aires, 2009



## SÍNTESIS, ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y BASES MOLECULARES DE ACCIÓN DE ANÁLOGOS RÍGIDOS DE ESTEROIDES NEUROACTIVOS Y HORMONAS ESTEROIDALES

En esta tesis se investigó la influencia de la conformación global del esqueleto esteroidal sobre la actividad de los esteroides neuroactivos y de los glucocorticoides. Por un lado, se diseñaron y sintetizaron tres 1,11-epoxiesteroides y un 11,19-epoxiesteroide, análogos de esteroides neuroactivos cuya conformación está restringida por la presencia del puente epóxido. Por otra parte, se estudió la actividad glucocorticoide y las bases moleculares de acción de dos análogos rígidos: 21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona (21OH-6,19OP), y su 21-hemisuccinato derivado, 21-hemisuccinoiloxi-6,19-epoxiprogesterona (21HS-6,19OP). La actividad transcripcional de ambos compuestos se determinó utilizando el gen reportero MMTV-LUC y evaluando la capacidad de los mismos de inhibir la actividad del factor de transcripción NFκB. También se estudió el efecto apoptótico de estos compuestos en los fibroblastos de ratón L929. El conjunto de estos resultados muestra que estos análogos rígidos poseen potenciales aplicaciones como drogas glucocorticoides. Finalmente, utilizando la herramienta computacional denominada simulación por dinámica molecular se investigaron las bases moleculares de acción de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP. Para ello se determinó el comportamiento dinámico del dominio de unión a ligando del receptor de glucocorticoides unido a cada uno de estos análogos rígidos. Los resultados muestran que cambios en regiones claves del receptor podrían ser utilizadas para explicar los resultados experimentales obtenidos.

**Palabras claves:** esteroides, análogos rígidos, glucocorticoides, receptor de glucocorticoides, bases moleculares de acción.



## SYNTHESIS, BIOLOGICAL ACTIVITY AND MOLECULAR BASIS OF ACTION OF RIGID ANALOGS OF NEUROACTIVE STEROIDS AND STEROIDAL HORMONES

This thesis explores the influence of global conformation of the steroid skeleton on the activity of neuroactive steroids and glucocorticoids. In the first part, three 1,11-epoxysteroids and one 11,19-epoxysteroid analogs of neuroactive steroids with their conformation restricted by an oxygen bridge, were designed and synthesized. On the second part, the glucocorticoid activity and the molecular basis of action of two rigid analogs, 21-hydroxy-6,19-epoxyprogesterone (21OH-6,19OP) and its hemisuccinate 21-hemisuccinoyloxy-6,19-epoxyprogesterone (21HS-6,19OP), was studied. Transcriptional activity of both compounds was determined using the reporter gene MMTV-LUC and evaluating their capacity to inhibit the activity of the transcription factor NF $\kappa$ B. The apoptotic effect of these compounds was also studied in mouse fibroblasts L929. The results obtained show that these rigid analogs have potential applications as glucocorticoid drugs. Finally the computational tool known as molecular dynamics simulation was used to investigate the molecular basis of action of 21OH-6,19OP and 21HS-6,19OP. Thus the dynamic behavior of the ligand binding domain of the glucocorticoid receptor bound to these rigid analogs was determined. The results show that changes in key regions of the receptor may explain the experimental results.

**Keywords:** steroids, rigid analogs, glucocorticoids, glucocorticoid receptor, molecular basis of action.



A Sara.  
A mis padres, Clara y Oscar.  
A mis hermanos, Moira y Camilo.





A Adriana, Adalí y Gerardo.



# ÍNDICE

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

|   |    |
|---|----|
| 1.1 Esteroides  | 3  |
| 1.2 Hormonas esteroidales   | 5  |
| 1.3 Neuroesteroides   | 8  |
| 1.4 Análogos rígidos de hormonas esteroidales y esteroides neuroactivos | 10 |
| 1.5 Objetivos   | 12 |

## CAPÍTULO 2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS RÍGIDOS DE ESTEROIDES NEUROACTIVOS

|   |    |
|---|----|
| 2.1 El receptor GABA <sub>A</sub> y los Neuroesteroides                 | 17 |
| 2.2 Reacción de Ciclación. Reacción de Hipiodito                        | 20 |
| 2.3 Antecedentes: obtención de 1,11-epoxiesteroides                     | 21 |
| 2.4 Síntesis de nuevos análogos rígidos con puentes 1,11-epóxido        | 24 |
| Síntesis del análogo 1  | 24 |
| Síntesis del análogo 2  | 25 |
| Síntesis del análogo 3  | 28 |
| Síntesis de 1,11-epoxiprogesterona                                      | 36 |
| 2.5 Síntesis del análogo 4  | 37 |
| 2.6 Modelado Molecular  | 41 |
| Reacción de ciclación   | 41 |
| Análisis conformacional de los análogos 1-4                             | 46 |
| 2.7 Actividad moduladora del GABA <sub>A</sub> de los análogos 1, 2 y 4 | 48 |

## CAPÍTULO 3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS RÍGIDOS DE GLUCOCORTICOIDES

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Glucocorticoides                            | 53 |
| Descubrimiento                                  | 53 |
| Biosíntesis, transporte, disponibilidad celular | 54 |
| Efectos fisiológicos                            | 55 |
| Glucocorticoides como drogas                    | 57 |

|  |    |
|--|----|
| Relaciones estructura-actividad de los glucocorticoides                | 58 |
| Antiglucocorticoides   | 60 |
| 3.2 El receptor de glucocorticoides (GR)                               | 62 |
| Receptores nucleares   | 62 |
| Receptores de esteroides   | 63 |
| Estructura del GR  | 64 |
| Especificidad de acción: isoformas y cofactores                        | 65 |
| 3.3 Mecanismo de acción del GR   | 67 |
| Modelo disociado   | 67 |
| Limitaciones del modelo disociado                                      | 69 |
| Moduladores selectivos del GR  | 71 |
| 3.4 Análogos rígidos de glucocorticoides                               | 71 |
| 21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona (21OH-6,19OP)                        | 72 |
| 21-hemisuccinoiloxi-6,19-epoxiprogesterona (21HS-6,19OP)               | 75 |
| 3.5 Actividad glucocorticoides de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP            | 76 |
| Inducción de MMTV-LUC  | 77 |
| Inducción de MMTV-LUC con agregado de coactivador TIF2                 | 78 |
| Inhibición de la actividad de NFκB                                     | 79 |
| Protección contra la muerte celular inducida por TNF-α en células L929 | 80 |
| 3.6 Discusión  | 81 |

## CAPÍTULO 4. BASES MOLECULARES DE ACCIÓN DE ANÁLOGOS RÍGIDOS DE GLUCOCORTICOIDES

|  |     |
|--|-----|
| 4.1 Bases moleculares de acción de los glucocorticoides        | 89  |
| Mecanismo molecular de la transactivación                      | 89  |
| Estructura del dominio de unión al ligando del GR              | 91  |
| Bases moleculares del antagonismo en la transactivación        | 96  |
| Cambio conformacional inducido versus selección conformacional | 98  |
| Modelo de equilibrio de unión de cofactores                    | 99  |
| Dimerización y unión al DNA                                    | 100 |
| Simulación por dinámica molecular                              | 101 |
| 4.2 Bases Moleculares de acción de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP   | 102 |
| 4.2.1 Simulación de GR LBD-dex, GR LBD-21OH-6,19OP y GR LBD    | 103 |
| Estabilidad de las trayectorias                                | 103 |

|   |            |
|---|------------|
| Modo de unión de dexametasona                                   | 104        |
| Modo de unión de 21OH-6,19OP                                    | 106        |
| Fluctuaciones del esqueleto de la proteína                      | 108        |
| Estructuras promedio  | 109        |
| Discusión   | 112        |
| 4.2.2 Simulación de GR LBD-21HS-6,19OP                          | 113        |
| Modo de unión de 21HS-6,19OP                                    | 113        |
| Interfase de dimerización                                       | 114        |
| Dominio AF-2  | 115        |
| Discusión   | 117        |
| <b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIÓN</b>                                   | <b>121</b> |
| <b>CAPÍTULO 6. PARTE EXPERIMENTAL Y MÉTODOS COMPUTACIONALES</b> |            |
| 6.1 Capítulo 2  | 129        |
| Generalidades   | 129        |
| Síntesis del análogo 1  | 130        |
| Síntesis del análogo 2  | 134        |
| Síntesis del análogo 3  | 138        |
| Síntesis del análogo 1,11-epoxiprogesterona                     | 147        |
| Síntesis del análogo 4  | 149        |
| Modelado molecular  | 151        |
| 6.2 Capítulo 3  | 152        |
| 6.3 Capítulo 4  | 154        |
| <b>REFERENCIAS</b>  | <b>159</b> |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>  | <b>173</b> |



## ABREVIATURAS

|                    |  |
|--------------------|--|
| 21HS-6,19OP        | 21-hemisuccinoiloxi-6,19-epoxiprogesterona |
| 21OH-6,19OP        | 21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona          |
| Å                  | angstrom                                   |
| Ac <sub>2</sub> O  | anhídrido acético                          |
| AcOEt              | acetato de etilo                           |
| AF-1               | dominio de función de activación 1         |
| AF-2               | dominio de función de activación 2         |
| AP-1               | proteína activadora 1                      |
| AR                 | receptor de andrógenos                     |
| BHK                | células de riñón de hamsters               |
| Bu <sub>4</sub> NF | fluoruro de tetrabutilamonio               |
| Cos-1              | células de riñón de monos                  |
| COSY               | espectro de correlación homonuclear H-H    |
| DAIB               | diacetato de iodobenceno                   |
| DBD                | dominio de unión al ADN                    |
| DEAD               | diazocarboxilato de etilo                  |
| dex                | dexametasona                               |
| DMF                | dimetilformamida                           |
| EM                 | espectroscopía de masa                     |
| EMAR               | espectroscopía de masa de alta resolución  |
| ER                 | receptor de estrógenos                     |
| GABA               | ácido $\gamma$ -aminobutírico              |
| GCs                | glucocorticoides                           |
| GR                 | receptor de glucocorticoides               |
| GR <sup>dim</sup>  | mutante A458T del GR                       |
| GRE                | elemento de respuesta a glucocorticoides   |
| HPA                | eje hipotalámico-pituitario-adrenal        |
| hs                 | horas                                      |
| HSD                | hidroxiesteroide deshidrogenasa            |
| IR                 | infrarojo                                  |
| <i>J</i>           | constante de acomplamiento spin-spin       |
| L929               | fibroblastos de ratón                      |
| LBD                | dominio de unión al ligando                |



|                     |   |
|---------------------|---|
| LBP                 | bolsillo de unión al ligando                |
| lm                  | lumen                                       |
| LUC                 | luciferasa                                  |
| m/z                 | relación masa/carga                         |
| M                   | molar                                       |
| M <sup>+</sup>      | ion molecular                               |
| MCs                 | mineralocorticoides                         |
| MD                  | dinámica molecular                          |
| MeOH                | metanol                                     |
| MHz                 | megahertz                                   |
| min                 | minutos                                     |
| ml                  | mililitro                                   |
| μl                  | microlitro                                  |
| MMTV                | promotor del virus de tumor mamario         |
| MR                  | receptor de mineralocorticoides             |
| NaBH <sub>4</sub>   | borohidruro de sodio                        |
| NFκB                | factor nuclear kappa-B                      |
| nm                  | nanómetro                                   |
| NR                  | receptor nuclear                            |
| ns                  | nanosegundos                                |
| PCC                 | clorocromato de piridonio                   |
| Ph <sub>3</sub> P   | trifenilfosfina                             |
| ppm                 | parte por millón                            |
| PR                  | receptor de progesterona                    |
| Py                  | piridina                                    |
| RMN <sup>13</sup> C | resonancia magnética nuclear de carbono     |
| RMN <sup>1</sup> H  | resonancia magnética nuclear de hidrógeno   |
| RMSD                | desviación cuadrática media                 |
| RU486               | mifeprestona                                |
| Σ                   | ter-butildimetilsililo                      |
| SGRM                | modulador selectivo del GR                  |
| S <sub>N</sub> 2    | sustitución nucleofílica bimolecular        |
| SNC                 | sistema nervioso central                    |
| SNuRM               | modulador selectivo de receptores nucleares |
| SR                  | receptores de esteroides                    |

|           |  |
|-----------|--|
| TAT       | tirosina aminotransferasa                  |
| TBDMSC    | cloruro de ter-butildimetilsililo          |
| THF       | tetrahidrofurano                           |
| TIF2      | factor intermediario de la transcripción 2 |
| TNF       | factor de necrosis tumoral                 |
| W         | watts                                      |
| $W_{1/2}$ | ancho de la señal a media altura           |



# CAPÍTULO 1

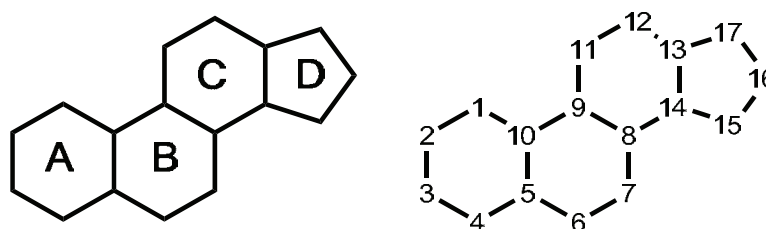
---

## INTRODUCCIÓN



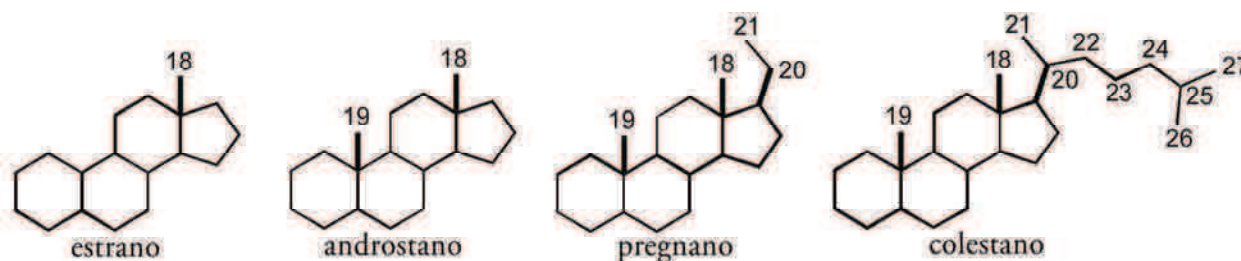
## 1.1 Esteroides

Los esteroides son una clase de compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en la naturaleza. El origen del término *esteroide* se remonta al nombre *colesterina* (formado a partir del sustantivo griego *kholé*, 'bilis', y el adjetivo *stereós*, 'duro, sólido') [1], utilizado en 1815 por Michel Chevreul para nombrar a la sustancia cristalizada a partir de cálculos biliares humanos. A fines de ese mismo siglo, al descubrirse la presencia de un grupo alcohol en esta sustancia, el nombre *colesterina* fue reemplazado por el de *colesterol*. Posteriormente, cuando fueron descubiertos diferentes compuestos de estructura similar al colesterol, todos fueron denominados *esteroides* (término formado sobre la base de *stereós* más un sufijo, *-eidés*, 'que tiene el aspecto de') [2]. De esta manera, el término esteroide no está asociado a una actividad biológica en particular, sino que designa a toda molécula que posee tres anillos de 6 carbonos y uno de 5 carbonos dispuestos de la forma indicada en la Fig. 1.1. Estos átomos de carbono constituyen el esqueleto del esteroide, el cual puede adquirir distintas conformaciones según la forma en la cual están fusionados los anillos y el tipo de grupos funcionales presentes.



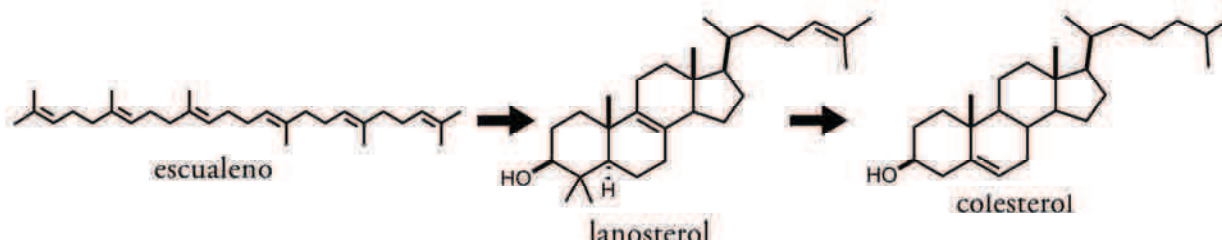
**Figura 1.1** Esqueleto carbonado de los esteroides y su numeración.

Los esteroides se encuentran en animales, plantas y hongos, participando en numerosos procesos fisiológicos esenciales para la vida. De acuerdo al número de átomos de carbono se pueden clasificar en estranos (18 carbonos), androstanos (19 carbonos), pregnanos (21 carbonos) y colestanos (27 carbonos) (Fig. 1.2).



**Figura 1.2** Clasificación de los esteroides según el número de átomos de carbono.

En vertebrados, el esteroide más abundante es el colesterol, el cual se biosintetiza a partir del lanosterol, primer metabolito con estructura esteroidal obtenido por la ciclación del triterpeno escualeno (Fig. 1.3). El colesterol, además de cumplir funciones estructurales en las membranas citoplasmáticas, es el punto de partida de la vía biosintética que conduce al resto de los esteroides.



**Figura 1.3** Biosíntesis del colesterol.

En el organismo humano, los esteroides cumplen una gran cantidad de funciones a través de muy diversos mecanismos de acción. A pesar de que estos mecanismos han sido investigados intensamente desde hace muchos años, actualmente solo algunos de ellos son comprendidos en profundidad. En otros casos, si bien existen ciertos indicios sobre el modo por el cual el esteroide interviene, aún no han podido establecerse con precisión las bases moleculares de acción. Por consiguiente, cualquier clasificación de los distintos mecanismos de acción de los esteroides debe considerarse en forma aproximada. Usualmente, se los suele dividir según la velocidad de la respuesta producida por el esteroide en efectos lentos, asociados a un modo de acción denominado *genómico* y en efectos rápidos, asociados a un modo de acción denominado *no genómico*.

El modo de acción genómico fue el primero en ser descubierto y el mejor comprendido hasta el momento. En este modo los esteroides se unen a receptores específicos intracelulares, los cuales actúan como factores de transcripción regulando la expresión génica de múltiples formas. Debido a que están involucrados procesos relativamente lentos como la transcripción y la traducción de genes, la respuesta final puede demorar desde minutos a horas, e incluso días [3] [4].

En contraste, en el modo de acción no genómico los efectos producidos por el esteroide se alcanzan rápidamente, en el orden de los segundos o menos, y se caracterizan por la insensibilidad a los inhibidores de la transcripción. Si bien la existencia de estos efectos fue informada también hace muchos años, solo en las últimas décadas su estudio ha cobrado real

importancia, habiéndose observado efectos rápidos para casi todos los grupos de esteroides. El modo de acción no genómico involucra muy diversos mecanismos según el tipo de esteroide, entre los que se destacan la modificación de las propiedades fisicoquímicas de las membranas citoplasmáticas, la unión a receptores de membrana, la unión a canales iónicos, o incluso la unión a los receptores clásicos pero que actúan sin modificar la expresión génica [5] [3].

En el presente trabajo se estudian dos de los más importantes grupos de esteroides del organismo humano: las hormonas esteroidales y los neuroesteroides. Mientras que el primer grupo representa el ejemplo clásico de acción genómica, el segundo actúa a través de un modo no genómico.

## 1.2 Hormonas esteroidales

Con el nombre *hormonas esteroidales* se designa a cinco diferentes familias de esteroides que actúan como mensajeros químicos regulados por el SNC. Todas las hormonas esteroidales se sintetizan a partir del colesterol mediante la acción de diferentes enzimas mitocondriales o del retículo endoplásmico liso (Fig. 1.4). Según el órgano desde el cual son mayoritariamente secretadas, estas hormonas se pueden clasificar en gonadales o adrenocorticoides. Las hormonas gonadales, también conocidas como hormonas sexuales, se dividen a su vez en *andrógenos*, *estrógenos* y *progestágenos*, siendo la testosterona, el estradiol y la progesterona, respectivamente, los esteroides más abundantes de cada familia. Los adrenocorticoides son sintetizados en la corteza de la glándula adrenal y se dividen en *glucocorticoides* y *mineralocorticoides*, siendo el cortisol y la aldosterona, respectivamente, los más abundantes.

Las hormonas esteroidales participan en múltiples procesos en el organismo humano, tanto en su desarrollo como en el funcionamiento, por lo tanto no resulta sencillo resumir brevemente los muy variados efectos fisiológicos de cada familia. En base a los primeros efectos descubiertos para estas hormonas, a cada una se le suele asociar una función principal. El *estradiol*, sintetizado a altos niveles en los ovarios de hembras en edad reproductiva, promueve las características sexuales femeninas y participa activamente en el ciclo menstrual. También la *progesterona* es secretada por los ovarios e interviene en el ciclo menstrual, preparando al endometrio para la implantación del embrión; además cumple funciones fundamentales en el mantenimiento del embarazo. La *testosterona* es sintetizada principalmente en los testículos y estimula las características masculinas, manteniendo las glándulas accesorias al sistema reproductor masculino.



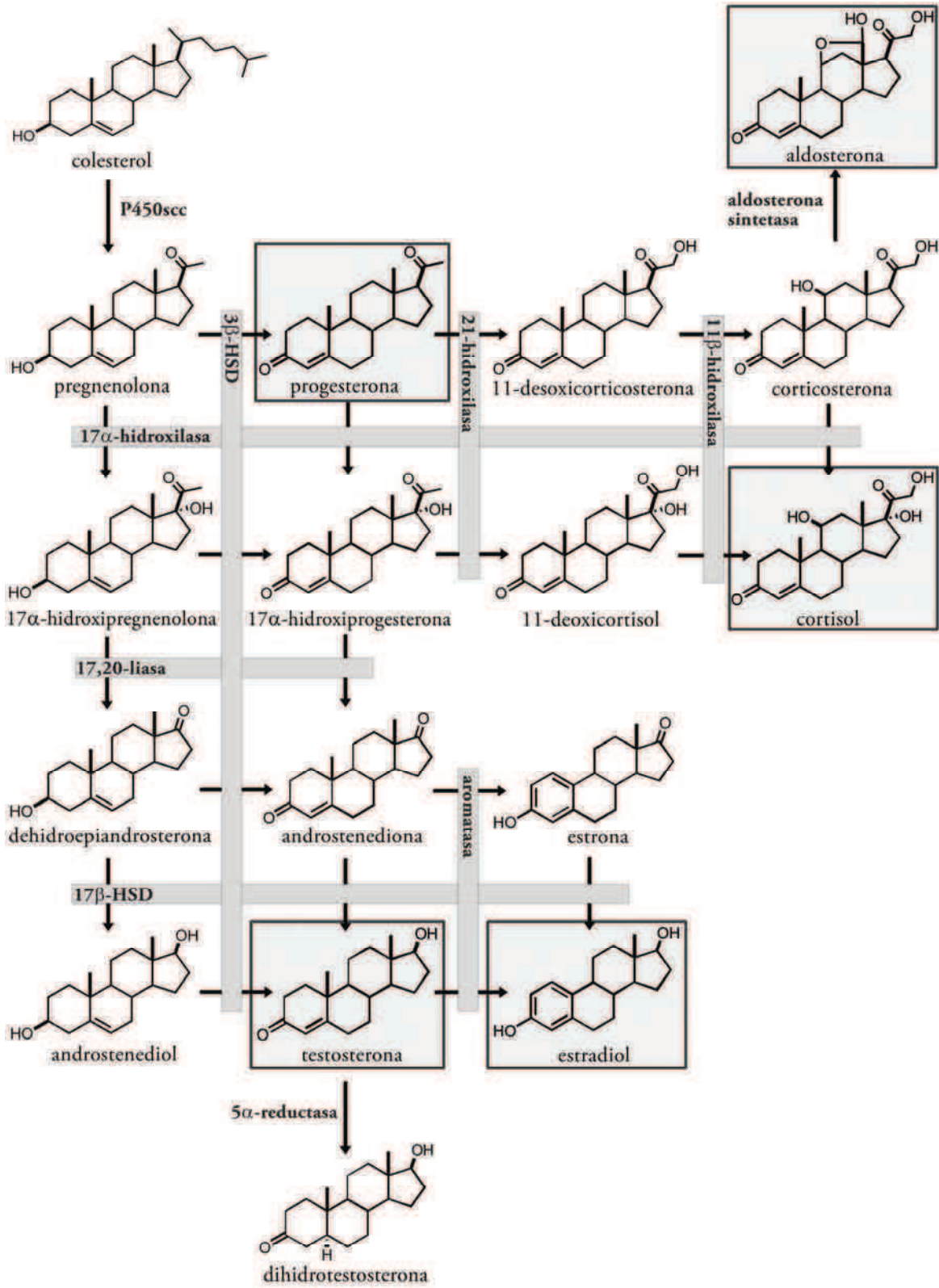


Figura 1.4 Biosíntesis de hormonas esteroidales.

En cuanto a las hormonas adrenocorticoides, la *aldosterona* participa en el mantenimiento del balance electrolítico y del agua, mientras que el *cortisol* participa en numerosos procesos metabólicos, antiinflamatorios y antiinmunes. Cabe resaltar que la anterior descripción de las hormonas esteroidales hace referencia sólo a las funciones principales asociadas a cada una de ellas, existiendo muchas otras que no han sido descritas.

Actualmente se sabe que las hormonas esteroidales actúan tanto a través de mecanismos genómicos como no genómicos. Sin embargo, son los primeros los más profundamente comprendidos y los que se estudiarán en este trabajo para el caso de los glucocorticoides. La acción genómica de las hormonas esteroidales se ejerce a través de su unión a los denominados receptores de esteroides (SR): receptor de andrógenos (AR), receptor de estrógenos (ER), receptor de progestágenos (PR), receptor de mineralocorticoides (MR) y receptor de glucocorticoides (GR). Todos estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (NR), proteínas solubles que actúan regulando específicamente la expresión génica. Aunque las hormonas esteroidales de una familia se unen principalmente a un único receptor, debido al alto grado de similitud de secuencia existente entre estas proteínas, algunas poseen afinidad por más de uno de ellos, fenómeno conocido como interacción cruzada. Por ejemplo, el cortisol puede unirse tanto al GR como al MR, y la progesterona, además de unirse al PR, presenta afinidad por el MR.

Farmacológicamente, los SR constituyen uno de los blancos moleculares más importantes para el desarrollo de drogas, existiendo para cada uno de estos receptores varias drogas en el mercado que regulan su función (Fig. 1.5) [6]. Numerosas enfermedades son tratadas mediante la acción de estas drogas, aunque ninguna puede considerarse libre de graves efectos adversos. Esto se debe a que los SR son receptores claves para el funcionamiento del organismo, finamente regulados por la acción de los ligandos endógenos, de manera que los cambios de actividad provocados por la administración de drogas generalmente causan severos desbalances en el funcionamiento hormonal.

Por lo tanto, es debido principalmente a la propia naturaleza de estos receptores que el desarrollo de drogas que actúan a través de algún SR representa un arduo desafío. Uno de los principales inconvenientes reside en que la actividad de un compuesto unido a un SR depende fuertemente del tipo celular. Ligandos que actúan como agonistas de un SR en ciertos tejidos pueden actuar como antagonistas en otros. Así, el descubrimiento de un compuesto con capacidad de unirse a un SR debe acompañarse con un exhaustivo examen de su actividad en diferentes tipos celulares. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, dado el alto grado de

similitud de secuencia entre los SR, muchas drogas presentan interacciones cruzadas con uno o más receptores, lo cual limita ampliamente su utilidad.

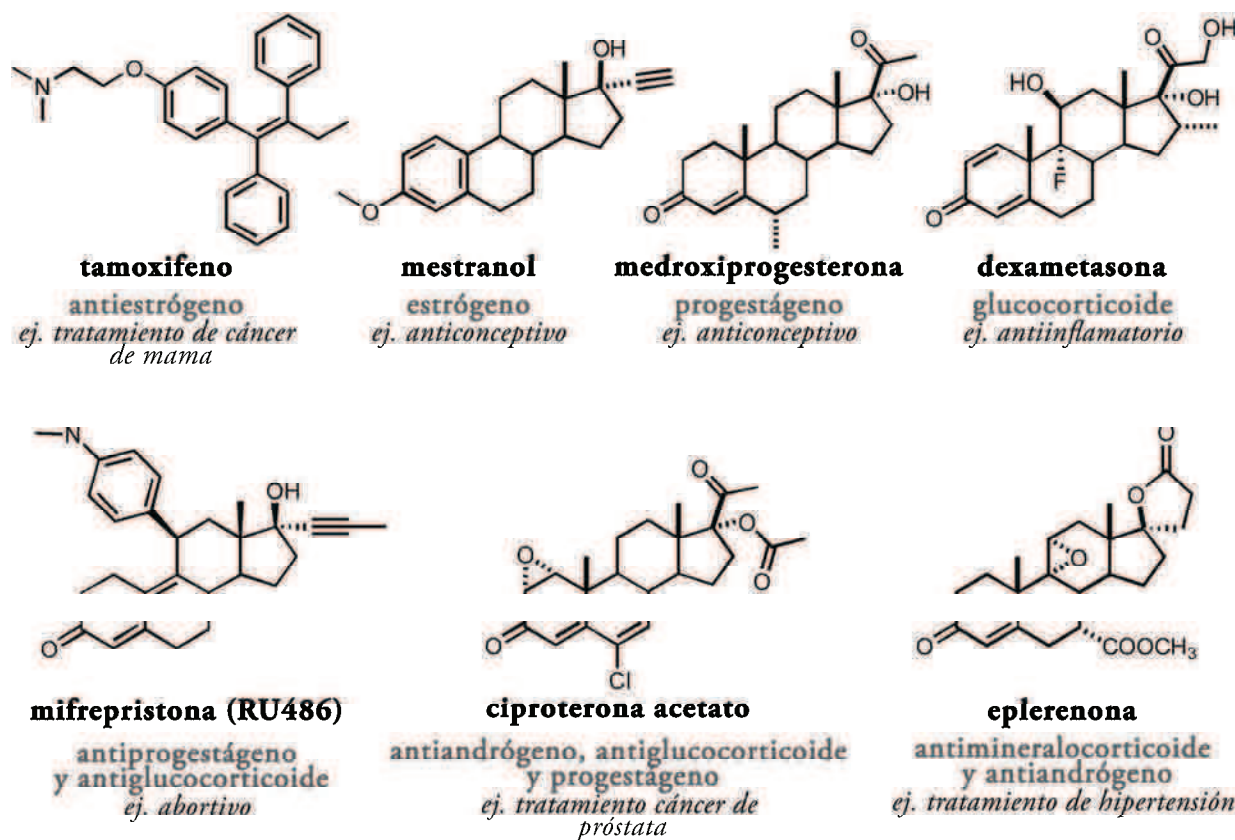


Figura 1.5 Algunas drogas que actúan a través de los SR y ejemplos de aplicación

### 1.3 Neuroesteroides

El término *neuroesteroide* fue introducido por Baulieu en 1981 para referirse al sulfato de dehidroepiandrosterano (DHEAS) al descubrirse que este esteroide es sintetizado en el cerebro. Actualmente, todos los esteroides sintetizados en el cerebro son considerados neuroesteroides, mientras que el nombre *esteroide neuroactivo* se refiere a los esteroides que, independientemente del origen, son capaces de modificar la actividad neuronal [7]. Al igual que las hormonas esteroidales, los neuroesteroides se sintetizan a partir del colesterol via pregnenolona por la acción de enzimas específicas (Fig. 1.6). Los metabolitos reducidos de progesterona, 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (allopregnanolona) y 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (pregnanolona), o el metabolito reducido de 11-desoxicorticosterona, 3 $\alpha$ ,21-dihidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona

(allotetrahidroDOC), se encuentran entre los neuroesteroides más abundantes [8]. Varios procesos fisiológicos y patológicos involucran cambios en los niveles de neuroesteroides en el organismo, como por ejemplo estados de estrés, depresión, embarazo y envejecimiento. Los neuroesteroides actúan principalmente mediante un modo de acción no genómico rápido, alterando la excitabilidad neuronal a través de la interacción con diferentes canales iónicos.

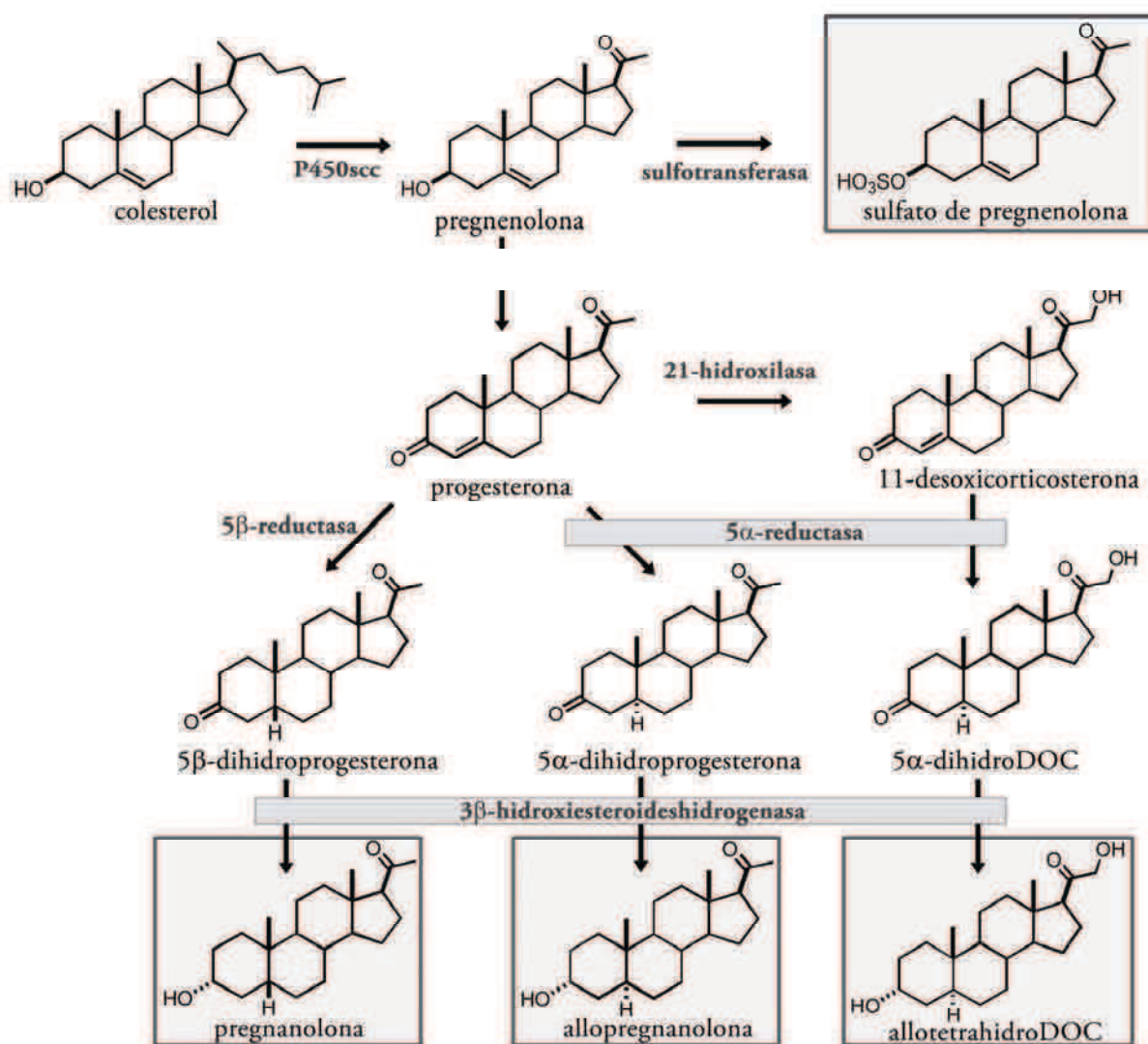


Figura 1.6 Biosíntesis de esteroides neuroactivos naturales

El mecanismo mejor estudiado es el de la interacción de los neuroesteroides con el receptor GABA<sub>A</sub> del neurotransmisor ácido γ-aminobutírico (GABA). Este neurotransmisor

regula la mayor parte de los procesos inhibitorios en el cerebro, interviniendo en el control de numerosas funciones (motricidad, secreciones neuroendócrinas, etc) y participando en el desarrollo de ciertas enfermedades neurológicas y psiquiátricas (epilepsia, enfermedad de Parkinson, etc). El receptor  $GABA_A$  es una proteína de membrana constituida por cinco subunidades que forman un canal selectivo para el pasaje de iones cloruros desde el medio extracelular hacia el interior de la neurona. La unión del GABA al receptor provoca la apertura del canal selectivo, aumentando la conductividad de la membrana celular y produciendo una hiperpolarización que inhibe la transmisión neuronal. Además del GABA, la actividad del  $GABA_A$  puede ser modulada por una variedad de agentes estructuralmente diferentes, los cuales actúan alostéricamente vía sitios de unión específicos en el receptor. Las benzodiazepinas, los barbitúricos, el etanol, los anestésicos volátiles (haloetano, isoflurano, etc), la picrotoxina, y los esteroides neuroactivos son ejemplos de compuestos que regulan la actividad de este receptor.

Según el neuroesteroide, y su concentración, existen tres diferentes efectos sobre el  $GABA_A$ : potenciación de la acción de GABA, activación directa del canal e inhibición de la acción de GABA. La allopregnanolona y la pregnanolona (Fig. 1.6) son ejemplos de neuroesteroides que potencian la acción del GABA o activan directamente el pasaje de iones cloruro. Por otra parte, esteroides con un grupo sulfato en el C-3, como por ejemplo el sulfato de pregnenolona (Fig. 1.6), funcionan como antagonistas no competitivos de GABA [9].

Evaluaciones clínicas y preclínicas han demostrado la eficacia de varios esteroides neuroactivos en el tratamiento de diversas fisiopatologías del sistema nervioso central. Por ejemplo, se describió su potencial uso como anestésicos, anticonvulsivos, sedantes, hipnóticos, ansiolíticos y en el tratamiento de ciertos casos de drogadependencia. Particularmente interesante desde el punto de vista terapéutico, es el efecto anticonvulsivo de estos esteroides que poseen un perfil similar a las drogas antiepilépticas clásicas. Sin embargo, a diferencia de los anticonvulsivos clásicos, los esteroides neuroactivos son eficaces en el tratamiento de convulsiones y estados epilépticos provocados por la intoxicación con cocaína en humanos [10].

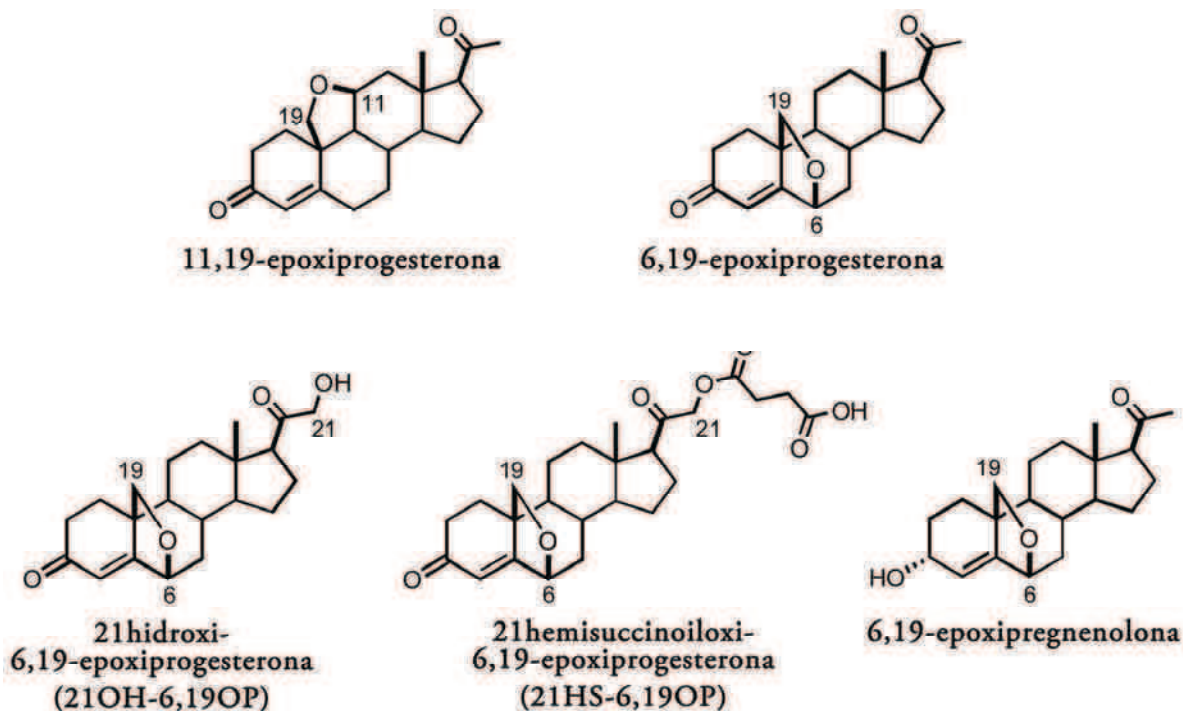
## 1.4 Análogos rígidos de hormonas esteroidales y de esteroides neuroactivos

Los esteroides no son moléculas rígidas. Por el contrario, el esqueleto carbonado de un esteroide es una estructura que posee alta flexibilidad, cuya conformación depende de los grupos funcionales unidos, así como del entorno presente. Debido a esta flexibilidad, los esteroides pueden adaptar su conformación e interactuar favorablemente con sitios de unión de diferentes proteínas, como ocurre en el caso de las hormonas esteroidales. Por lo tanto, a la hora de estudiar

las relaciones estructura-actividad de un esteroide en un determinado sitio de unión, no sólo importan los grupos funcionales presentes y su orientación, sino también la flexibilidad del esqueleto esteroideal, que determinará en última instancia el comportamiento de la molécula.

Una manera de fijar la conformación de una molécula y disminuir su flexibilidad es mediante la introducción de puentes intramoleculares. Esta metodología, ampliamente utilizada en química medicinal, puede también observarse en la naturaleza. Por ejemplo, en la aldosterona, la formación de un puente intramolecular entre las posiciones 11 y 18 favorece una conformación globalmente plana, adecuada para la interacción con el MR. Utilizando este concepto, y con el objetivo de aumentar la especificidad de los esteroides por sus receptores, en nuestro grupo de investigación se diseñaron y sintetizaron variados esteroides con puentes intramoleculares, análogos rígidos de hormonas esteroideas y neuroesteroides. Dependiendo de las posiciones involucradas y de la longitud del puente (tipo y número de átomos) se obtuvieron estructuras con distinto grado de rigidez y deformación [11-21].

En particular, fueron sintetizados varios análogos rígidos con puentes epóxido que resultaron biológicamente activos. En primer lugar se sintetizó el compuesto 11,19-epoxiprogestero (Fig. 1.7), en el cual la introducción de un oxígeno puente entre los carbonos C-11 y C-19 en la molécula de progesterona da una estructura rígida globalmente plana, similar a la de la aldosterona.



**Figura 1.7** Análogos rígidos de hormonas esteroideas y neuroesteroides con puente epóxido.

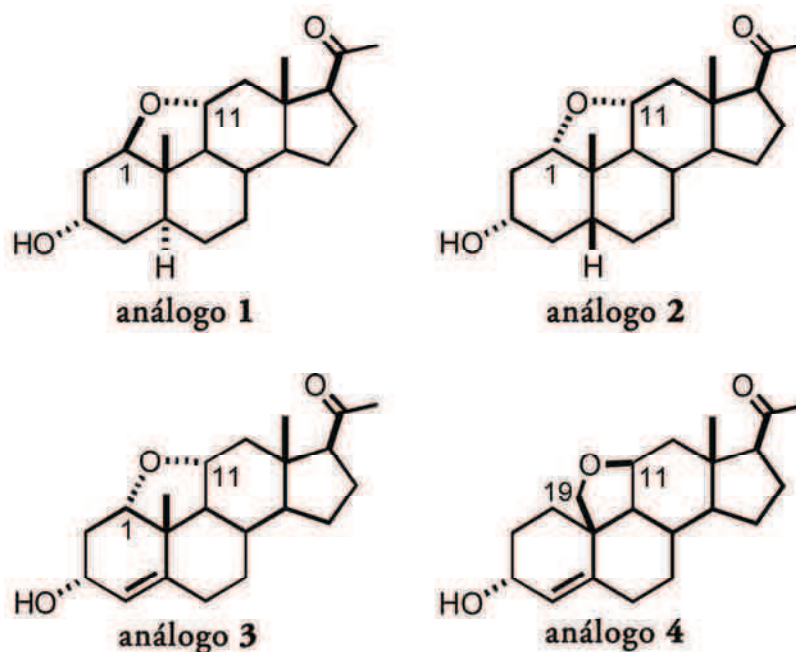
Estudios biológicos realizados con este análogo rígido mostraron que posee afinidad por el MR y que presenta potentes propiedades sodioorientadoras [22]. En contraste, la introducción de un puente epóxido entre C-6 y C-19 condujo a una estructura con una curvatura pronunciada en la zona de anillos A/B (6,19-epoxiprogesterona). Si bien este esteroide no presentó actividad glucocorticoide ni mineralocorticoide, la introducción de un hidroxilo en C-21 condujo a un análogo rígido, 21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona (21OH-6,19OP), con afinidad por el GR. Al evaluarse la actividad glucocorticoide de dicho compuesto en diferentes ensayos, se observó que el mismo se comportaba como un antiglucocorticoide puro [14] [23]. Además, 21OH-6,19OP no presentó afinidad por el PR ni por el MR, lo cual lo hace un potencial antiglucocorticoide específico. Por otra parte, la introducción de un grupo hemisuccinato en posición 21 condujo a un compuesto (21HS-6,19OP) que en estudios preliminares también mostró notables e interesantes propiedades glucocorticoides. Una parte de este trabajo de tesis consiste en el estudio de la actividad glucocorticoide y las bases moleculares de acción de los análogos rígidos 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP.

A partir de la introducción del puente epóxido 6,19, también fue sintetizado el compuesto 6,19-epoxipregnenolona (Fig. 1.7), análogo rígido del neuroesteroide pregnanolona (Fig. 1.6), el cual resultó un potente anticonvulsivo *in vivo* [17].

## 1.5 Objetivos

Como su título lo indica, el objetivo general de esta tesis es la obtención y el estudio de diferentes análogos rígidos de esteroides neuroactivos y hormonas esteroidales. El trabajo realizado corresponde al área de la química medicinal, e involucra diferentes disciplinas: síntesis orgánica, ensayos de actividad biológica y química computacional. Distintas técnicas de cada una de estas disciplinas fueron empleadas con el objetivo de continuar y profundizar la investigación sobre los análogos rígidos de esteroides con puentes epóxido en posiciones seleccionadas. En tal sentido se plantearon dos estrategias diferentes en función del conocimiento previo que se disponía y que se describió en la sección anterior.

En el caso de los esteroides neuroactivos, no existía información sobre la influencia de la deformación controlada del esqueleto esteroide en la zona crítica de los anillos A/B, la cual generaría cambios en la orientación del hidroxilo en posición  $3\alpha$  y en la distancia entre ese hidroxilo y el grupo 20-ceto. Se eligió como base para este estudio una serie de tres 1,11-epoxiesteroides (análogo 1-3) y un 11,19-epoxiesteroide (análogo 4), que requirieron el desarrollo de estrategias específicas de síntesis para cada caso (Fig. 2.18).



**Figura 1.8** Análogos rígidos de neuroesteroides sintetizados en esta tesis

En el caso de los análogos de glucocorticoides se contaba con información sobre la notable especificidad de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP hacia el GR, así como con estudios preliminares de sus actividades. No se sabía sin embargo, el modo de acción de estos análogos a nivel molecular ni las razones por las cuales la introducción del grupo hemisuccinato provocaba un cambio tan dramático en la actividad. Resultaba necesario para profundizar en el desarrollo de nuevos moduladores de la acción glucocorticoide obtener un perfil de actividad más amplio de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP mediante ensayos biológicos especialmente seleccionados. Por otra parte, era imprescindible para racionalizar e interpretar los resultados de actividad, tener información sobre las bases moleculares del mecanismo de acción de ambos compuestos. Para alcanzar este objetivo, se eligió una aproximación computacional.

En los capítulos que siguen se presentan los resultados obtenidos y las conclusiones en función de los objetivos planteados.





# CAPÍTULO 2

---

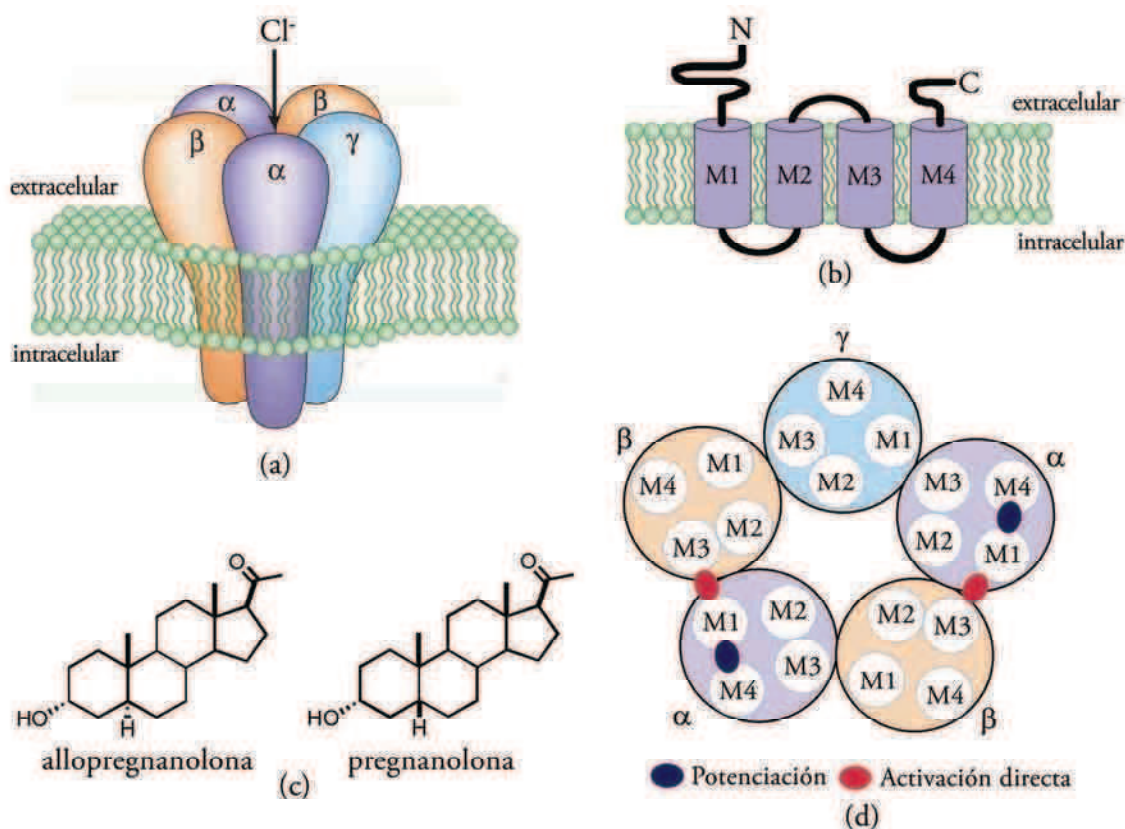
## SÍNTESIS DE ANÁLOGOS RÍGIDOS DE ESTEROIDES NEUROACTIVOS



En este capítulo se describen las estrategias sintéticas empleadas para la obtención de nuevos análogos rígidos de esteroides neuroactivos con puente epóxido. Además, se presentan los resultados obtenidos al investigar, mediante métodos de modelado molecular, el mecanismo involucrado en la reacción de ciclación que conduce a la formación de puentes 1,11-epóxido. Finalmente, se informan los resultados de actividad biológica de estos compuestos.

## 2.1 El receptor GABA<sub>A</sub> y los neuroesteroides

Como se mencionó en el capítulo anterior<sup>1</sup>, los neuroesteroides actúan principalmente modulando la actividad del receptor GABA<sub>A</sub>. Este receptor pertenece a la superfamilia de canales iónicos manejados por ligando denominada Cys-loop, y está formado por el ensamblaje de cinco subunidades: dos subunidades  $\alpha$ , dos subunidades  $\beta$  y una subunidad adicional, generalmente  $\gamma$ , aunque a veces puede ser  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\pi$  o  $\theta$  (Fig. 2.1a).



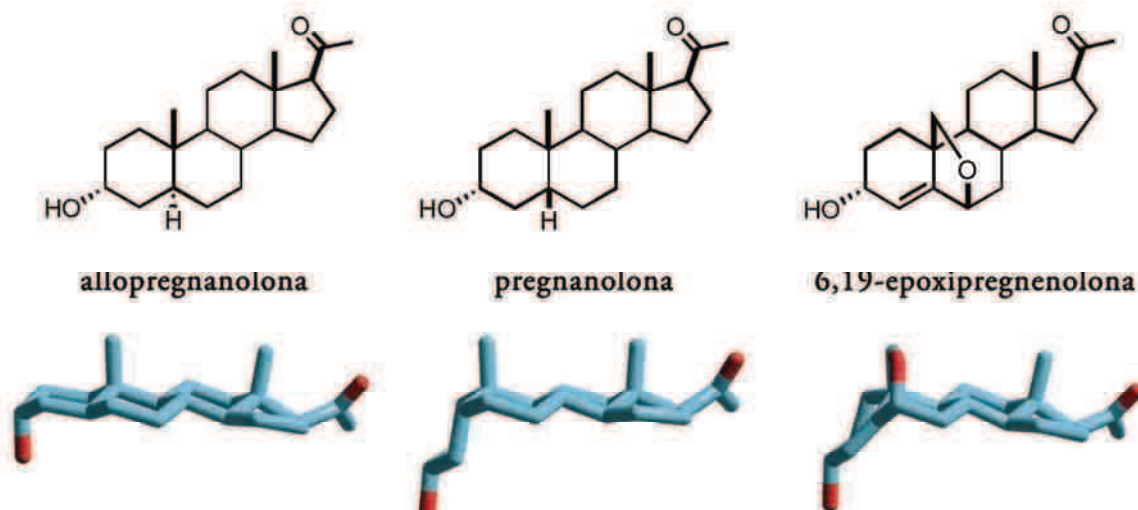
**Figura 2.1** a) Estructura del receptor GABA<sub>A</sub> b) Dominios de cada subunidad c) Neuroesteroides endógenos: allopregnanolona y pregnanolona d) Probables sitios de unión de los neuroesteroides en el GABA<sub>A</sub>

<sup>1</sup> Capítulo 1, sección 3

Cada subunidad posee alrededor de 450 residuos distribuidos en tres dominios: un dominio extracelular, un dominio transmembranar y un dominio intracelular (Fig. 2.1b). Estudios de clonado molecular han determinado que existen 6 isoformas para la subunidad  $\alpha$ , tres isoformas para la subunidad  $\beta$  y 3 isoformas para la subunidad  $\gamma$ , siendo la combinación  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  la más abundante en el cerebro de mamíferos. Además del sitio de unión para el GABA, en el GABA<sub>A</sub> se han identificado distintos sitios en los dominios extracelular y transmembranar en los cuales la unión de diferentes especies químicas produce variados efectos sobre la apertura del canal.

Los neuroesteroides como allopregnanolona y pregnanolona (Fig. 2.1c) pueden tanto potenciar la actividad del GABA, a concentraciones del orden nanomolar, como activar directamente la apertura del canal a concentraciones mayores, del orden micromolar. De acuerdo a estudios mutacionales recientemente realizados, existen por lo menos dos sitios en el receptor GABA<sub>A</sub> para la unión de esteroides (Fig. 2.1d) [24]. El sitio localizado entre las hélices transmembrana M1 y M4 de la subunidad  $\alpha$  estaría involucrado en el efecto de potenciación de los neuroesteroides, mientras que otro sitio, localizado entre la hélice M1 de la subunidad  $\alpha$  y la hélice M3 de la subunidad  $\beta$ , sería responsable de la apertura directa del canal.

Si bien la allopregnanolona y la pregnanolona poseen idénticos grupos funcionales, la conformación global del esqueleto esteroidal difiere notablemente debido a la forma en la cual están fusionados los anillos A y B (Fig. 2.2).



**Figura 2.2** Geometrías optimizadas HF/6-31G\*\* de allopregnanolona, pregnanolona y 6,19-epoxipregnenolona

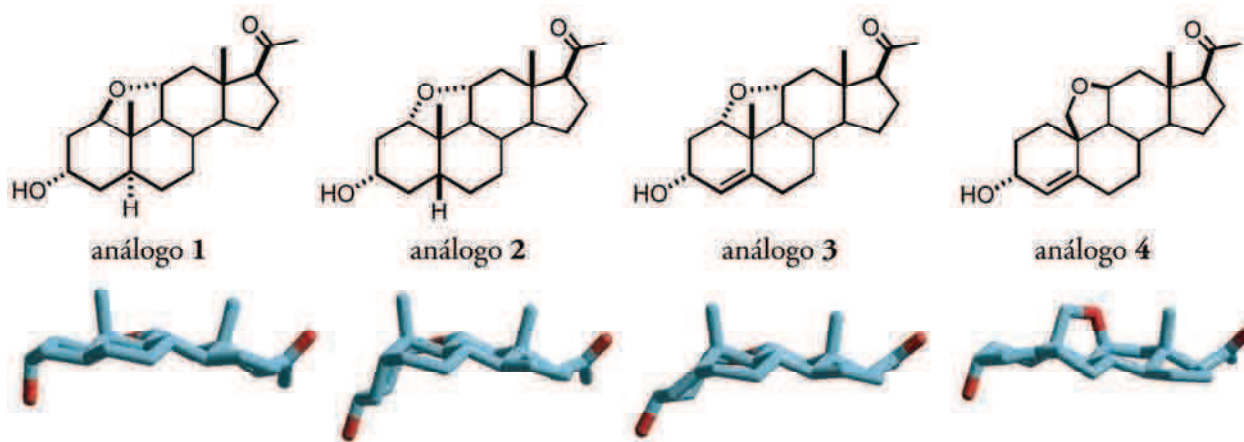
En la configuración *trans* ( $5\alpha$ ,  $10\beta$ ) de la allopregnanolona el esteroide adquiere una conformación globalmente plana, mientras que en la pregnanolona la configuración *cis* ( $5\beta$ ,  $10\beta$ ) conduce a una conformación torsionada, con el anillo A orientado hacia la cara alfa del esteroide. A pesar de esta gran diferencia en la conformación global del esqueleto esteroideal, la allopregnanolona y la pregnanolona poseen un efecto anestésico similar en ratones y ratas [20]. Resulta evidente entonces que el GABA<sub>A</sub> posee la capacidad de acomodar tanto un esteroide de estructura plana como uno de estructura torsionada. Además, estudios de la relación estructura-actividad realizados con una gran variedad de análogos sintéticos de neuroesteroides proponen un modelo de farmacóforo en el cual la fusión entre anillos A y B puede ser *trans* o *cis*, con grupos polares en los extremos de la molécula: un hidroxilo con estereoquímica  $\alpha$  en posición 3 y un grupo aceptor de puente de hidrógeno en la posición 20 (si bien este modelo es incompleto y existen algunas excepciones, resume las características más comunes de los compuestos activos). Recientemente, Veleiro y Burton publicaron un trabajo de revisión sobre las relaciones estructura-actividad de esteroides neuroactivos [25].

Por lo expuesto, la obtención y el estudio de análogos rígidos de neuroesteroides con una conformación plana similar a la de allopregnanolona o torsionada similar a la de pregnanolona resulta de gran interés, tanto desde el punto de vista farmacológico, como para la investigación de las bases moleculares de acción de los neuroesteroides. Anteriormente, en nuestro grupo de investigación se sintetizó el análogo rígido de neuroesteroides 6,19-epoxipregnenolona, en el cual la introducción de un puente 6,19 conduce a una conformación torsionada, semejante a la de la pregnanolona (Fig. 2.2). Al evaluar la actividad como modulador alostérico del receptor GABA<sub>A</sub> utilizando sinaptoneurosomas de corteza cerebral en hamsters, se observó que el flujo de iones cloruro inducido por 6,19-epoxipregnenolona resultó mayor al inducido por pregnanolona, y similar al inducido por allopregnanolona en concentraciones de 0,1 a 100  $\mu$ M. Por otra parte, en estudios *in vivo* con hamsters utilizando el ácido 3-mercaptopropiónico como agente inductor de convulsiones, se observó un efecto anticonvulsivo significativo con 6,19-epoxipregnenolona a dosis entre 20 y 50 mg/kg p.c. [17].

Teniendo en cuenta estos prometedores resultados biológicos observados con 6,19-epoxipregnenolona, en este trabajo se sintetizaron nuevos análogos rígidos de allopregnanolona y pregnanolona (Fig. 2.3) a partir de la introducción de diferentes puentes epóxido intramoleculares en el esqueleto esteroideal. Por un lado se sintetizaron tres análogos que poseen un puente epóxido conectando los átomos C-1 y C-11 (análogos **1**, **2** y **3**), y por otro lado se sintetizó el análogo rígido **4**, con un puente epóxido entre los átomos C-11 y C-19. Como se

muestra en la Fig 2.3, la introducción de un puente  $1\alpha,11\alpha$  (**2** y **3**) conduce a una conformación global torsionada, semejante a la de la pregnanolona, mientras que la introducción de un puente  $1\beta,11\alpha$  (**1**) conduce a una conformación global plana del esteroide, semejante a la de la allopregnanolona. En cuanto al análogo **4**, como se mencionó en el capítulo anterior<sup>2</sup>, la introducción de un puente  $11\beta,19$  también da lugar a una conformación global plana.

Todos estos nuevos análogos rígidos fueron sintetizados a partir del esteroide comercial  $11\alpha$ -hidroxiprogesterona y utilizando la reacción de funcionalización remota denominada *reacción de hipoiodito* para la formación del ciclo intramolecular correspondiente (reacción de ciclación).



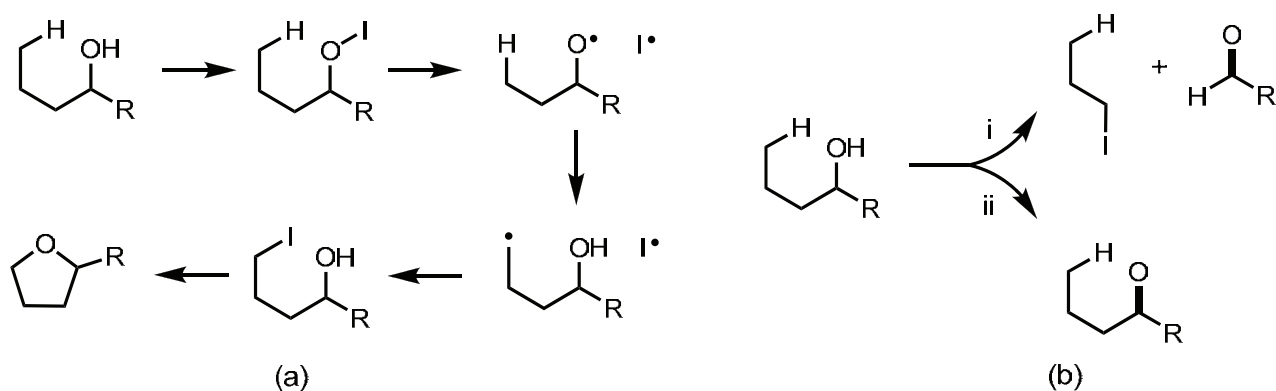
**Figura 2.3** Análogos rígidos sintetizados en este trabajo y sus geometrías optimizadas HF/6-31G\*\*

## 2.2 Reacción de ciclación. Reacción de hipoiodito

La funcionalización intramolecular de carbonos no activados iniciada por radicales, en particular por radicales alcóxilo, ha sido tema de numerosos trabajos de revisión [26] [27]. Heusler y Kalvoda introdujeron el término *reacción de hipoiodito* para describir la ruptura homolítica de hipoioditos de alquilo [26]. El mecanismo general de esta reacción para la formación del éter intramolecular se describe en la Fig. 2.4a. Los hipoioditos de alquilo son generados *in situ* a partir de la reacción del alcohol correspondiente con reactivos como N-iodosuccinimida, acilhypoioditos o diacetato de iodobenceno (DAIB). La ruptura homolítica de los hipoioditos de alquilo puede ser inducida por calor o por irradiación con luz visible, y se

<sup>2</sup> Capítulo 1, sección 4

acelera en presencia de átomos de iodo. Una adecuada concentración de átomos de iodo se obtiene por irradiación de  $I_2$  disuelto con luz de una longitud de onda entre 500 y 550 nm, en la región de la principal banda de absorción del iodo (522 nm en hidrocarburos saturados y 512 nm en hidrocarburos halogenados). El estado de transición más favorable para la transferencia intramolecular de hidrógeno es un anillo de 6 miembros en forma de silla, consecuentemente, el hidrógeno ubicado en el átomo de carbono  $\delta$  es atacado preferentemente, dando lugar a la formación de compuestos de tipo tetrahidrofurano (Fig. 2.4a).



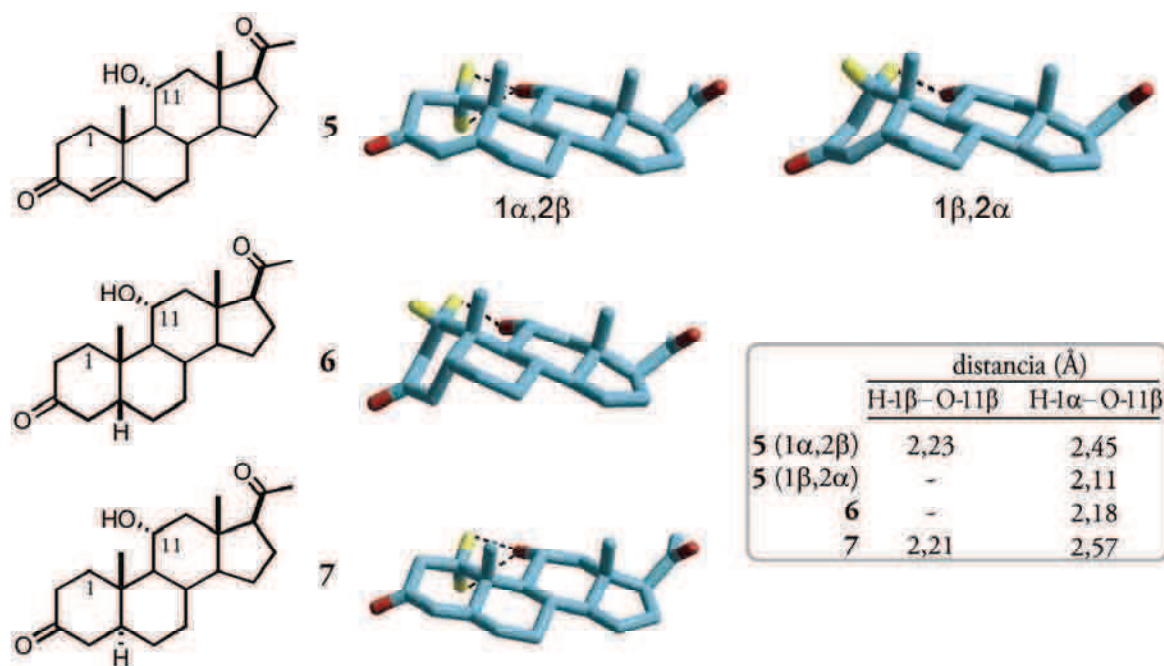
**Figura 2.4** Reacción de hipiodito **a)** Mecanismo de la reacción de ciclación intramolecular generada por DAIB/ $I_2/h\nu$  **b)** Reacciones secundarias: i)  $\beta$ -fragmentación, ii) oxidación

Si no se encuentra un hidrógeno a la distancia óptima para la transferencia intramolecular (menor de  $3\text{\AA}$ ), el radical alcoilo puede reaccionar según otros caminos energéticamente favorables. Las reacciones competitivas más importantes son la  $\beta$ -fragmentación y la oxidación de alcoholes secundarios a cetonas (Fig. 2.4b).

### 2.3 Antecedentes: obtención de 1,11-epoxiesteroides

En trabajos previos, en nuestro grupo de investigación se estudió la formación de puentes 1,11-epóxido aplicando la reacción de hipiodito (DAIB/ $I_2/h\nu$ ) sobre diferentes  $11\alpha$ -hidroxiesteroides:  $11\alpha$ -hidroxiprogesterona (**5**) y los derivados reducidos en posición 5, compuestos **6** y **7** (Fig. 2.5). Determinando las estructuras de mínima energía de estos compuestos puede observarse que para todos existe al menos un hidrógeno del C-1 a la distancia adecuada para que ocurra la transferencia intramolecular de hidrógeno, paso inicial de la reacción de ciclación.





**Figura 2.5** Geometrías optimizadas AM-1 de los compuestos 5, 6 y 7

En esteroides  $\Delta^4$  como 5, el anillo A puede encontrarse en una conformación *cuasi-trans* ( $1\alpha,2\beta$ ) o en una conformación *cuasi-cis* ( $1\beta,2\alpha$ ), siendo la primera generalmente la más estable. En la conformación *cuasi-trans* de 5 y en el compuesto 7 ambos hidrógenos del C-1 están a menos de 3 Å de distancia del oxígeno del hidroxilo  $11\alpha$ , pero teniendo en cuenta que el estado de transición más favorable para la transferencia intramolecular de hidrógeno es un anillo de 6 miembros en forma de silla, se espera que sea el H $\beta$  el que intervenga en la reacción. En cambio, en la conformación *cuasi-cis* ( $1\beta,2\alpha$ ) de 5 y en el compuesto 6 solamente el H $\alpha$  está ubicado en una posición adecuada para el desarrollo de la reacción.

La Fig. 2.6 resume los resultados obtenidos al probar la reacción de ciclación sobre los compuestos 5, 6 y 7 [20]. Únicamente en el caso del compuesto 7 se obtuvo el puente epóxido esperado, con un rendimiento del 66%. Con los compuestos 5 y 6 se obtuvieron los correspondientes  $\Delta^1$  derivados, con rendimientos del 87% y 88% respectivamente. Además, en el caso del compuesto 6 se aisló el intermediario iodado en posición 1 al usar menos equivalentes de los reactivos (DAIB/I<sub>2</sub>). Cuando la reacción de ciclación se ensayó sobre el  $3\alpha$ -acetoxi- $11\alpha$ -hidroxi- $5\beta$ -pregnano 9, se obtuvo el compuesto 10 con el puente epóxido  $1\alpha,11\alpha$  con 89% de rendimiento.

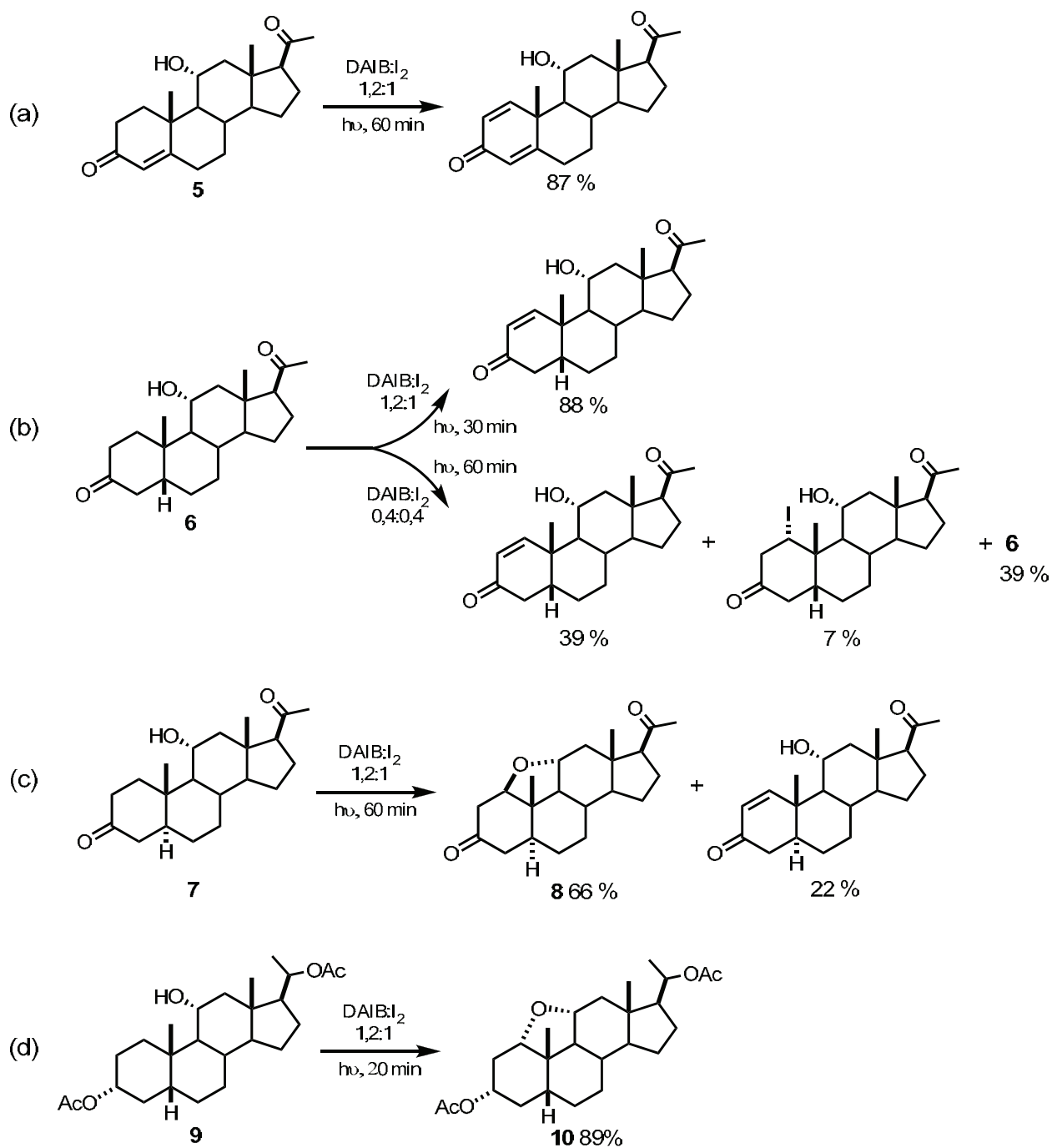


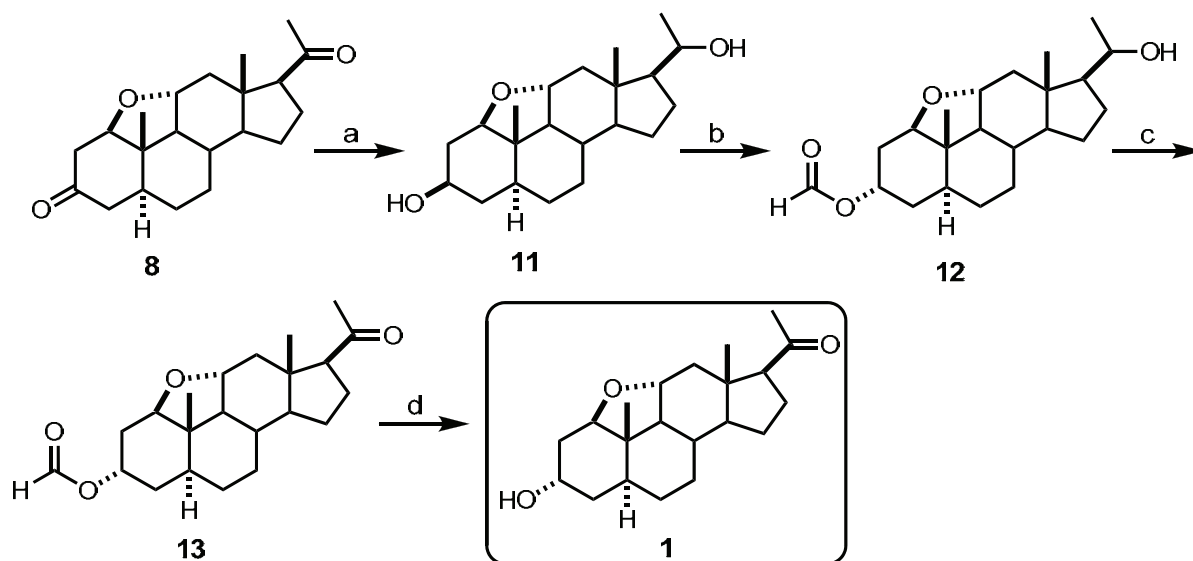
Figura 2.6 Antecedentes de la reacción de ciclación con diferentes 11 $\alpha$ -hidroxiesteroides

## 2.4 Síntesis de nuevos análogos rígidos con puentes 1,11-epóxido

En base a los antecedentes previos de la reacción de ciclación sobre 11 $\alpha$ -hidroxiesteroides, en este trabajo de tesis se desarrollaron diversas estrategias sintéticas para la obtención de los análogos 1-3.

### Síntesis del análogo 1

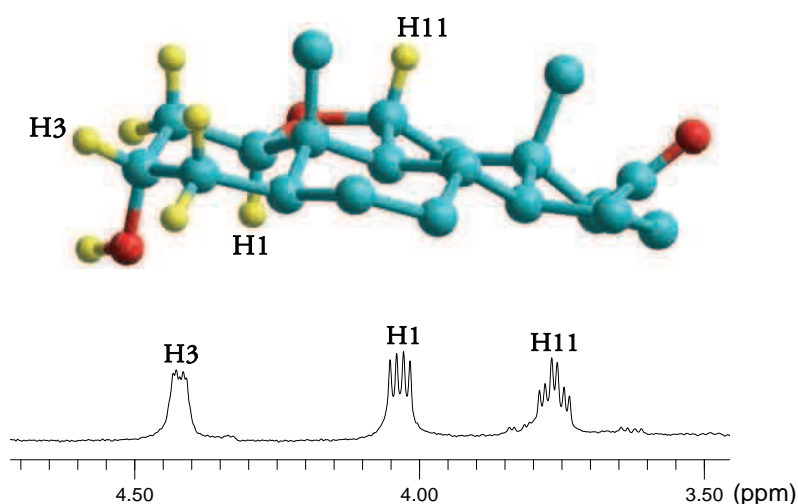
El análogo 1 se sintetizó a partir de 8 empleando el camino sintético representado en el Esquema 2.1. El compuesto 8 se obtuvo siguiendo la técnica empleada anteriormente en nuestro grupo de investigación [20].



**Esquema 2.1** *Reactivos:* a) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25°C, 90 min; b) Ph<sub>3</sub>P, HCOOH, DEAD, THF, 25°C, 14 hs; c) PCC, BaCO<sub>3</sub>, MS 3 Å, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25°C, 30 min; d) KHCO<sub>3</sub>, MeOH, 25 °C, 15 min.

Por reducción de 8 con NaBH<sub>4</sub> en metanol a 25 °C se obtuvo el 3 $\beta$ ,20 $\beta$ -diol 11 como producto mayoritario. La inversión de la configuración del carbono 3 se logró mediante la reacción de Mitsunobu [28] por tratamiento del diol 11 con DEAD, Ph<sub>3</sub>P y HCO<sub>2</sub>H. Cabe destacar que esta reacción tiene lugar selectivamente sobre el C-3, sin verse afectado el hidroxilo en posición 20. Por último, la oxidación del compuesto 12 con PCC en presencia de BaCO<sub>3</sub> y tamiz molecular 3 Å, seguida de hidrólisis suave del formiato en posición 3 usando KHCO<sub>3</sub> en metanol, condujo al análogo 1 con un 27 % de rendimiento desde 8.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1** (Fig. 2.7 y Tabla 2.1) mostró un singulete ancho no resuelto a  $\delta$  4,42 ( $W_{1/2} = 8,5$  Hz) correspondiente al H-3. La ausencia de acoplamiento axial-axial confirmó la orientación ecuatorial asignada a dicho hidrógeno. La señal a 4,03 ppm correspondiente al H-1 se observó como un doblete con constantes de acoplamiento 11,8 y 5,7 Hz, lo cual es consistente con un acoplamiento tipo axial-axial y otro axial-ecuatorial con los protones del C-2, confirmando la orientación  $\alpha$  asignada al H-1. La presencia de un  $1\beta,11\alpha$ -epóxido concuerda además con la existencia del doblete (  $J = 11,0, 10,5$  y  $4,8$ ) a 3,77 ppm asignado al H-11.



**Figura 2.7** Estructura HF/6-31G\*\* del análogo **1** y espectro RMN  $^1\text{H}$

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabla 2.1) se observaron señales correspondientes a tres carbonos oxigenados a  $\delta$  68,2, 73,9 y 83,3 asignados respectivamente a los carbonos 3, 11 y 1. La estructura del compuesto **1** se confirmó mediante espectroscopía RMN 2D y espectrometría de masa.

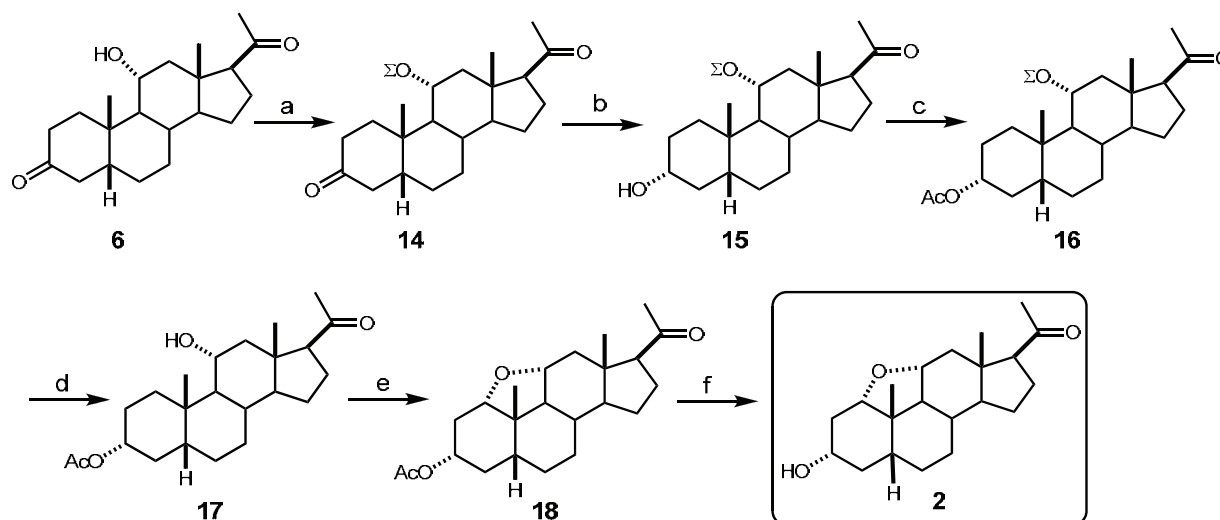
### Síntesis del análogo 2

Como se mencionó anteriormente, la reacción de hipiodito sobre **6** no conduce a la formación del puente epóxido intramolecular sino al compuesto 3-ceto  $\alpha,\beta$ -insaturado, mientras que partiendo del 3-acetato **9** se obtiene el ciclo deseado (Fig. 2.6).

|           | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |           | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |
|-----------|------------------------------|---------------------------|---------|-----------|------------------------------|---------------------------|---------|
|           |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |           |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |
| <b>1</b>  | 83,3                         |                           | 4,03    | <b>12</b> | 43,2                         | 1,35                      | 2,42    |
| <b>2</b>  | 34,8                         | 2,08                      | 1,63    | <b>13</b> | 48,4                         |                           |         |
| <b>3</b>  | 68,2                         |                           | 4,42    | <b>14</b> | 58,8                         |                           | 1,27    |
| <b>4</b>  | 33,6                         | 1,19                      | 1,94    | <b>15</b> | 22,8                         | 1,71                      | 1,23    |
| <b>5</b>  | 43,2                         |                           | 1,87    | <b>16</b> | 24,4                         | 1,71                      | 2,24    |
| <b>6</b>  | 32,4                         | 1,93                      | 1,93    | <b>17</b> | 61,6                         |                           | 2,65    |
| <b>7</b>  | 26,7                         | 1,54                      | 1,54    | <b>18</b> | 14,6                         |                           | 0,64    |
| <b>8</b>  | 31,3                         |                           | 1,65    | <b>19</b> | 15,6                         |                           | 0,94    |
| <b>9</b>  | 64,4                         |                           | 0,97    | <b>20</b> | 209,2                        |                           |         |
| <b>10</b> | 38,1                         |                           |         | <b>21</b> | 31,9                         |                           | 2,12    |
| <b>11</b> | 73,9                         |                           | 3,77    |           |                              |                           |         |

**Tabla 2.1** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) del análogo 1.

En base a esos antecedentes, el análogo 2 se preparó a partir del compuesto 17 reducido en posición 3 (Esquema 2.2).



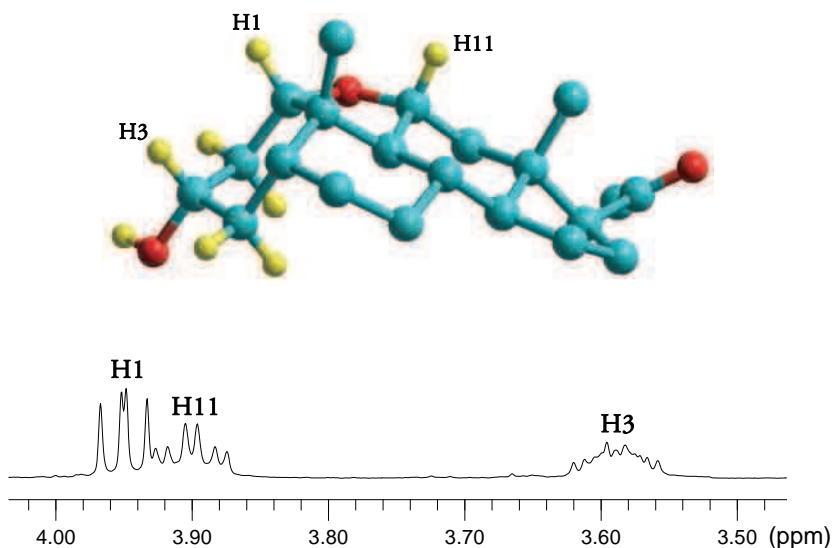
**Esquema 2.2** *Reactivos:* **a)** TBDMSCl, imidazol, DMF, 50 °C, 3 hs; **b)**  $\text{NaBH}_4$ , MeOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C, 30 min; **c)** 1.  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Py, 25 °C, 14 hs; **d)** HF 40%, THF,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 25 °C, 20 min; **e)** DAIB,  $\text{I}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , h $\nu$ , 25 °C, 45 min; **f)**  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, 25 °C, 30 min. ( $\Sigma$ =TBDMSi).

Para la obtención de 17, previamente a la reducción del grupo 3-ceto y posterior acetilación, resultó necesario proteger el hidroxilo en posición 11 con un grupo que pudiera ser

removido sin afectar al grupo acetato, de manera de obtener el 11 $\alpha$ -OH libre necesario para la posterior reacción de ciclación.

La protección del 11 $\alpha$ -OH de **6**<sup>3</sup> se llevó a cabo con cloruro de *ter*-butildimetilsililo (TBDMSCl) en presencia de imidazol. El compuesto **14** fue reducido con NaBH<sub>4</sub> en metanol a 0 °C, obteniéndose el 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide **15**. La estereoespecificidad de esta reacción se debe al impedimento estérico sobre la cara  $\alpha$  del esteroide generado por la fusión *cis* de los anillos A/B, permitiendo que el agente reductor se aproxime sólo desde la cara  $\beta$ . El compuesto **15** se acetiló empleando Ac<sub>2</sub>O en piridina, y posteriormente el grupo protector en posición 11 fue removido con HF 40% en una mezcla de THF y acetonitrilo. Sobre el compuesto **17** se llevó a cabo la reacción de ciclación con DAIB/I<sub>2</sub>/h $\nu$ , obteniéndose el compuesto cíclico **18** con un rendimiento del 80%. Finalmente el grupo 3-acetato fue removido con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en metanol, obteniéndose el análogo **2** con un 20% de rendimiento a partir de **6**.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **2** (Fig. 2.8 y Tabla 2.2) se observó un multiplete ancho a  $\delta$  3,59 ( $W_{1/2} = 30$  Hz), el cual confirmó la orientación axial ( $\beta$ ) asignada al H-3. Por otra parte la presencia de un doble doblete a  $\delta$  3,95 ( $J = 9,3$  y  $7,5$  Hz) asignado al H-1 y de un doble triplete a 3,90 ( $J = 4,3$  y  $11,0$  Hz) asignado al H-11, están de acuerdo con la presencia de un 1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epóxido en la molécula.



**Figura 2.8** Estructura HF/6-31G\*\* del análogo **2** y espectro RMN <sup>1</sup>H

<sup>3</sup> El compuesto **6** se obtuvo por hidrogenación catalítica (Pd 10%/C) de la 11 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, compuesto comercial.

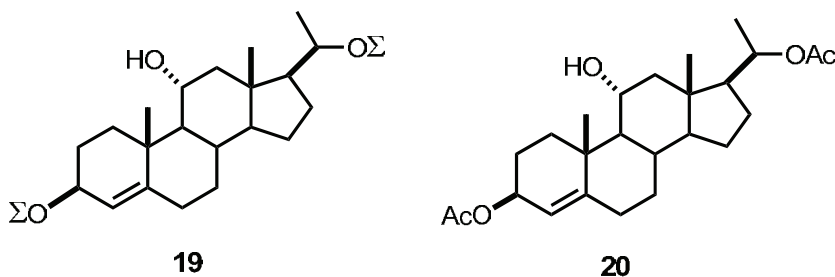
En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabla 2.2) se observaron tres señales correspondientes a carbonos oxigenados a 68,3, 75,5 y 85,3 ppm, asignados a los C-3, C-11 y C-1. La estructura del compuesto **2** se confirmó mediante espectroscopía RMN 2D y espectrometría de masa.

|           | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |           | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |
|-----------|------------------------------|---------------------------|---------|-----------|------------------------------|---------------------------|---------|
|           |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |           |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |
| <b>1</b>  | 85,3                         |                           | 3,95    | <b>12</b> | 45,2                         | 1,38                      | 2,48    |
| <b>2</b>  | 42,0                         | 2,30                      | 1,40    | <b>13</b> | 47,6                         |                           |         |
| <b>3</b>  | 68,3                         |                           | 3,59    | <b>14</b> | 58,4                         | 1,28                      |         |
| <b>4</b>  | 35,3                         | 1,61                      | 1,61    | <b>15</b> | 22,5                         | 1,71                      | 1,23    |
| <b>5</b>  | 38,6                         |                           | 1,89    | <b>16</b> | 24,2                         | 1,77                      | 2,06    |
| <b>6</b>  | 26,6                         | 1,67                      | 1,01    | <b>17</b> | 62,0                         |                           | 2,63    |
| <b>7</b>  | 26,8                         | 1,47                      | 1,86    | <b>18</b> | 15,0                         |                           | 0,64    |
| <b>8</b>  | 34,7                         |                           | 1,43    | <b>19</b> | 21,3                         |                           | 1,07    |
| <b>9</b>  | 51,3                         |                           | 1,41    | <b>20</b> | 208,0                        |                           |         |
| <b>10</b> | 38,4                         |                           |         | <b>21</b> | 31,7                         |                           | 2,14    |
| <b>11</b> | 75,5                         |                           | 3,90    |           |                              |                           |         |

Tabla 2.2 Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) del análogo **2**

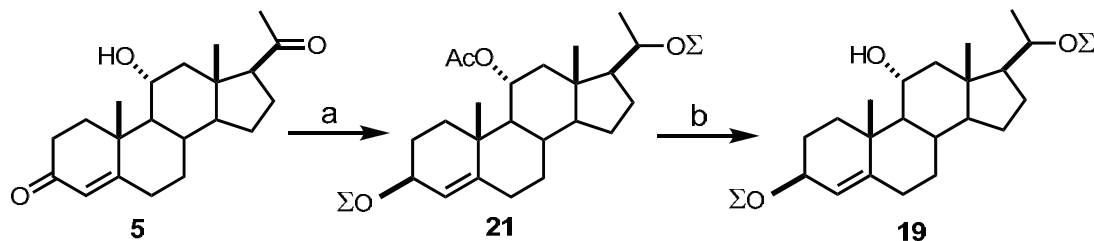
### Síntesis del análogo **3**

Teniendo en cuenta que, al igual que en el caso del compuesto **6**, la reacción de ciclación directa sobre la 11 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (**5**) conduce únicamente al derivado 3-ceto  $\alpha,\beta$ -insaturado (Fig. 2.6), para la obtención del análogo **3** se propuso probar la reacción de ciclación sobre los intermediarios **19** y **20**, en los cuales el grupo 3-ceto está reducido y protegido.



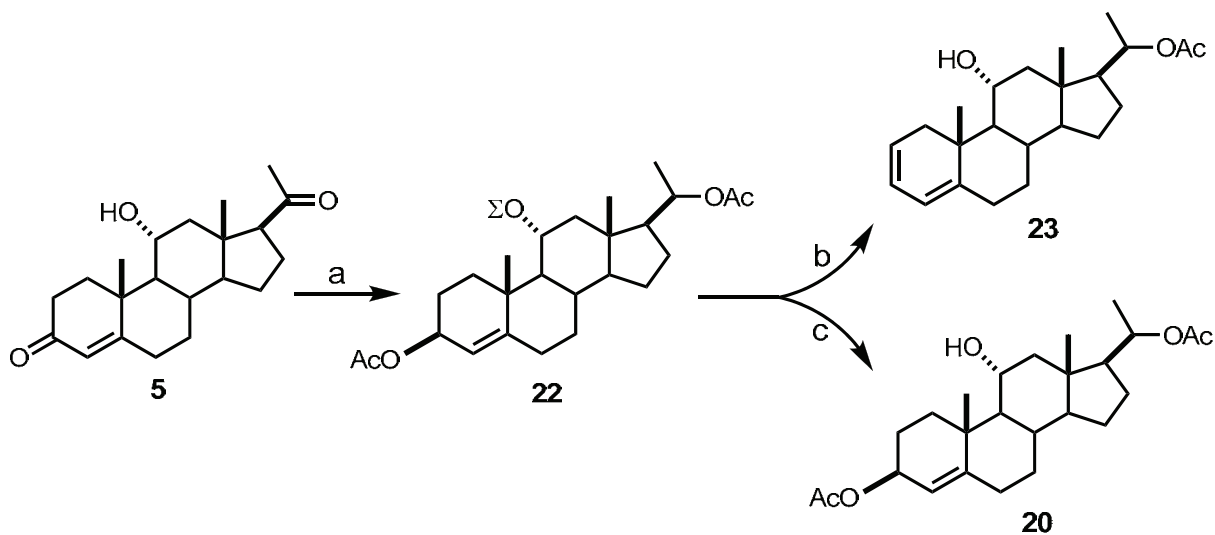
Los intermediarios **19** y **20** se prepararon mediante reacciones que involucran protecciones y desprotecciones selectivas en las posiciones 3, 11 y 20 (Esquema 2.4 y 2.5 respectivamente). Para la obtención de **19**, el compuesto de partida **5** fue acetilado y reducido

con  $\text{NaBH}_4$  en  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y posteriormente tratado con  $\text{TBDMSCl}$  e imidazol en  $\text{DMF}$  para obtener el compuesto **21**. Finalmente, el grupo acetato protector de posición 11 en **21** fue removido con  $\text{KOH}$  en  $\text{THF}-\text{MeOH}$  obteniéndose el intermediario **19** buscado.



**Esquema 2.4** *Reactivos:* **a)** 1.  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{Py}$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 hs. 2.  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 90 min. 3.  $\text{TBDMSCl}$ , imidazol,  $\text{DMF}$ ,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 4 hs; **b)**  $\text{KOH}$ ,  $\text{THF}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 48 hs. ( $\Sigma=\text{TBDMSi}$ )

Para la obtención del intermediario **20**, se invirtieron los grupos utilizados para proteger las posiciones 11, 3 y 20.



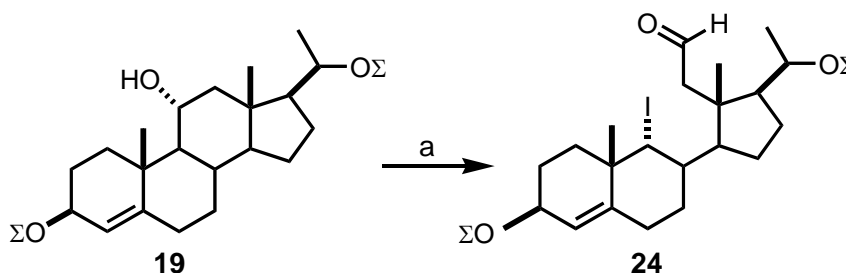
**Esquema 2.5** *Reactivos:* **a)** 1.  $\text{TBDMSCl}$ , imidazol,  $\text{DMF}$ ,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 3 hs. 2.  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 hs. 3.  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{Py}$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 14 hs; **b)**  $\text{HF}$  40%,  $\text{THF}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 20 min; **c)**  $\text{Bu}_4\text{NF}$ ,  $\text{THF}$ ,  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , 4 hs. ( $\Sigma=\text{TBDMSi}$ )

En una primera etapa **5** fue sililado con  $\text{TBDMSCl}$  e imidazol en  $\text{DMF}$ , y por posterior reducción con  $\text{NaBH}_4$  en  $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y acetilación con  $\text{Ac}_2\text{O}$  en piridina se obtuvo el compuesto **22**. Al intentar desproteger el hidroxilo en posición  $11\alpha$  del compuesto **22** usando  $\text{HF}$  40% en  $\text{THF}$ -acetonitrilo se obtuvo **23**, producto de la eliminación del acetato en posición 3. Por lo tanto se probó la desprotección en un medio neutro mediante el uso de  $\text{Bu}_4\text{NF}$  en  $\text{THF}$ , obteniéndose el intermediario **20** deseado.



*Reacción de hipiodito sobre el intermediario 19*

El tratamiento del intermediario **19** con DAIB/I<sub>2</sub>/hν en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> empleando distintas condiciones de reacción, condujo en todos los casos a mezclas complejas. En todas las condiciones ensayadas el producto mayoritario, aunque en bajo rendimiento, fue identificado como un producto de β-fragmentación de la reacción de hipiodito, al que se le asignó tentativamente la estructura **24** (Esquema 2.6).



**Esquema 2.6** *Reactivos:* a) DAIB, I<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, hν, 2 hs. (Σ=TBDMSi)

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **24** se observaron señales correspondientes a los anillos A y B similares a las descritas para el compuesto **19**: un singlete ancho a δ 5,40 asignado al H-4 y un multiplete (W<sub>1/2</sub> = 16 Hz) a δ 4,21 ppm correspondiente al H-3. El multiplete a δ 3,81 correspondería al H-20 mientras que las señales a campos altos a δ 0,84, 1,13 y 1,42 se asignaron a los metilos 18, 21 y 19, respectivamente. A campos bajos se observó además un doble doblete (*J* = 4,3 y 1,2 Hz) a δ 9,98, lo cual indica la existencia de un grupo aldehído en la molécula. Dada la presencia de este grupo funcional se plantearon los posibles productos de β-fragmentación a partir de **19** (Fig. 2.9).

En el espectro COSY se observó una correlación entre la señal a 9,98 ppm y las señales a 3,12 y 2,29 ppm. El doble doblete a δ 3,12 (*J* = 14,2, 1,2) y el doble doblete a δ 2,29 (*J* = 14,2 y 4,4) fueron asignados al metileno en posición 12, por lo tanto la correlación observada en el espectro COSY sugería que el compuesto **24** era el producto mayoritario de reacción. El ión molecular a *m/z* 688 en el espectro de masa de baja resolución concuerda con la presencia de un iodo en la molécula, mientras que en el espectro de masa de alta resolución se observa un ión a *m/z* 561,4177 correspondiente al ión [M-I]<sup>+</sup>. La inestabilidad de **24** no permitió un estudio completo por RMN 2D para confirmar esta estructura.

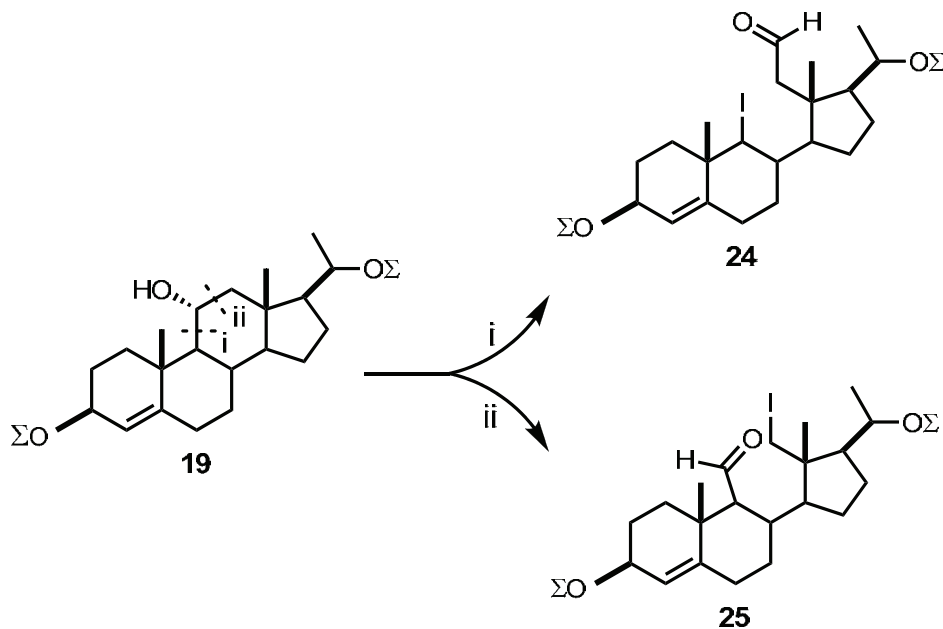
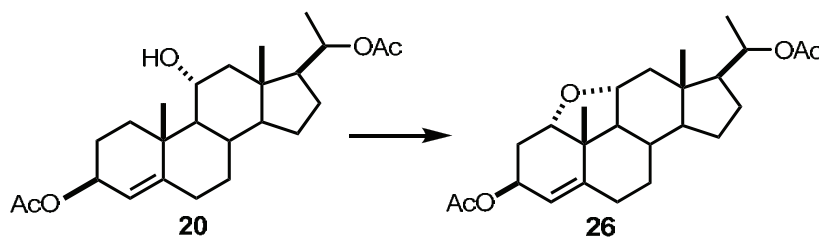


Figura. 2.9 Productos posibles de  $\beta$ -fragmentación del compuesto 19. ( $\Sigma$ =TBDMSi)

*Reacción de hipiodito sobre el intermediario 20.*

En la Tabla 2.3 se resumen las condiciones utilizadas al ensayar la reacción de ciclación sobre el compuesto 20. Todas las reacciones se llevaron a cabo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



|   | Esteroides/DAIB/I <sub>2</sub> | Tiempo (min) | Rendimiento de 26 (%) |
|---|--------------------------------|--------------|-----------------------|
| 1 | 1:1,2:1 <sup>a</sup>           | 15           | 20                    |
| 2 | 1:1,2:1 <sup>a</sup>           | 30           | 30                    |
| 3 | 1:2,4:2 <sup>a</sup>           | 15           | 30-50                 |
| 4 | 1:1,2:1 <sup>b</sup>           | 15           | 60                    |

**Tabla 2.4** Reacción de ciclación del compuesto 20

<sup>a</sup>irradiación luminosa: lámpara de tungsteno 300W (5000 lm) a temperatura ambiente. <sup>b</sup>microondas: 300W, 120 °C, 250 psi

Usando las condiciones de ciclación descritas para la obtención de los análogos **1** y **2** (Entrada 1), se aisló el compuesto de partida entre los subproductos de reacción. En base a este resultado se probó aumentando el tiempo de reacción (Entrada 2) o la cantidad de reactivos (Entrada 3), y si bien no se recuperó compuesto de partida, en ambos casos se aislaron subproductos correspondientes al camino de  $\beta$ -fragmentación. Si bien en las condiciones de la entrada 3 se logró obtener el compuesto **26** con un mejor rendimiento, los resultados no fueron reproducibles. El rendimiento y reproducibilidad de la reacción se incrementaron al probar una nueva técnica que involucra el uso de microondas (Entrada 4).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **26** (Fig. 2.10) se observó un doble doblete a  $\delta$  4,24 ( $J = 10,8$  y  $6,8$  Hz) asignado al H-1 y un doble triplete a 3,97 ( $J = 4,7$  y  $11,0$  Hz) asignado al H-11, señales que sugerían la presencia de un  $1\alpha,11\alpha$ -epóxido en la molécula.

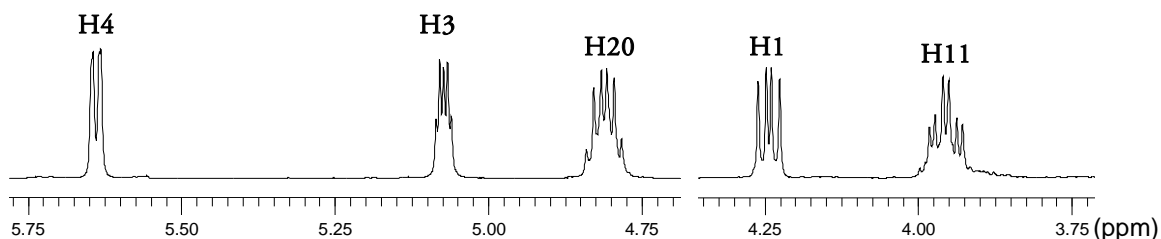


Figura 2.10 Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **26**

Teniendo en cuenta que en compuestos con funcionalidad  $\Delta^4$  se podrían formar puentes tanto  $1\alpha,11\alpha$ -óxido como  $1\beta,11\alpha$ -óxido (Fig. 2.5), para establecer la estereoquímica del puente C1/C11 en el compuesto **26** se compararon los datos obtenidos mediante cálculos AM1 de ambos isómeros con datos experimentales obtenidos en el espectro ROESY. Según los cálculos AM1 (Fig. 2.11), la distancia H1 $\beta$ -H19 es de  $2.56 \text{ \AA}$  en el isómero  $1\alpha,11\alpha$ , mientras que la distancia H1 $\alpha$ -H19 es mayor de  $3 \text{ \AA}$  en el isómero  $1\beta,11\alpha$ . Por lo tanto, en base a la correlación observada en el espectro ROESY entre el H-1 ( $4,24 \text{ ppm}$ ) y el H-19 ( $1,19 \text{ ppm}$ ), se asignó la estereoquímica  $1\alpha,11\alpha$  al compuesto **26**. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observaron tres señales correspondientes a carbonos oxigenados a  $67,5$ ,  $75,9$  y  $82,0 \text{ ppm}$ , asignados a los C-3, C-11 y C-1.

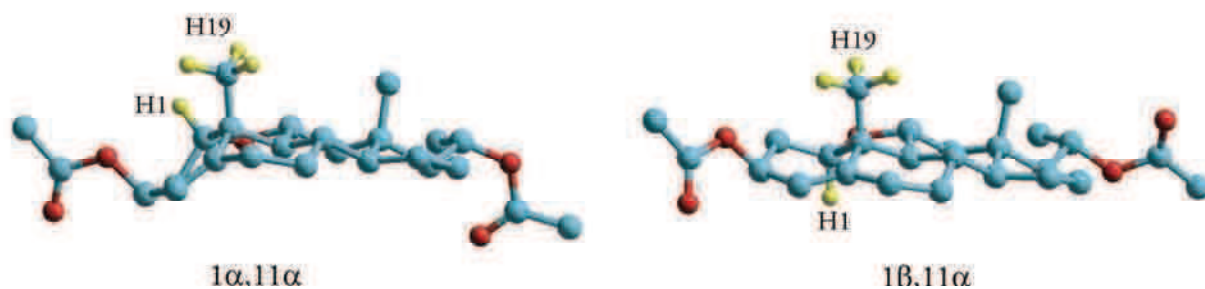


Figura 2.11 Geometrías optimizadas AM1 de los posibles isómeros del compuesto 26

La estructura del compuesto 26 se confirmó mediante espectroscopía RMN 2D (Tabla 2.4) y espectrometría de masas.

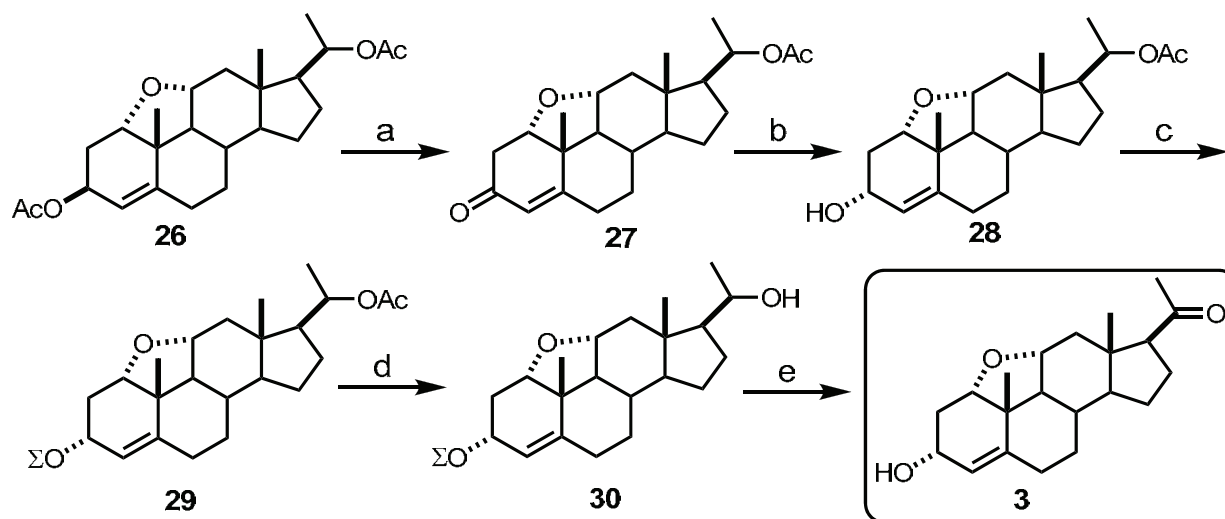
|           | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |              | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |
|-----------|------------------------------|---------------------------|---------|--------------|------------------------------|---------------------------|---------|
|           |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |              |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |
| <b>1</b>  | 82,0                         |                           | 4,24    | <b>12</b>    | 44,3                         | 1,16                      | 2,31    |
| <b>2</b>  | 34,1                         | 2,32                      |         | <b>13</b>    | 46,8                         |                           |         |
| <b>3</b>  | 67,5                         |                           | 5,09    | <b>14</b>    | 57,4                         |                           | 1,18    |
| <b>4</b>  | 115,4                        |                           | 5,64    | <b>15</b>    | 22,4                         | 1,67                      | 1,18    |
| <b>5</b>  | 151,4                        |                           |         | <b>16</b>    | 26,5                         | 1,85                      | 1,35    |
| <b>6</b>  | 30,1                         | 2,38                      |         | <b>17</b>    | 59,7                         |                           | 1,08    |
| <b>7</b>  | 34,0                         | 1,98                      |         | <b>18</b>    | 13,9                         |                           | 0,69    |
| <b>8</b>  | 31,1                         |                           | 1,65    | <b>19</b>    | 19,8                         |                           | 1,19    |
| <b>9</b>  | 53,3                         |                           | 1,71    | <b>20</b>    | 72,3                         |                           | 4,81    |
| <b>10</b> | 41,8                         |                           |         | <b>21</b>    | 20,0                         |                           | 1,14    |
| <b>11</b> | 75,9                         |                           | 3,97    | <b>Acet.</b> | 170,5/21,5                   |                           |         |

Tabla 2.4 Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) del compuesto 26.

### Síntesis del análogo 3 a partir de 26

Una vez obtenido el compuesto cíclico 1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxipregnano 26 se desarrolló el camino sintético descrito en el Esquema 2.7 para la obtención del análogo 3. Para introducir las funcionalidades 3 $\alpha$ -OH y 20-ceto características de los neuroesteroides se realizaron una serie de

reacciones de protección y desprotección selectiva de las funciones oxigenadas en C-3 y C-20, junto a la reducción estereoespecífica del carbonilo en posición 3.



**Esquema 2.7** *Reactivos:* a) 1. KOH-acuoso 5%, MeOH-THF, 25°C, 3hs. 2. PCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, BaCO<sub>3</sub>, 25 °C, 40 min; b) LiAl(*t*-BuO)<sub>3</sub>, THF, 0°C, 3 hs; c) TBDMSCl, imidazol, DMF, 25 °C, 45 min; d) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 25 °C, 2 hs.; e) 1. PCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, BaCO<sub>3</sub>, 25 °C, 40 min, 2. Bu<sub>4</sub>NF, THF, 25 °C, 18 h. ( $\Sigma$ =TBDMSi)

La hidrólisis selectiva del acetato en posición 3 de **26** utilizando KOH 5% en MeOH, seguida por oxidación con PCC-BaCO<sub>3</sub> condujo a **27**. Debido a la conformación del anillo A de este 3-cetoesteroide (**27**) (semisilla 1 $\beta$ ,2 $\alpha$ ) se logró la reducción estereoespecífica del carbonilo en posición 3 usando un agente reductor voluminoso (LiAl(*t*-BuO)<sub>3</sub>). Una vez obtenida la funcionalidad 3 $\alpha$ -hidroxi deseada sólo restaba incorporar la funcionalidad ceto en posición 20. Para ello se protegió el hidroxilo en posición 3 en el compuesto **28** con el grupo TBDMS y se removió el grupo acetato protector de posición 20 obteniéndose **30**. Por oxidación con PCC-BaCO<sub>3</sub> y posterior desililación con Bu<sub>4</sub>NF en THF se obtuvo el análogo **3** con un rendimiento de 13 % a partir de **26**.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **3** (Fig. 2.12 y Tabla 2.5) se observó un doble triplete a  $\delta$  4,34 ( $J = 11,3$  y  $3,3$  Hz), el cual confirmó la orientación axial asignada al H-3. Por otra parte la presencia de un doble doblete a  $\delta$  4,12 ( $J = 11,2$  y  $6,3$  Hz) asignado al H-1 y de un doble triplete a 3,98 ( $J = 4,9$  y  $11,1$  Hz) asignado al H-11, están de acuerdo con la presencia de un 1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epóxido en la molécula.

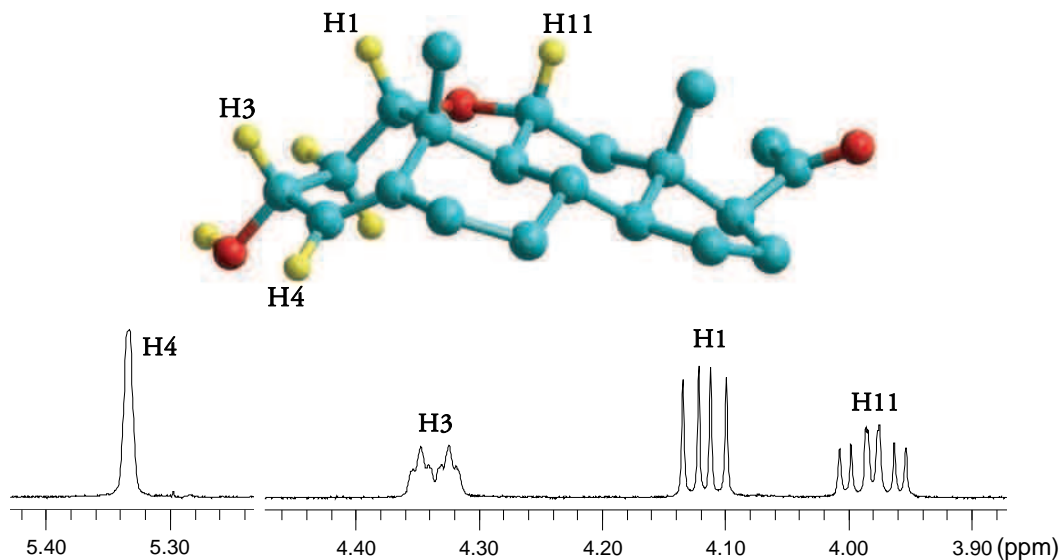


Figura 2.12 Estructura HF/6-31G\*\* del análogo **3** y espectro RMN  $^1\text{H}$

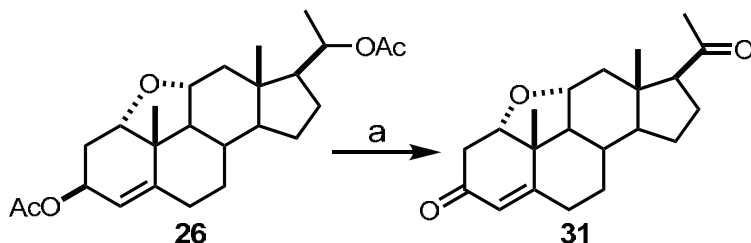
En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabla 2.2) se observaron tres señales correspondientes a carbonos oxigenados a 66,7, 76,2 y 83,8 ppm, asignados a los C-3, C-11 y C-1. La estructura del compuesto **3** se confirmó mediante espectroscopía RMN 2D y espectrometría de masa.

|           | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |           | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |
|-----------|------------------------------|---------------------------|---------|-----------|------------------------------|---------------------------|---------|
|           |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |           |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |
| <b>1</b>  | 83,8                         |                           | 4,12    | <b>12</b> | 44,0                         | 1,35                      | 2,43    |
| <b>2</b>  | 40,5                         | 2,29                      | 1,54    | <b>13</b> | 47,9                         |                           |         |
| <b>3</b>  | 66,7                         |                           | 4,34    | <b>14</b> | 59,6                         |                           | 1,24    |
| <b>4</b>  | 123,5                        |                           | 5,33    | <b>15</b> | 22,6                         | 1,70                      | 1,26    |
| <b>5</b>  | 143,9                        |                           |         | <b>16</b> | 24,3                         | 2,25                      | 1,74    |
| <b>6</b>  | 29,5                         | 2,31                      | 1,25    | <b>17</b> | 61,7                         |                           | 2,63    |
| <b>7</b>  | 33,6                         | 1,97                      | 1,01    | <b>18</b> | 14,8                         |                           | 0,66    |
| <b>8</b>  | 31,0                         |                           | 1,64    | <b>19</b> | 19,5                         |                           | 1,11    |
| <b>9</b>  | 58,2                         |                           | 1,25    | <b>20</b> | 209,0                        |                           |         |
| <b>10</b> | 41,7                         |                           |         | <b>21</b> | 31,8                         |                           | 2,12    |
| <b>11</b> | 76,2                         |                           | 3,98    |           |                              |                           |         |

Tabla 2.5 Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) del análogo **3**

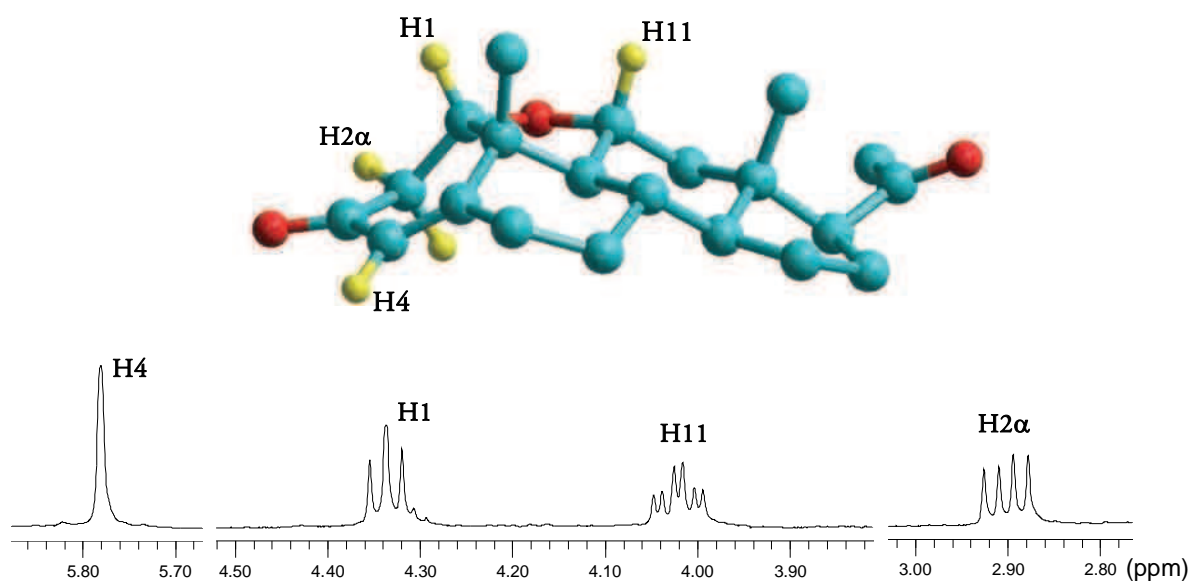
## Síntesis de 1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxiprogesterona

A partir del intermediario **26** se sintetizó la 1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxiprogesterona (**31**), análogo rígido de hormonas esteroidales, mediante dos pasos de reacción (Esquema 2.8).



**Esquema 2.8** *Reactivos:* a) 1. LiAlH<sub>4</sub>, THF, 45 min, 25 °C; 2. PCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, BaCO<sub>3</sub>, 25 min, 25 °C.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **31** (Fig. 2.13 y Tabla 2.6) se observó un doble doblete a  $\delta$  4,34 ( $J = 9,2$  y  $8,0$  Hz) asignado al H-1, que está de acuerdo con los valores de las constantes de acoplamiento obtenidas usando la ecuación de Altona para este compuesto y su 1 $\beta$ -isómero ( $J = 9,6$  y  $7,0$  Hz para el 1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epóxido y  $J = 11,5$  y  $4,0$  Hz para el 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -epóxido). El doble triplete a  $\delta$  4,03 ( $J = 11,0$  y  $4,6$  Hz) se asignó al H-11. Los H-2 se observaron como un doble doblete a  $\delta$  2,91 ( $8,0$  y  $15,8$  Hz) y un doblete a  $\delta$  2,54 ( $9,2$  y  $15,8$  Hz).



**Figura 2.13** Estructura HF/6-31G\*\* de 1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxiprogesterona (**31**) y espectro RMN <sup>1</sup>H

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabla 2.) las dos señales correspondientes a carbonos oxigenados a 75,9 y 82,9 ppm, fueron asignadas a los C-11 y C-1 respectivamente. La estructura del compuesto **31** se confirmó mediante espectroscopía RMN 2D y espectrometría de masa.

|           | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |           | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |
|-----------|------------------------------|---------------------------|---------|-----------|------------------------------|---------------------------|---------|
|           |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |           |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |
| <b>1</b>  | 82,9                         |                           | 4,34    | <b>12</b> | 43,8                         | 1,43                      | 2,50    |
| <b>2</b>  | 44,9                         | 2,91                      |         | <b>13</b> | 48,1                         | 2,16                      | 1,20    |
| <b>3</b>  | 198,2                        |                           |         | <b>14</b> | 60,5                         |                           | 1,42    |
| <b>4</b>  | 121,0                        |                           | 5,78    | <b>15</b> | 22,6                         | 1,74                      | 1,32    |
| <b>5</b>  | 166,6                        |                           |         | <b>16</b> | 24,3                         | 2,28                      | 1,83    |
| <b>6</b>  | 34,2                         |                           |         | <b>17</b> | 61,5                         |                           | 2,65    |
| <b>7</b>  | 31,2                         | 2,59                      |         | <b>18</b> | 14,8                         |                           | 0,73    |
| <b>8</b>  | 31,7                         |                           | 2,16    | <b>19</b> | 20,5                         |                           | 1,27    |
| <b>9</b>  | 57,8                         |                           | 1,32    | <b>20</b> | 208,7                        |                           |         |
| <b>10</b> | 42,6                         |                           |         | <b>21</b> | 31,0                         |                           | 2,14    |
| <b>11</b> | 75,9                         |                           | 4,03    |           |                              |                           |         |

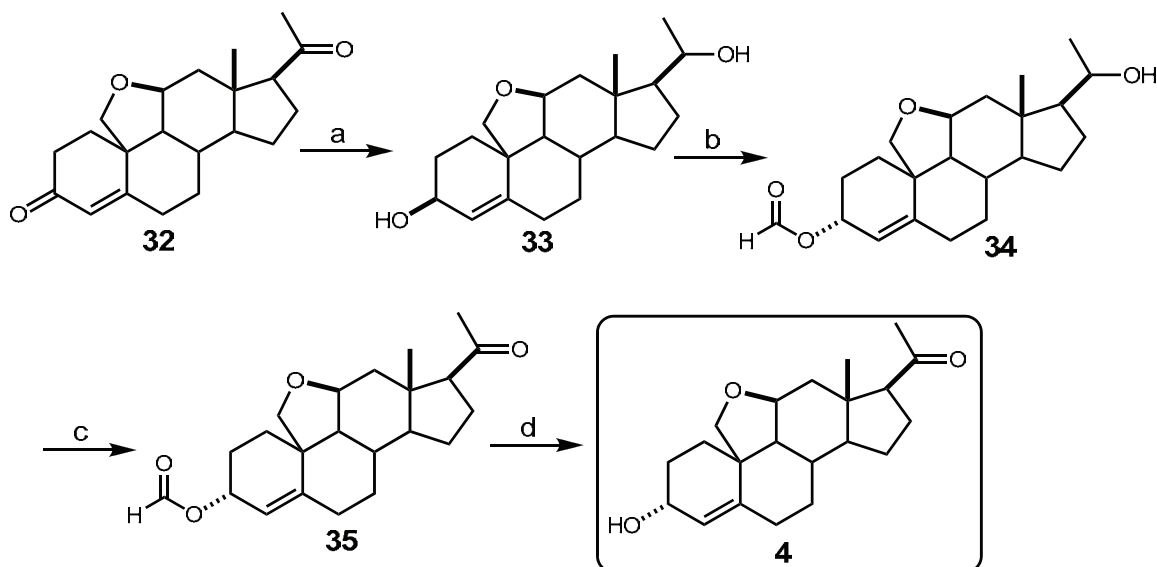
**Tabla 2.6.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de  $1\alpha,11\alpha$ -epoxiprogesterona (**31**)

## 2.5 Síntesis del análogo 4

El análogo **4** se sintetizó a partir de la  $11,19$ -epoxiprogesterona (**32**) empleando el camino sintético indicado en el esquema 2.10. El compuesto **32** se obtuvo siguiendo la metodología desarrollada en nuestro grupo de investigación [11].

Para obtener el análogo **4** a partir de **32** se utilizó una estrategia similar a la utilizada previamente para la obtención del análogo **1**. Por reducción de **32** con  $\text{NaBH}_4$  se obtuvo el diol **33** como producto principal. Por tratamiento del diol **33** con ácido fórmico, DEAD y  $\text{Ph}_3\text{P}$  y posterior purificación por cromatografía flash se aislaron el compuesto **34** y su  $3\beta$  isómero en relación  $3\alpha/3\beta$  4:1. La estereoquímica en la posición 3 de ambos compuestos se estableció por comparación de los datos experimentales (constantes de acoplamiento en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ ) con los valores esperados por cálculos de modelado molecular AM1 y la aplicación de la ecuación de Altona (Tabla 2.7).





**Esquema 2.10** *Reactivos:* a) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25°C, 90 min; b) Ph<sub>3</sub>P, HCOOH, DEAD, THF, 25°C, 14 hs.; c) PCC, BaCO<sub>3</sub>, MS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25°C, 30 min; d) KHCO<sub>3</sub>, MeOH, 25 °C, 15 min.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H, el H-3 correspondiente al compuesto **34** se observó como multiplete no resuelto a δ 5,27 (W<sub>1/2</sub> =15,0Hz), mientras que el H-3 correspondiente a su 3β-estereoisómero (H-3 pseudoaxial), se observó como un multiplete ancho (W<sub>1/2</sub>= 22,0Hz) a δ 5,45.

|                     | H(3)-C-C-H(2β)/(J <sub>3,2β</sub> ) | H(3)-C-C-H(2α)/(J <sub>3,2α</sub> ) | H(3)-C-C-H(4)/(J <sub>3,4</sub> ) |
|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Compuesto 36</b> | 30,7°/6,14 Hz                       | 86,2°/1,29 Hz                       | 57,1°/3,78 Hz                     |
| <b>Isómero 3β</b>   | 162,2°/10,02 Hz                     | 44,7°/6,45 Hz                       | 75,0°/2,87 Hz                     |

**Tabla 2.7.** Ángulos de torsión (H-C-C-H) según cálculos AM1 y constantes de acoplamiento calculadas mediante la ecuación de Altona para los conformeros de mínima energía del compuesto **36** y su isómero 3β.

La formación del 3β formiloxiesteroides, no observada en la síntesis del análogo **1** en donde se empleó una metodología similar, se puede explicar debido a la mayor reactividad del 3β-alcohol alílico en **33** comparado con el compuesto **11** que reaccionaría directamente con el ácido fórmico usado en la reacción de Mitsunobu, para dar el formiato correspondiente.

Por último, la oxidación del 20-hidroxilo del compuesto **34** con PCC en presencia de BaCO<sub>3</sub>, seguida de hidrólisis suave del 3α-formiato en medio básico, condujo al análogo **4**

deseado con rendimiento del 30% a partir de **32**. La estructura del análogo **4** fue determinada mediante cristalografía de rayos X, confirmando la orientación pseudoaxial del 3 $\alpha$ -hidroxilo (Fig. 2.14).

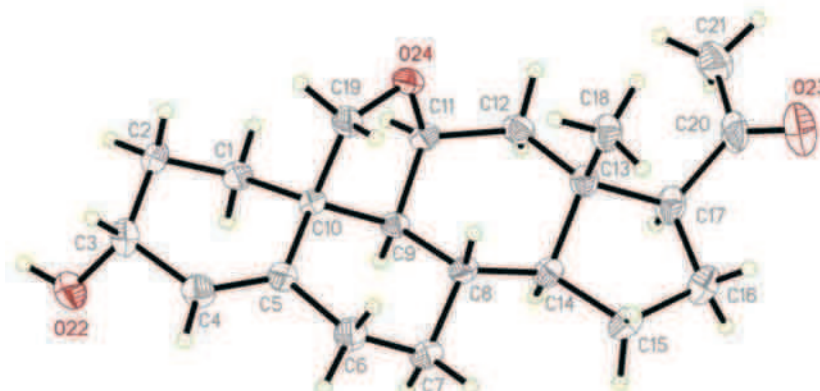


Figura 2.14 Estructura de rayos X del análogo **4**

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **4** (Fig. 2.15, Tabla 2.8) se observó un singlete ancho a  $\delta$  4,10 ( $W_{1/2} = 12,5$  Hz) y un doblete ( $J = 4,4$  Hz) a  $\delta$  5,68 asignados al H-3 y al H-4 respectivamente. El sistema AB correspondiente al  $\text{CH}_2$ -19 apareció a  $\delta$  3,76 (dd,  $J = 8,2$  y 1,8 Hz) y a  $\delta$  3,68 (d,  $J = 8,2\text{Hz}$ ). El singlete ancho a 4,41 ppm se asignó al H-11.

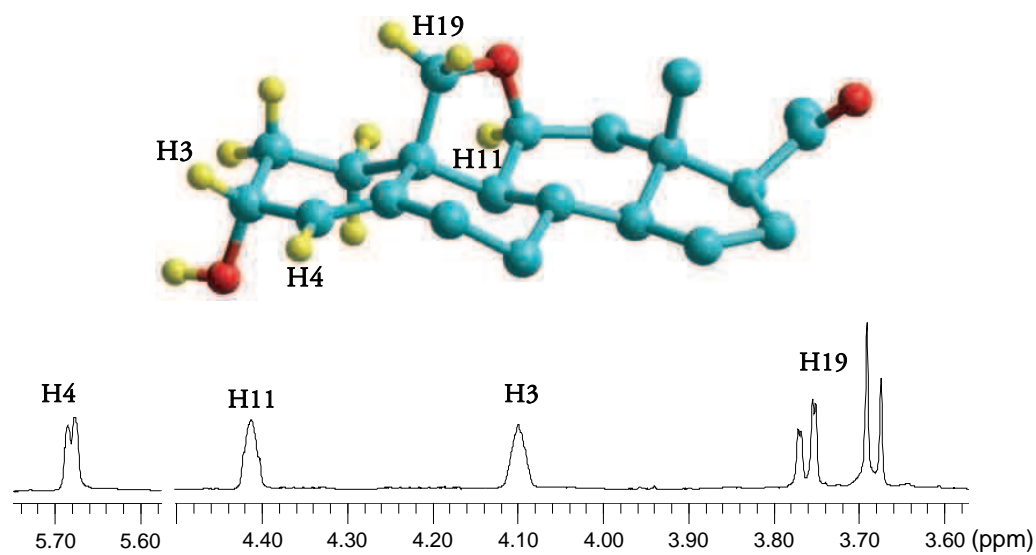


Figura 2.15 Estructura HF/6-31G\*\* del análogo **4** y espectro de RMN  $^1\text{H}$

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observaron tres carbonos oxigenados a  $\delta$  63,4, 70,8 y 77,8, asignados a los carbonos 3, 19 y 11 respectivamente. Los datos correspondientes a los espectros de RMN 2D están de acuerdo con la estructura del compuesto **4**.

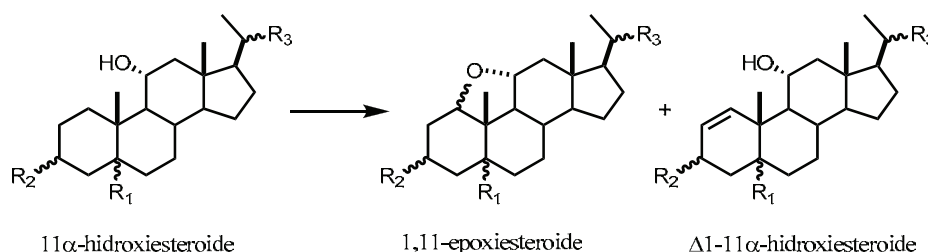
|           | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |           | $\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) | $\delta$ ( $^1\text{H}$ ) |         |
|-----------|------------------------------|---------------------------|---------|-----------|------------------------------|---------------------------|---------|
|           |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |           |                              | $\alpha$                  | $\beta$ |
| <b>1</b>  | 28,3                         | 1,51                      | 1,51    | <b>12</b> | 41,5                         | 1,72                      | 2,41    |
| <b>2</b>  | 28,9                         | 1,67                      | 1,08    | <b>13</b> | 44,4                         |                           |         |
| <b>3</b>  | 63,4                         |                           | 4,10    | <b>14</b> | 53,0                         | 1,28                      |         |
| <b>4</b>  | 126,5                        |                           | 5,68    | <b>15</b> | 23,9                         | 1,66                      | 1,32    |
| <b>5</b>  | 141,9                        |                           |         | <b>16</b> | 22,6                         | 2,07                      | 2,07    |
| <b>6</b>  | 34,7                         | 2,29                      | 2,29    | <b>17</b> | 64,7                         |                           | 2,52    |
| <b>7</b>  | 27,8                         | 1,82                      | 1,82    | <b>18</b> | 15,7                         |                           | 0,80    |
| <b>8</b>  | 34,9                         |                           | 1,50    | <b>19</b> | 70,8                         | 3,76                      | 3,68    |
| <b>9</b>  | 57,4                         |                           | 1,02    | <b>20</b> | 209,0                        |                           |         |
| <b>10</b> | 46,7                         |                           |         | <b>21</b> | 31,2                         |                           | 2,13    |
| <b>11</b> | 77,8                         |                           | 4,41    |           |                              |                           |         |

**Tabla 2.8** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  (500 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) del análogo **4**

## 2.6 Modelado Molecular

### Reacción de ciclación

El conjunto de los antecedentes previos y de los resultados obtenidos en esta tesis sobre la reacción de ciclación de 11 $\alpha$ -hidroxiesteroides reúne información que puede ser utilizada para investigar cómo afecta la conformación global del esteroide al desarrollo de la misma.



| Comp. | 11 $\alpha$ -hidroxiesteroide |            |                | t (min) | 1,11-epoxiesteroide | $\Delta^1$ -11 $\alpha$ -hidroxiesteroide |      |
|-------|-------------------------------|------------|----------------|---------|---------------------|---|------|
|       | R1                            | R2         | R3             |         | Rendimiento         | Rendimiento                               |      |
| 1     | 6                             | $\beta$ H  | =O             | =O      | 30 <sup>a</sup>     | -   | 88 % |
| 2     | 17                            | $\beta$ H  | $\alpha$ -AcO  | =O      | 20 <sup>a</sup>     | 80 %<br>puente 1 $\alpha$ ,11 $\alpha$    | -    |
| 3     | 5                             | $\Delta^4$ | =O             | =O      | 60 <sup>a</sup>     | -   | 87 % |
| 4     | 20                            | $\Delta^4$ | $\beta$ -AcO   | AcO     | 15 <sup>b</sup>     | 60%<br>puente 1 $\alpha$ ,11 $\alpha$     | -    |
| 5     | 19                            | $\Delta^4$ | $\beta$ -TBDMS | TBDMS   | 30 <sup>a</sup>     | - <sup>c</sup>                            | -    |
| 6     | 7                             | $\alpha$ H | =O             | =O      | 60 <sup>a</sup>     | 66%<br>puente 1 $\beta$ ,11 $\alpha$      | 22%  |

**Tabla 2.9** Resumen de las reacciones de ciclación sobre 11 $\alpha$ -hidroxiesteroides

<sup>a</sup> DAIB/I<sub>2</sub> 1,2:1; irradiación luminosa (lámpara de tungsteno 300W) a temperatura ambiente.

<sup>b</sup> DAIB/I<sub>2</sub> 1,2:1; microondas: 300W, 120 °C, 250 psi.

<sup>c</sup> Se obtienen mezclas complejas, de las cuales sólo se pudo aislar un producto de  $\beta$ -fragmentación.

Para ello se determinaron, utilizando métodos de cálculo *ab initio*, la geometría optimizada y la estabilidad de intermediarios claves de la reacción, de manera de intentar explicar la formación de los productos observados en cada caso. La reacción de ciclación fue ensayada

sobre siete  $11\alpha$ -hidroxiesteroides diferentes, de los cuales dos son  $5\beta$ -H, tres  $\Delta^4$  y uno  $5\alpha$ -H (Tabla 2.9).

Teniendo en cuenta el mecanismo de reacción propuesto para la reacción de ciclación (Fig. 2.16) se optimizaron las geometrías de los intermediarios I y II correspondientes a los  $11\alpha$ -hidroxiesteroides de partida.

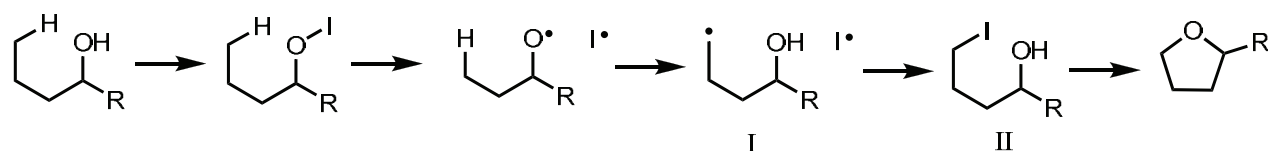


Figura 2.16 Mecanismo de la reacción de ciclación.

*Ciclación sobre  $11\alpha$ -hidroxi- $5\beta$ -pregnanos*

La reacción de ciclación sobre el compuesto 6 ( $5\beta$ -H, 3-ceto) condujo únicamente al derivado  $\Delta^1$ , con un 88% de rendimiento (Tabla 2.9, Entrada 1). Cuando se utilizó una menor concentración de reactivos además del derivado  $\Delta^1$  se pudo aislar una pequeña cantidad del  $1\alpha$ -iodo-esteroide. La Fig. 2.17a muestra las geometrías optimizadas del radical y de los intermediarios iodados en posición 1 correspondientes al compuesto 6.

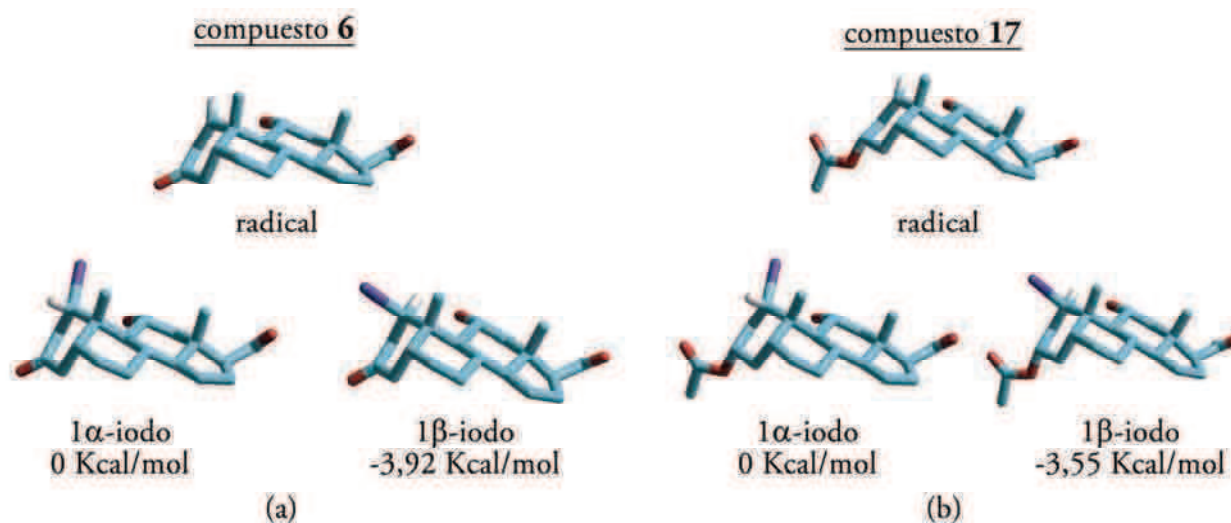


Figura 2.17 Intermediarios correspondientes a los compuestos  $5\beta$ .

Debido a la conformación torsionada del radical, el ataque del radical iodo por la cara beta del esteroide estaría favorecido sobre el ataque por la cara alfa, mucho menos expuesta. Además, el derivado 1 $\beta$ -iodo resultante es 3,92 Kcal/mol más estable que el isómero 1 $\alpha$ -iodo. Por lo tanto, ambos fenómenos llevan a suponer que el intermediario mayoritario sería el 1 $\beta$ -iodo. Este intermediario posee una conformación en la cual es posible un ataque del 11 $\alpha$ -OH al C-1 en un mecanismo tipo S<sub>N</sub>2, lo cual llevaría a la formación del puente epóxido 1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ . Sin embargo, la orientación axial del átomo de iodo y la presencia del grupo del 3-ceto, favorecen aún más la eliminación del iodo para dar el producto insaturado  $\Delta^1$ , explicando los resultados obtenidos.

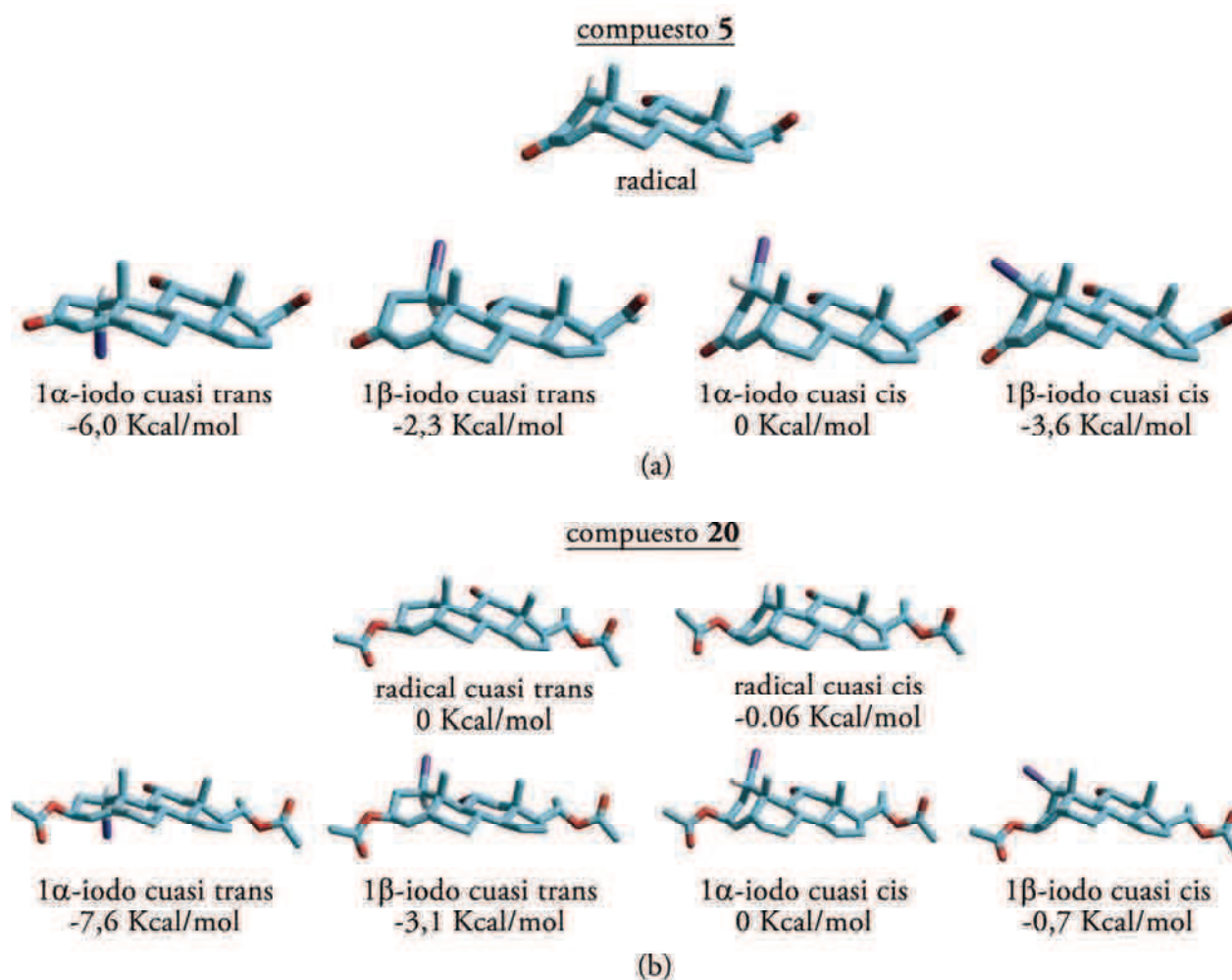
Al sustituir el grupo 3-ceto por un 3 $\alpha$ -acetato (compuesto 17) efectivamente se obtiene el compuesto cíclico (Tabla 2.9, Entrada 2, pág. 41). La conformación global del radical y de los intermediarios iodados correspondientes al compuesto 17 resultan similares a los del compuesto con el grupo 3-ceto (Fig. 2.17b). Nuevamente, el intermediario 1 $\beta$ -iodo es más estable que el 1 $\alpha$ -iodo pero al no estar especialmente favorecida la eliminación el intermediario 1 $\beta$ -iodo puede ciclarse por el ataque del 11 $\alpha$ -OH al C-1, de acuerdo con el resultado observado.

#### *Ciclación sobre 11 $\alpha$ -hidroxi- $\Delta^4$ -pregnenos*

La reacción de ciclación sobre el compuesto 5 ( $\Delta^4$ -3-ceto) también conduce únicamente al derivado  $\Delta^1$ , con un 87% de rendimiento (Tabla 2.9, Entrada 3, pág. 41). Como vimos anteriormente, en esteroides  $\Delta^4$  el anillo puede existir en una conformación *cuasi-trans* (generalmente más estable) o en una conformación *cuasi-cis*. Por lo tanto, para comprender el curso de la reacción de ciclación sobre este compuesto resulta necesario investigar la energía relativa de cada uno de los intermediarios en las dos conformaciones posibles (Fig. 2.18a). En el caso del intermediario radical, se obtiene la misma geometría optimizada partiendo de la conformación *cuasi-trans* que partiendo de la conformación *cuasi-cis*. Este radical también posee una conformación levemente torsionada, en la cual el ataque del radical iodo por la cara beta estaría favorecido. La energía de los intermediarios 1 $\alpha$ -iodo y 1 $\beta$ -iodo en cambio, varía apreciablemente con la conformación del anillo A. El intermediario más estable es el 1 $\alpha$ -iodo *cuasi-trans*, seguido del 1 $\beta$ -iodo *cuasi-cis* y del 1 $\beta$ -iodo *cuasi-trans*; el 1 $\alpha$ -iodo *cuasi-cis* es el menos estable de todos, posiblemente debido a la repulsión entre el iodo y el 11 $\alpha$ -OH. Los dos intermediarios más estables (1 $\alpha$ -iodo *cuasi-trans* y 1 $\beta$ -iodo *cuasi-cis*) son aquellos en los que el iodo queda axial, posición en la cual se puede eliminar para dar el derivado  $\Delta^1$ , de acuerdo con el resultado obtenido. Si bien la geometría del intermediario 1 $\beta$ -iodo *cuasi-cis* permitiría un ataque

tipo  $S_N2$  del  $11\alpha$ -OH al C-1 para formar el puente  $1\alpha,11\alpha$ , como en el caso anterior se obtiene el derivado  $\Delta^1$  porque la eliminación estaría favorecida por la presencia del grupo 3-ceto.

La reacción de ciclación sobre el compuesto **20** ( $5\beta$ -H,  $3\beta$ -acetato) condujo en todas las condiciones empleadas al compuesto cíclico, pero solo con el uso de microondas se lo obtuvo de forma reproducible y con buen rendimiento (Tabla 2.9, Entrada 4, pag. 41).



**Figura 2.18** Intermediarios correspondientes a los compuestos  $\Delta^4$ .

El radical correspondiente al compuesto **20** (Fig. 2.18b) puede existir en ambas conformaciones *cuasi-trans* y *cuasi-cis*, con energías prácticamente iguales. En cuanto a los intermediarios iodados, la sustitución del 3-ceto por un grupo  $3\beta$ -acetato más voluminoso modifica las energías relativas de las conformaciones *cuasi-trans* y *cuasi-cis*. El intermediario  $1\alpha$ -iodo *cuasi-trans* continúa siendo el más estable, pero en este caso seguido del  $1\beta$ -iodo *cuasi-trans*

y luego por las conformaciones *cuasi-cis* que poseen una energía similar. Las conformaciones *cuasi-trans* están estabilizadas respecto a las conformaciones *cuasi-cis* debido a que en las primeras el sustituyente voluminoso en posición 3 está ecuatorial mientras que en las segundas está axial. La desestabilización del intermediario 1 $\beta$ -iodo *cuasi-cis*, intermediario que conduce a la formación del puente 1,11, podría explicar la necesidad de utilizar microondas para obtener el compuesto cíclico con buen rendimiento y de forma reproducible. Solamente con la alta energía proporcionada por el uso de microondas puede obtenerse una concentración suficiente del intermediario que conduce a la formación del puente.

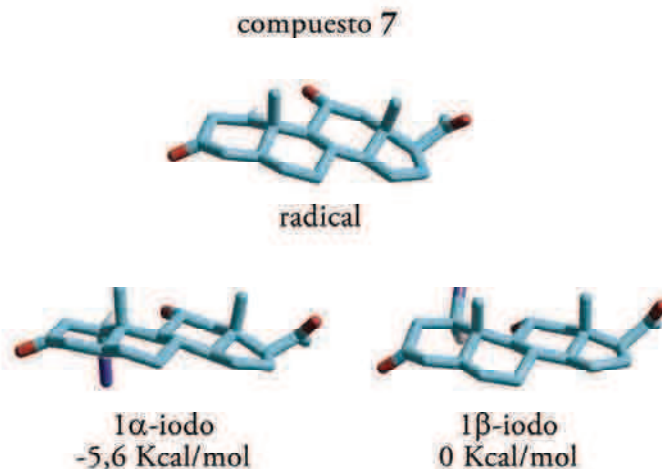
Cuando en lugar de un grupo 3 $\beta$ -acetato hay un grupo 3 $\beta$ -TBDMS la reacción conduce a mezclas complejas, de la cuales únicamente pudo aislarse el producto de  $\beta$ -fragmentación (Tabla 2.9, Entrada 5, pág. x). Debido a la dificultad de optimizar las estructuras con grupo TBDMS, para obtener las geometrías y las energías de los intermediarios correspondientes al compuesto **19** estos fueron reemplazados por grupos trimetilsililo. De esta manera, se encontró que el radical en conformación *cuasi-trans* es 1,4 Kcal/mol más estable que en conformación *cuasi-cis*. La diferencia de energía de los intermediarios iodados respecto del más inestable ( $\alpha$ -iodo *cuasi-cis*) fue de -10,8 Kcal/mol para el  $\alpha$ -iodo *cuasi-trans*, -6,2 Kcal/mol para el  $\beta$ -iodo *cuasi-trans* y de -2,3 Kcal/mol para el  $\beta$ -iodo *cuasi-cis*. Por lo tanto, cuanto más grande es el grupo voluminoso en posición 3 $\beta$  más se desestabilizan las conformaciones *cuasi-cis* respecto de las *cuasi-trans*. En base a esta tendencia, la presencia de un grupo TBDMS, más voluminoso que el trimetilsililo utilizado para los cálculos, desestabilizaría aún más al intermediario  $\beta$ -iodo *cuasi-cis*, explicando por qué no se obtiene el producto de ciclación partiendo del compuesto **19**.

### *Ciclación sobre 11 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnanos*

A diferencia de los casos anteriores, con la reacción de ciclación sobre el compuesto **7** (5 $\alpha$ , 3-ceto) se obtiene, además del derivado  $\Delta^1$ , el compuesto cíclico deseado (Tabla 2.9, Entrada 6, pág. 41). Observando las geometrías optimizadas (Fig. 2.19) de los intermediarios iodados se encuentra que en ninguno de ellos puede darse un ataque tipo S<sub>N</sub>2 del 11 $\alpha$ -OH sobre el C-1. Por lo tanto, otro mecanismo diferente debe ser considerado para explicar el curso de esta reacción. El intermediario 1 $\alpha$ -iodo, en el cual el iodo está axial, es mucho más estable que el 1 $\beta$ -iodo, lo que explicaría la formación del derivado  $\Delta^1$ . Una posibilidad para explicar la formación del compuesto cíclico es que este se forme a partir del derivado  $\Delta^1$ , mediante la formación del



radical por pérdida del hidrógeno del grupo  $11\alpha$ -OH y ataque de este radical al C-1 del sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado (adición tipo Michael).



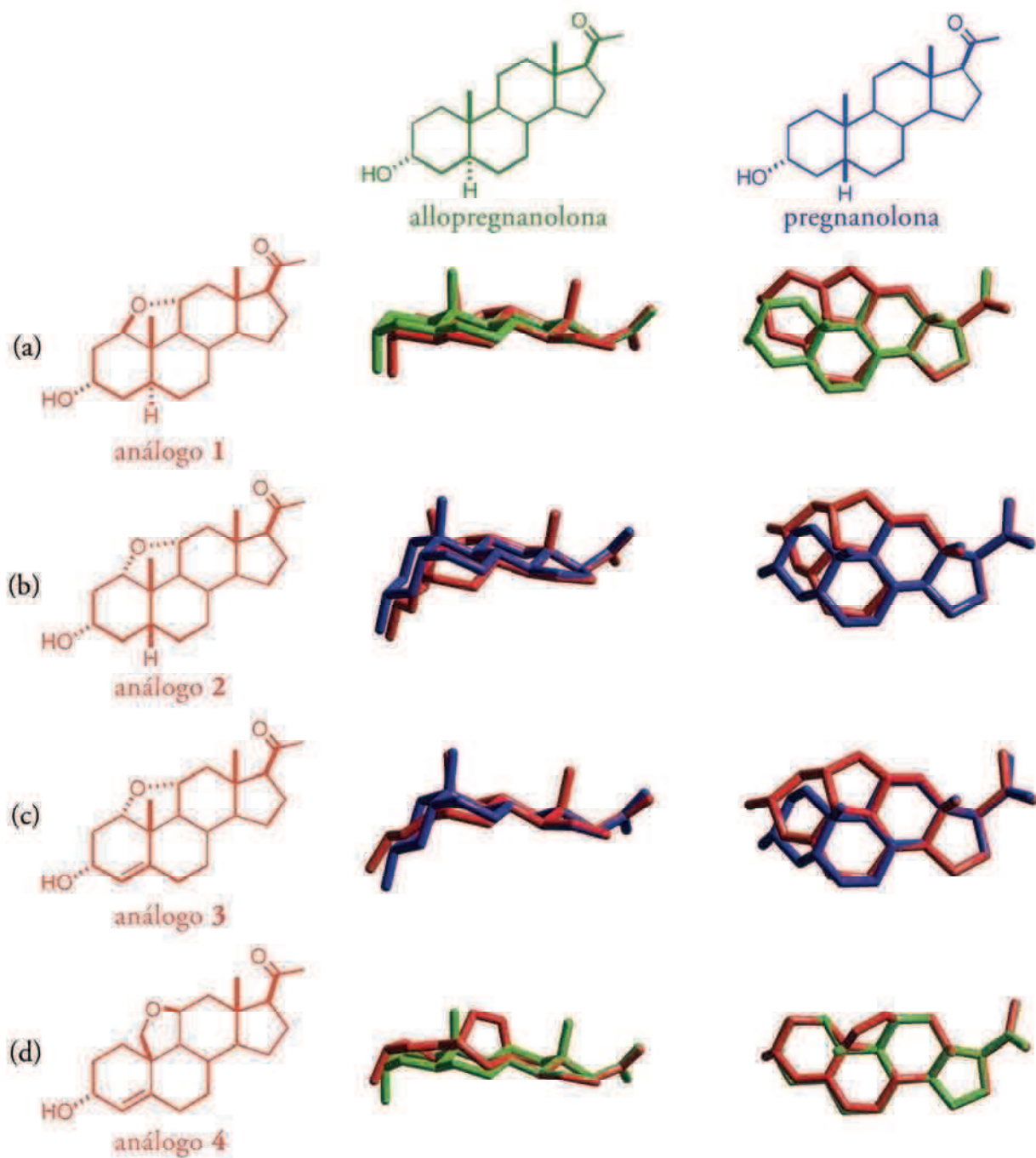
**Figura 2.19** Intermediarios correspondientes a los compuestos 5 $\alpha$ .

En resumen, el análisis termodinámico de la reacción de ciclación de  $11\alpha$ -hidroxiesteroides a través de la obtención de las geometrías optimizadas y de la energía de los intermediarios claves puede utilizarse para explicar el curso de la misma según la conformación del esteroide.

### Análisis conformacional de los análogos 1-4

Como se mencionó anteriormente, la introducción de un puente  $1\alpha,11\alpha$  (**2** y **3**) conduce a una conformación semejante a la de la pregnanolona, mientras que la introducción de un puente  $1\beta,11\alpha$  (**1**) o de un puente  $11\beta,19$  (**4**), conduce a una conformación semejante a la de la allopregnanolona.

En la figura 2.20 se muestra la superposición de las estructuras optimizadas HF/6-31G\*\* de los análogos rígidos sintetizados en esta tesis (**1**, **2**, **3** y **4**) con las estructuras optimizadas de los neuroesteroides allopregnanolona y pregnanolona. Además se determinó para cada estructura la distancia entre los oxígenos  $3\alpha$ -OH y 20-ceto, grupos claves para la actividad neuroesteoides, cuya separación ha sido señalada como un factor importante para conseguir actividad sobre el receptor GABA<sub>A</sub> [25].



Distancias entre oxígenos de los grupos 3 $\alpha$ -OH y 20-ceto (Å)

| allopregnanolona | pregnanolona | análogo 1 | análogo 2 | análogo 3 | análogo 4 |
|------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 10.91            | 10.54        | 10.33     | 10.34     | 10.92     | 11.28     |

Figura 2.20 Superposición de las estructuras optimizadas HF/6-31G\*\* de allopregnanolona y pregnanolona con las de los análogos rígidos de neuroesteroides 1-4.

El análogo **1** posee una conformación global plana, semejante a la de la allopregnanolona, pero con una distancia menor entre los oxígenos de los grupos  $3\alpha$ -OH y 20-ceto. Sin embargo, observando en la dirección perpendicular al esqueleto esteroideal, se encuentra que el puente intramolecular del análogo **1** produce un notable cambio en la estructura del esteroide. Debido a la formación de un nuevo ciclo de cinco miembros, en el que participan átomos de los anillos A, B y C, la distancia entre los C-1 y C-11 disminuye (2.33 Å análogo **1** y 3.08 Å allopregnanolona), acercando el anillo A al anillo C.

El análogo **2** posee, en cambio, una conformación torsionada hacia la cara  $\alpha$  del esteroide, semejante a la de pregnanolona. Nuevamente, a causa del puente intramolecular los anillos A y C se acercan y la distancia entre los oxígenos  $3\alpha$ -OH y 20-ceto disminuye respecto a los de pregnanolona.

El puente  $1\alpha,11\alpha$  del análogo **3** también produce una conformación torsionada, semejante a la de la pregnanolona. Sin embargo, el doble enlace adicional entre átomos C4 y C5 deforma sustancialmente la forma silla del anillo A respecto a la del análogo **2**, resultando una molécula menos torsionada con mayor distancia entre los oxígenos de los grupos  $3\alpha$ -OH y 20-ceto.

El análogo **4** tiene una conformación global plana, levemente más plana que la de allopregnanolona, con una mayor distancia entre los oxígenos de  $3\alpha$ -OH y 20-ceto.

## 2.7 Actividad moduladora del GABA<sub>A</sub> de los análogos 1, 2, 3 y 4

Las relaciones estructura-actividad involucradas en la interacción de los neuroesteroides con el sitio o los sitios de unión en el receptor GABA<sub>A</sub> se han estudiado mediante ensayos de unión al receptor, electrofisiología y ensayos de comportamiento. A causa de esta diversidad, y a que estos ensayos no han sido utilizados de forma sistemática, muchas veces resulta difícil comparar los resultados obtenidos [25].

Entre los ensayos de unión al receptor más utilizados se encuentran aquellos que miden la inhibición de la unión de [<sup>35</sup>S]-TBPS o de [<sup>3</sup>H]-TBOB a sinaptosomas obtenidos de cerebelo de rata. [<sup>35</sup>S]-TBPS y [<sup>3</sup>H]-TBOB son compuestos que se unen a sitios del canal del receptor GABA<sub>A</sub> que tienen afinidad por los neuroesteroides, obteniéndose así información acerca de la actividad de éstos sobre el receptor GABA<sub>A</sub>. Otros ensayos usualmente empleados consisten en determinar la capacidad de los neuroesteroides de estimular la unión de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam (un ligando al sitio de unión para benzodiazepinas del receptor GABA<sub>A</sub>), o en evaluar el efecto sobre la unión de agonistas como el muscimol.

Utilizando el ensayo de inhibición de la unión de [ $^3\text{H}$ ]-TBOB, el grupo de investigación del Dr. Coirini determinó la actividad de los análogos rígidos **1**, **2** y **4** sintetizados en esta tesis (Fig. 2.21). Los neuroesteroides allopregnanolona y pregnanolona, usados como control positivo, inhibieron la unión de [ $^3\text{H}$ ]-TBOB con valores de  $\text{IC}_{50}$  de  $329 \pm 13$  nM y  $830 \pm 11$  nM respectivamente. Comparativamente, el análogo **4** cuya conformación es semejante a la de allopregnanolona, mostró una actividad similar a la misma, mientras que el análogo **1**, también estructuralmente relacionado a allopregnanolona, resultó menos activo. Por otra parte, el análogo **2**, el cual posee igual conformación del anillo A que pregnanolona, pero con una curvatura menor hacia la cara alfa, resultó más activo que este neuroesteroide. Estos resultados indican que la introducción de un anillo adicional en el esteroide permite modular la actividad de los mismos sobre el receptor  $\text{GABA}_A$ .

**Figura 2.21** Inhibición de la unión de [ $^3\text{H}$ ]-TBOB de los neuroesteroides allopregnanolona ( $\text{IC}_{50} = 329 \pm 13$  nM), pregnanolona ( $\text{IC}_{50} = 830 \pm 11$  nM) y de los análogos **1** ( $\text{IC}_{50} = 741 \pm 300$  nM), **2** ( $\text{IC}_{50} = 420 \pm 48$  nM) y **4** ( $\text{IC}_{50} = 518 \pm 68$  nM).

Asimismo, este grupo de investigación se encuentra evaluando el efecto de los análogos **1-4** sobre la unión de [ $^{35}\text{S}$ ]-TBPS, la unión de [ $^3\text{H}$ ]-muscimol y la unión de [ $^3\text{H}$ ]-flunitrazepam.



# CAPÍTULO 3

---

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS RÍGIDOS DE GLUCOCORTICOIDES



En este capítulo se presentan los resultados obtenidos al estudiar la actividad glucocorticoide de dos análogos rígidos previamente sintetizados en el laboratorio: 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP <sup>4</sup>. Este estudio comprende una serie de ensayos biológicos en distintas líneas celulares realizados con el objetivo de obtener un mayor conocimiento sobre las propiedades glucocorticoides de estos compuestos. Antes de exponer los resultados obtenidos se presenta una introducción general sobre los glucocorticoides, su receptor (GR) y sobre su mecanismo general de acción, resaltando los aspectos que resultan imprescindibles para comprender la actividad exhibida por estos análogos rígidos.

### 3.1 Glucocorticoides

#### Descubrimiento

A fines de 1930, varios grupos de investigación, entre ellos el de E. Kendall en la Clínica Mayo de EE-UU, el de T. Reichstein en Suecia y el de O. Wintersteiner en Columbia, aislaron, a partir de extractos de glándulas adrenales, pequeñas cantidades de esteroides activos conocidos actualmente como cortisol y cortisona (Fig. 3.1) [29]. A partir de este descubrimiento, intensos esfuerzos fueron realizados con el fin de obtener mayores cantidades de estos esteroides y de lograr una mayor comprensión de sus propiedades biológicas [30]. La síntesis de cortisona se logró en el año 1946 y los extraordinarios resultados obtenidos al administrar esta droga a pacientes con artritis reumatoide severa fueron inmediatamente aclamados en todo el mundo. La primera inyección en humanos fue realizada en la Clínica Mayo en septiembre de 1948, y rápidamente en 1950 E. Kendall, T. Reichstein y P. Hench obtuvieron el Premio Nobel por este trabajo [30].

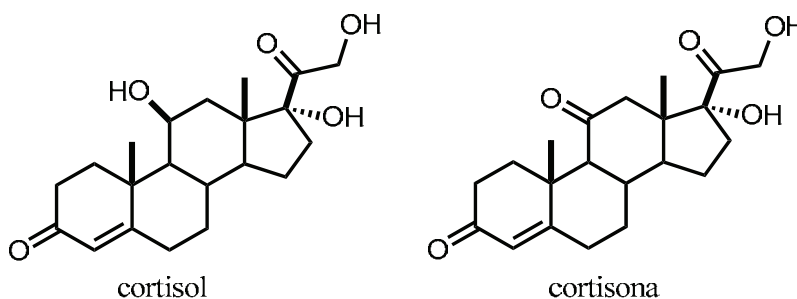


Figura 3.1 Estructuras de glucocorticoides naturales

<sup>4</sup> Capítulo 1, Sección 4



Sin embargo, pronto se descubrió que los efectos benéficos del uso de estos glucocorticoides estaban acompañados de graves efectos secundarios, como el desbalance electrolítico o la osteoporosis. En consecuencia, numerosos grupos de investigación en química medicinal se abocaron a la tarea de buscar modificaciones de la estructura base del cortisol, de manera de encontrar nuevos compuestos con una mejor relación entre efectos benéficos y adversos. Para alcanzar este objetivo no existía una guía establecida a seguir, sino que una gran cantidad de análogos fueron sintetizados y enviados a laboratorios para testarlos en ensayos biológicos determinados. Como resultado de este proceso se obtuvo una gran cantidad de compuestos con actividad glucocorticoide, y paralelamente, se estableció una serie de requisitos estructurales necesarios para que el esteroide posea dicha actividad.

Como veremos más adelante, a pesar de la enorme cantidad de GCs sintetizados durante más de 50 años y de la valiosa información sobre la relación estructura-actividad acumulada, hasta la fecha no se ha podido conseguir un compuesto que carezca por completo de los efectos indeseables, si bien existen muchos que poseen un mejor índice terapéutico que el del cortisol.

### **Biosíntesis, transporte, disponibilidad celular**

El cortisol, principal glucocorticoide endógeno, es sintetizado en la corteza adrenal<sup>5</sup>, y liberado a la circulación sistémica de manera diurna y pulsátil. Su biosíntesis está regulada por una jerarquía de órganos endócrinos compuesta por el hipotálamo, la glándula pituitaria y la corteza adrenal, en lo que se denomina eje HPA [31]. En repuesta a diversas señales, propias del ritmo circadiano o señales derivadas de eventos de estrés psicológico o fisiológico, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), la cual a su vez activa la liberación de la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) en la glándula pituitaria. La ACTH viaja hasta la corteza adrenal donde activa la síntesis de cortisol a partir del colesterol (Fig. 1.2). A su vez, la alta concentración de cortisol ejerce una intensa retroalimentación negativa a distintos niveles del eje HPA, lo que resulta finalmente en un ritmo pulsátil de producción de glucocorticoides endógenos [32].

Luego de su liberación, los glucocorticoides se transportan unidos a proteínas del plasma sanguíneo, principalmente (80%) a la globulina fijadora de cortisol (CBG), 5% a la albúmina y el resto (15%) lo hace de forma libre [33]. La biodisponibilidad intracelular del cortisol en el citoplasma está controlada por la acción de dos enzimas: la 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

<sup>5</sup> Capítulo 1, sección 2

tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2) y la 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1) [29]. La 11 $\beta$ -HSD2 cataliza la conversión de cortisol en cortisona, metabolito con muy baja afinidad por el GR, mientras que, en forma opuesta, la 11 $\beta$ -HSD1 cataliza la conversión de cortisona en cortisol. Los niveles relativos de expresión de estas enzimas, determinantes del nivel de cortisol intracelular, varían según el tipo celular, y constituye un mecanismo de la especificidad de acción de los glucocorticoides. Por ejemplo, como el cortisol también posee afinidad por el MR, mientras que cortisona no, una alta expresión de 11 $\beta$ -HSD2 (como sucede en células de riñón) evita la activación del GR en estos tejidos. En contraste, la alta expresión de 11 $\beta$ -HSD1 asegura altos niveles de cortisol en tejidos con función metabólica, como el tejido adiposo, pulmón o hígado [29].

### Efectos fisiológicos

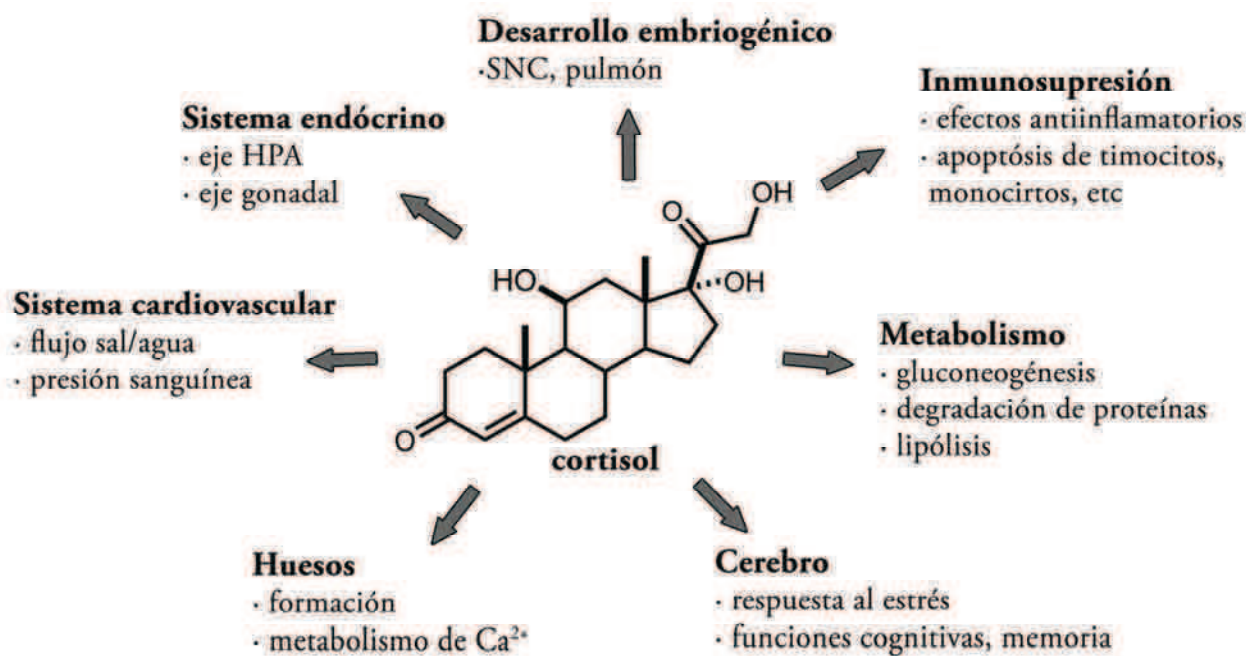
Los glucocorticoides endógenos son esenciales para la vida. Estos esteroides poseen funciones indispensables en varios sistemas, como el endocrino, el renal, el inmune y el neuronal [31], ejerciendo diversos efectos en prácticamente todos los tejidos y órganos del organismo humano (Fig. 3.2). Es justamente esta multiplicidad de acción la que impide clasificar los efectos de los glucocorticoides mediante un esquema sencillo. La acción de los glucocorticoides no debe entenderse como un conjunto discreto de actividades individuales sino como una compleja red de efectos interconectados e integrados en una respuesta fisiológica resultante.

De todas maneras, según la concentración sistémica, la acción global de los glucocorticoides suele dividirse en dos grandes grupos. A baja concentración, la mayoría de los efectos son sobre enzimas involucradas en el metabolismo, mientras que a alta concentración - como por ejemplo en situación de estrés- se activa una amplia red de mecanismos antiinflamatorios e inmunosupresores [31]. Dentro de los efectos metabólicos, la principal función de los glucocorticoides, como su nombre lo indica, es la de incrementar los niveles circulantes de glucosa. Para ello se inducen procesos anabólicos que estimulan la gluconeogénesis en el hígado, a la vez que se activa la acción catabólica en órganos periféricos, dando como resultado la degradación proteica y el aumento de la lipólisis [32]. Por otra parte, los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores están relacionados, principalmente, a la capacidad de los glucocorticoides de inhibir la síntesis, liberación y eficacia de muchas citoquinas proinflamatorias (TNF, IL1, IL2, IL6, entre otras) en diversos tipos celulares, como células T, macrófagos y neutrófilos [31] [34] [35]. Además, estos efectos están complementados con la actividad apoptótica o antiapoptótica que ejercen los glucocorticoides según el tipo celular. Por un lado

inducen la apoptosis en la mayoría de las células nucleadas del sistema vascular, como los timocitos, mielomas o monocitos, pero por otro lado los glucocorticoides poseen propiedades antiapoptóticas en células, tejidos u órganos en donde la inflamación tiene lugar, como por ejemplo en la glándula mamaria, hepatocitos o fibroblastos [36].

Además de los efectos anteriormente mencionados, los glucocorticoides intervienen activamente en el sistema nervioso central (SNC). En el cerebro, no solo la excitabilidad de las neuronas ante un dado estímulo está regulada por los glucocorticoides, sino también su morfología y supervivencia. De esta manera, los GCs poseen claros efectos sobre la memoria y las funciones cognitivas, aunque también afectan otras funciones del SNC, incluyendo la normalización del tono cardiovascular, el estado de alerta y el sueño [35].

Los glucocorticoides también juegan un importante rol durante el desarrollo embrionario, particularmente en las etapas finales de la maduración pulmonar previas al nacimiento [34].



**Figura 3.2** Principales efectos fisiológicos del cortisol en el organismo humano.

Si bien la presencia de glucocorticoides es requisito indispensable para la vida, su exceso, el cual puede ser causado por tumores o anomalías en la hipófisis o en la glándula suprarrenal, provoca graves trastornos, conocidos con el nombre de síndrome de Cushing, con síntomas como obesidad central, cara de luna llena, hipertensión arterial, acumulación de grasa en los hombros, diabetes, impotencia, e inclusive depresión, ansiedad y psicosis.

## Glucocorticoides como drogas

La gran cantidad y diversidad de efectos que ejercen los GCs en el organismo humano los hace un campo extremadamente valioso en cuanto a oportunidades para la explotación farmacológica. Efectivamente, los GCs sintéticos son una de la clase de drogas más prescritas en el mundo y su uso resulta indispensable en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, desórdenes inflamatorios y cáncer, entre otras (Fig.3.3). Se ha estimado que en el año 2003 más del 0.5 % de la población occidental utilizaba crónicamente algún glucocorticoide [37].

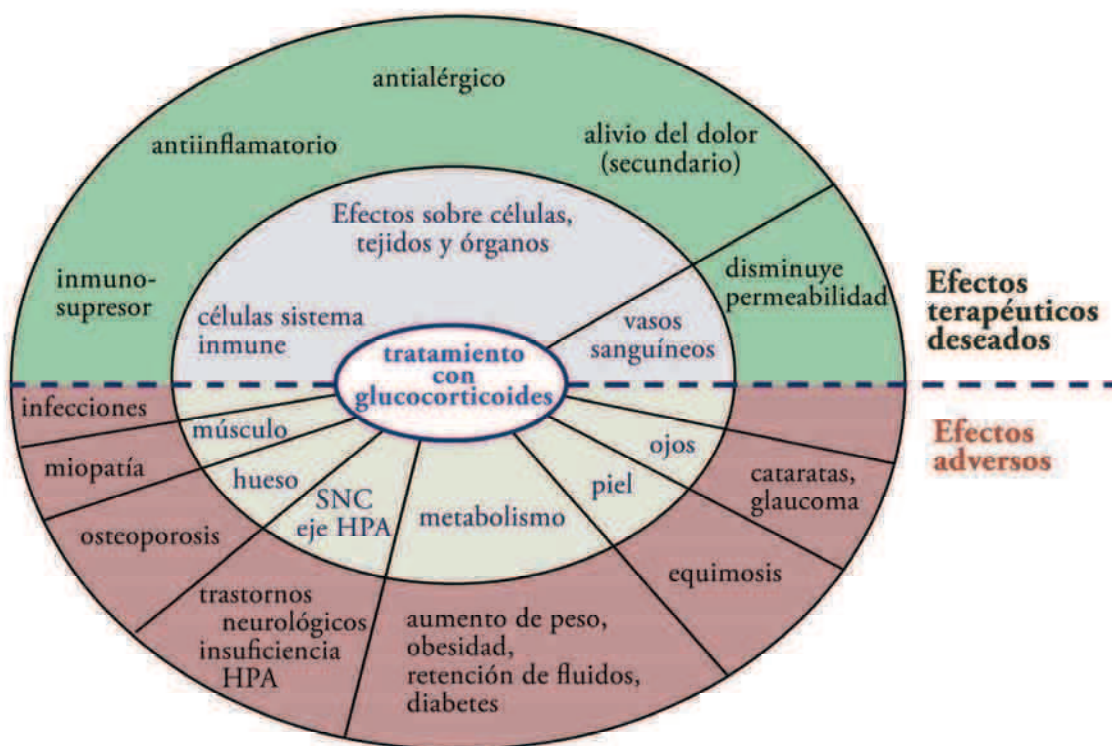
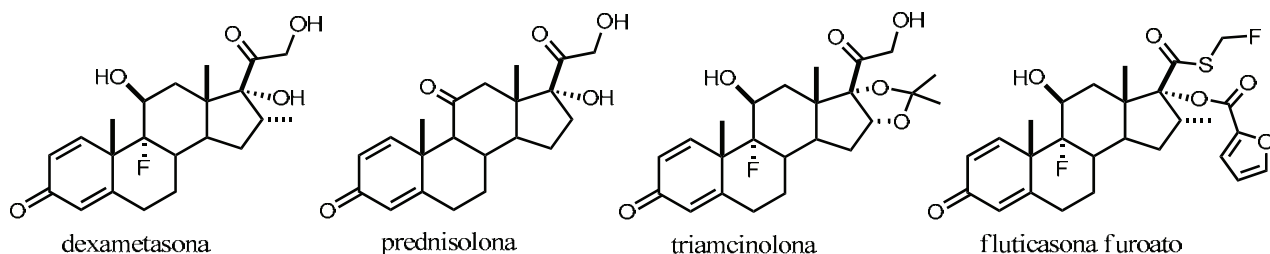


Figura 3.3 Usos clínicos de los glucocorticoides

Además, junto a los receptores de histamina, el GR es el blanco molecular con más drogas aprobadas actualmente en el mercado [38], lo que muestra la importancia farmacológica de este receptor y la alta capacidad que posee para unir diferentes moléculas. Decenas de drogas glucocorticoideas son utilizadas en el tratamiento de distintos trastornos, existiendo formulaciones para administración oral, tópica, ocular, nasal, intramuscular, etc. Dexametasona (dex), prednisolona, triamcinolona, y fluticasona furoato (Fig. 3.4) son ejemplos de glucocorticoides sintéticos ampliamente utilizados clínicamente.



**Figura 3.4** Glucocorticoides sintéticos más utilizados

Lamentablemente, los efectos benéficos deseados del uso de glucocorticoides siempre están acompañados de graves efectos adversos. Cuando los glucocorticoides son prescritos para tratar, por ejemplo, una reacción alérgica de la piel o una úlcera crónica, médicos y pacientes permanecen con la misma sensación: “el diablo combate al diablo” [32]. El uso crónico de GCs sintéticos en dosis farmacológicas provoca efectos similares, o aún más graves, a los causados por el exceso de GCs endógenos. Diabetes, osteoporosis, atrofia de la piel, redistribución de la grasa, glaucoma, hipertensión arterial, psicosis y neurodegeneración, son algunos de los síntomas producidos, según dosis y duración del tratamiento con glucocorticoides [32] [29] [31].

A pesar de los reiterados e intensos esfuerzos realizados durante décadas en el campo de los glucocorticoides a la fecha no existe ningún glucocorticoide que pueda ser usado crónicamente sin presentar severos efectos secundarios. La incertidumbre sobre la existencia de una droga con esas características es un tema latente en la industria farmacéutica [32]. Sin embargo, en los últimos años, el estudio de las bases moleculares de acción del GR se ha incrementado notoriamente, obteniéndose valiosa información que puede ser utilizada para comprender mejor la actividad de los glucocorticoides y lograr el diseño de moléculas más seguras y sin efectos no deseados.

### Relaciones estructura actividad de los GCs

Como consecuencia del intenso proceso de búsqueda de nuevos glucocorticoides llevado a cabo desde su descubrimiento, se han podido establecer algunas consideraciones generales sobre la relación estructura-actividad. El término actividad en este caso no se refiere únicamente a la capacidad de un ligando de unirse al receptor, sino que, en función del ensayo utilizado, incluye una variedad de otros procesos que pueden intervenir en el efecto glucocorticoide medido. La mayor parte de la información obtenida en el desarrollo de glucocorticoides sintéticos deriva del

estudio de su acción tópica, por lo tanto, ciertas propiedades físico-químicas del ligando (solubilidad, coeficiente de partición, etc) intervienen activamente en la respuesta final observada [30]. En la mayoría de los casos, sin embargo, la afinidad de unión al receptor (RBA) de un glucocorticoide correlaciona bien con su potencial terapéutico [30]. Por ejemplo, se ha demostrado que el RBA está relacionado a la eficacia de muchos glucocorticoides inhalados [39]. Además, el RBA de un dado glucocorticoide suele coincidir al trabajar con receptores de distintas especies [39]. El modelo farmacóforo general más aceptado para un glucocorticoide es el siguiente (Fig. 3.5) [39]:

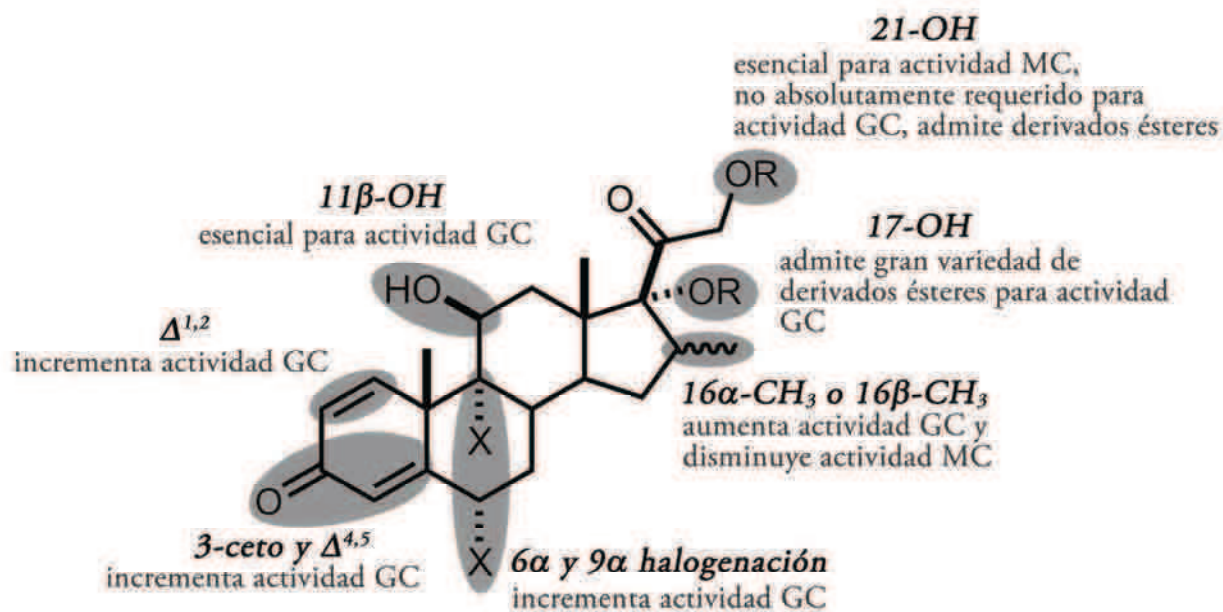


Figura 3.5 Relación estructura-actividad de los glucocorticoides

- En el anillo A, el grupo 3-ceto y el  $\Delta^{4,5}$  son esenciales para la actividad glucocorticoidea, mientras que la presencia de un doble enlace adicional en posición 1,2 la incrementa.

- En el anillo B, la presencia de un halógeno (comúnmente fluor, y en algunos casos cloro) en posiciones 6 $\alpha$  y 9 $\alpha$  aumentan la actividad. Si bien la presencia de estos átomos hace al esteroide más resistente a los procesos metabólicos de degradación, también está comprobado que aumentan la afinidad de unión. Cabe resaltar además, que estas modificaciones también aumentan la afinidad del esteroide por el MR, con lo cual se incrementan los efectos adversos relacionados a este receptor.

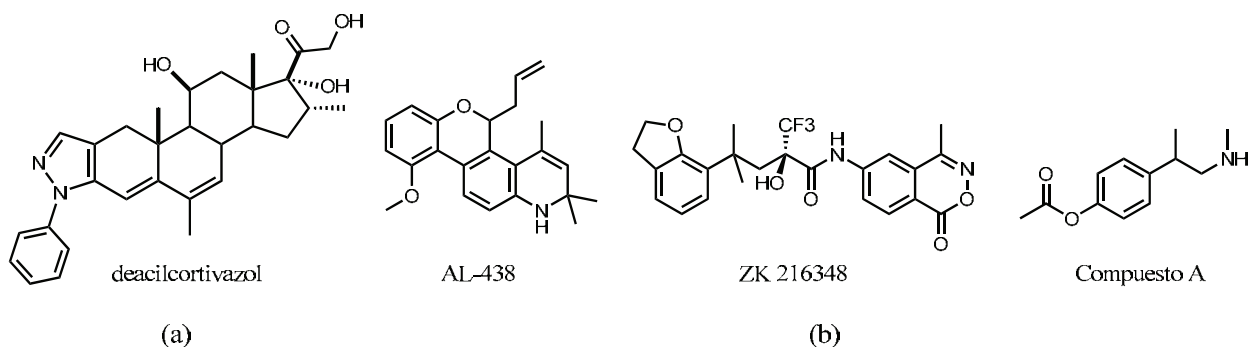
- En el anillo C, el hidroxilo 11 $\beta$  es requerido para la actividad glucocorticoide.

- En el anillo D, existe un cierto grado de libertad en la sustitución en los C16 y C17. La introducción de un metilo en 16 ( $\alpha$  o  $\beta$ ) tiende a aumentar la actividad glucocorticoidea y disminuir la actividad mineralocorticoidea. Se han sintetizado una gran cantidad de derivados sobre el 17-OH, mayormente ésteres, los cuales aumentan significativamente la actividad.

- Al igual que en posición 17, el 21OH admite una gran variedad de derivados ésteres.

Este modelo del farmacóforo de un glucocorticoide no debe considerarse de forma estricta. Al estar basado únicamente en información obtenida con ligandos derivados del cortisol, describe únicamente a una de las muchas clases posibles de compuestos que pueden unirse al receptor de glucocorticoide (GR). Existen esteroides con alta afinidad por este receptor que no cumplen estos requisitos, e incluso se conocen varios ligandos de estructura no esteroidea que tienen importantes propiedades glucocorticoides (Fig. 3.6).

Además, este modelo describe solo las relaciones estructura-actividad de glucocorticoides con actividad agonista, es decir con efectos similares a los del cortisol, sin tener en cuenta que para el GR también existen compuestos antagonistas (antiglucocorticoides), los cuales bloquean la acción de los agonistas.

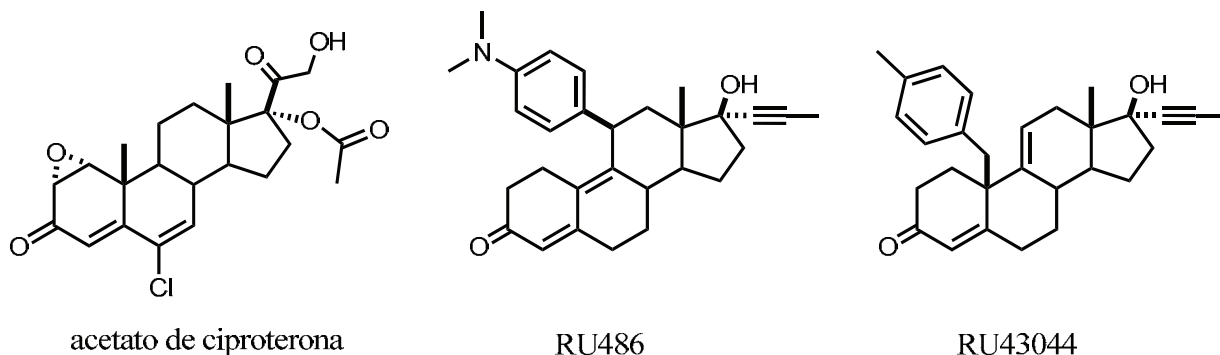


**Figura 3.6** a) Glucocorticoide que no cumple el modelo farmacóforo b) Glucocorticoides no esteroidales

### Antiglucocorticoides

Al igual que los glucocorticoides, los antiglucocorticoides poseen un gran número de aplicaciones clínicas. Un antiglucocorticoide podría ser utilizado, en principio, para tratar aquellos trastornos causados, justamente, por un exceso de glucocorticoides endógenos o sintéticos: síndrome de Cushing, hipertensión dependiente de glucocorticoides, inmunosupresión inducida por glucocorticoides, diabetes, depresión central y ansiedad, presión ocular y glaucoma son algunos de los usos potenciales de los antiglucocorticoides.

Los únicos compuestos con actividad antigluco corticoide que existen actualmente en el mercado son el acetato de ciproterona y la mifepristona (RU486) (Fig. 3.7). Sin embargo, ninguno de ellos es utilizado como tal, sino por la actividad antagonista que poseen sobre otro tipo de receptor de esteroides (SR).



**Figura 3.7** Antigluco corticoides

El acetato de ciproterona es, además de un antigluco corticoide débil, un antiandrógeno fuerte utilizado comúnmente en el tratamiento de cáncer de próstata. RU486 es un antigluco corticoide fuerte, de afinidad por el GR similar a la de los glucocorticoides agonistas más potentes, que también posee un fuerte efecto antiprogéstágeno, debido al cual RU486 se utiliza como abortivo [40]. Aunque se han sintetizado cientos de análogos de RU486 en busca de separar la actividad antigluco corticoide de la antiprogéstágena, en la mayoría de los casos en que esto se logró, la actividad remanente fue la antiprogéstágena [41]. Muchos menos casos resultaron con actividad principal antigluco corticoide, por ejemplo RU43044 (Fig. 3.7) es un antigluco corticoide puro, con 1/6 de la actividad de RU486 pero solo activo *in vitro* ya que se metaboliza rápidamente [42].

Resumiendo, el uso como antigluco corticoide de las dos únicas drogas aprobadas en el mercado (el acetato de ciproterona y la RU486), está restringido debido a la interacción cruzada que poseen con otros SR. Un antigluco corticoide específico apto para uso clínico y sin efectos sobre otros SR es aún una meta pendiente.



## 3.2 El receptor de glucocorticoides (GR)

El GR es una proteína perteneciente a la familia de receptores de esteroides (SR), la cual forma parte a su vez de la superfamilia de receptores nucleares (NR). El GR está codificado por el gen NR3C1, de 9 exones y que se expresa en casi todos los tejidos y órganos del organismo humano. Como se verá posteriormente, existen muchas isoformas del GR cuyo nivel de expresión depende del tipo celular y que poseen diferente actividad. En esta sección se describirán las características generales de los NR y SR, dejando los detalles de la estructura molecular del GR y de las bases moleculares de acción para ser discutidos con mayor profundidad en el capítulo 4.

### Receptores Nucleares (NR)

Simplificando el mecanismo de acción de los NRs, puede decirse que estos son receptores solubles que actúan como factores de transcripción luego de unirse a ligandos específicos. La superfamilia de NR se caracteriza porque sus miembros están formados por tres dominios de diferente estructura y función: un dominio N terminal de activación independiente del ligando, un dominio central de unión al DNA y un dominio C terminal de unión al ligando. En humanos, la exploración completa del genoma muestra que la superfamilia de NRs incluye 48 receptores, entre los que se destacan los receptores de esteroides (SR), de hormona tiroidea (TR), de vitamina D (VDR) y de ácido retinóico (RAR) [35]. Además, existen muchos NR denominados huérfanos ya que, hasta la fecha, no se conoce si unen algún ligando [43] [44].

Los NRs cumplen variadas y esenciales funciones en el organismo, como por ejemplo en el desarrollo embriónico, en el metabolismo y en la muerte celular. La disfunción en la señalización de los NR produce enfermedades de orden proliferativo, reproductivo y metabólico, como cáncer, infertilidad, obesidad y diabetes, entre otras [43]. Teniendo en cuenta que los NRs han sido seleccionados por la naturaleza para unir específicamente moléculas orgánicas pequeñas, no es sorprendente que los NRs posean una rica historia en el área del descubrimiento de drogas. Las drogas que actúan sobre algún NR están entre las más comúnmente usadas y según información compilada en 2003, 34 de las 200 drogas más prescritas en el mundo poseen como blanco molecular algún NR [44].

Si bien la mayoría de los NRs fueron considerados inicialmente como simples factores de transcripción, estudios acumulados durante las últimas décadas muestran que el mecanismo global de acción de los NRs es mucho más complejo. Los NRs interactúan con una gran diversidad de otras proteínas, regulando la expresión génica mediante múltiples mecanismos a distintos niveles, dependientes del tipo celular. La alta dificultad en el diseño de drogas para los

NRs radica principalmente en la vasta complejidad de la biología asociada a su modo de acción. Globalmente, la meta actual en el descubrimiento de drogas para NRs es manipular el receptor por medio de ligandos específicos de manera de retener los beneficios tejido-selectivos mientras se minimizan los efectos indeseables.

### Receptores de Esteroides (SR)

El genoma humano contiene seis genes estrechamente relacionados que codifican para los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GR, MR, PR y AR. Cada receptor es funcionalmente distinto, uniendo cada uno, preferentemente, un ligando endógeno específico. Estudios de evolución genética proponen que todos estos receptores derivarían de un mismo gen ancestral, el cual codificaba para un SR ancestral con funcionalidad de ER $\alpha$  [45]. De esta manera el primer receptor de la familia era activado por el estradiol, metabolito sintetizado en la etapa final de la biosíntesis de esteroides. Esto implica que nuevos pares hormona-receptor emergieron cuando un receptor ancestral se duplicó y luego evolucionó incrementando la afinidad por esteroides ya presentes, convirtiendo a estos intermediarios en nuevas hormonas. En la misma línea, se propone que el GR evolucionó a partir del MR luego que este sufriera determinadas mutaciones puntuales que hicieron al nuevo receptor específico para la unión de cortisol [46].

Como consecuencia de esa relación evolutiva existe una alta similitud de secuencia entre los dominios de unión al ligando de los SR (Fig. 3.8), lo cual causa interacciones cruzadas entre las hormonas endógenas y los receptores. Por ejemplo, el cortisol también pueden unirse al MR con alta afinidad, y la progesterona, ligando natural del PR, también exhibe propiedades antimineralocorticoides. Esta promiscuidad entre hormonas y receptores es un factor determinante en el diseño de fármacos que actúen a través de algún SR.

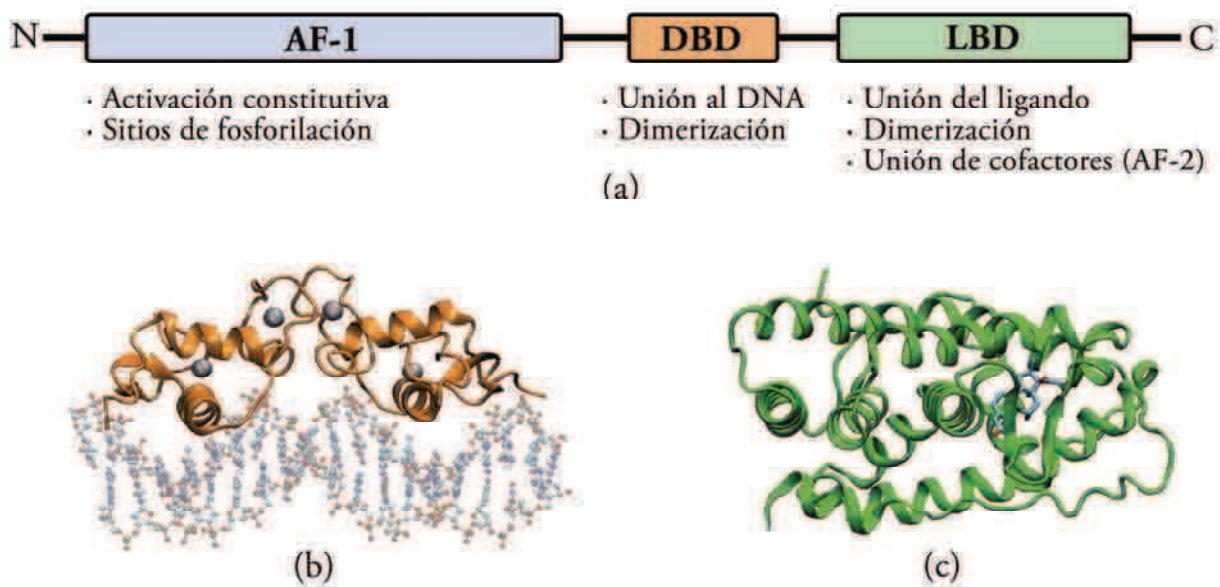
|  | AF-1  | DBD  | LBD  |             |
|--|-------|------|------|-------------|
|  | 100%  | 100% | 100% | GR          |
|  | < 15% | 94%  | 60%  | MR          |
|  | < 15% | 92%  | 50%  | PR          |
|  | < 15% | 86%  | 50%  | AR          |
|  | < 15% | 52%  | 24%  | ER $\alpha$ |
|  | < 15% | 52%  | 23%  | ER $\beta$  |

Figura 3.8 Porcentaje de similitud de secuencia entre los SR según dominio

Algunos de los efectos adversos del uso de GCs sintéticos antes mencionados se deben a que estos ligandos interaccionan también con el MR, afectando el balance electrolítico del organismo. Por otro lado, hemos visto que RU486 está limitado en su uso clínico como antiglucocorticoide por su fuerte actividad antiprogéstágena, mientras que el acetato de ciproterona es un débil antiglucocorticoide utilizado como antiandrógeno. Así, a la hora de diseñar nuevos ligandos para el GR, resulta esencial que no presenten interacciones cruzadas con los demás SR.

### Estructura del GR

Al igual que los demás NRs, el GR es una proteína modular organizada en tres dominios con estructura y función bien diferenciada (Fig. 3.9a).



**Figura 3.9.** a) Principales funciones asociadas a cada dominio. b) Estructura del GR DBD unido al DNA (pdb:1r4r). c) Estructura del GR LBD (pdb:1n2z)

#### *Dominio de función de activación 1 (AF-1)*

En términos tanto de tamaño como de homología, el AF-1 es el dominio más variable (menos conservado) entre los NR, e incluso entre diferentes especies del GR. El GR AF-1 está formado por 420 residuos, los cuales no adoptan una estructura terciaria bien definida y cumplen

una función de activación independiente del ligando, uniendo cofactores indispensables para la actividad transcripcional. Además, este dominio posee sitios que pueden ser fosforilados, por ejemplo por la N terminal jun quinasa (JNK), lo que altera su translocación al núcleo y por consiguiente su actividad.

#### *Dominio de unión al DNA (DBD)*

Este dominio, altamente conservado entre los NR y especies de GR, está formado por 63 residuos. Dos grupos de Cys altamente conservadas, cada una coordinando un átomo de Zn, estabilizan una conformación adecuada para la unión a secuencias específicas del DNA, denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). La secuencia consenso GRE consiste en dos secuencias de 6 nucleótidos conservados, separados por 3 bases no conservadas: TGTTCTnnnAGAACA [47]. El GR interacciona con los sitios GRE como dímero, con un monómero unido a cada una de estas secuencias conservadas. El DBD contiene tres hélices, la primera encaja en el surco mayor del DNA, mientras que la segunda y el loop que la precede crean una interfase de homodimerización. Utilizando rayos X o RMN se han obtenido numerosas estructuras del homodímero GR DBD y de éste unido a un oligonucleótido de secuencia GRE (Fig. 3.9b) [48] [49] [50].

#### *Dominio de unión al ligando (LBD)*

Como su nombre lo indica, este dominio, formado por 250 residuos, posee una cavidad a la cual se une específicamente el ligando. Además, el GR LBD posee otras dos regiones fundamentales para la actividad del receptor: la región AF-2 y una segunda interfase de dimerización. El GR LBD, al igual que los LBD de otros NR, está constituido por 10  $\alpha$ -hélices y 2 hojas beta que se pliegan en una estructura globular, con tres grupos de hélices que forman los lados y la tapa del glóbulo (Fig. 3.9c). La estructura y función de cada región de este dominio será desarrollada con más detalle en el capítulo 4.

### **Especificidad de acción: isoformas y cofactores**

La actividad del GR depende del tipo celular. Un ejemplo clave de esta dependencia tisular es la respuesta biológica a glucocorticoides en el control de la muerte celular. Mientras que en algunos tipos celulares los glucocorticoides son agentes proapoptóticos, en otros poseen el efecto opuesto. La especificidad tisular del GR está dada por varios factores, entre los que se

incluyen, la expresión específica de diferentes isoformas y la presencia de cofactores específicos en cada tipo celular.

El splicing alternativo del transcrito primario del gen NR3C1 genera dos proteínas, el GR $\alpha$ , más abundante y descrito anteriormente, y una variante denominada GR $\beta$ . Estas dos isoformas poseen idénticos dominios AF-1 y DBD, diferenciándose únicamente en el dominio LBD. El GR $\beta$  es una proteína más corta que GR $\alpha$  (742 residuos contra 777 residuos), siendo los 15 residuos finales únicos para la isoforma GR $\beta$ . Inicialmente se había informado que GR $\beta$  no unía ligando y que regulaba la expresión génica solamente inhibiendo la acción de GR $\alpha$ , comportándose como un dominante negativo de GR $\alpha$ . Sin embargo, datos recientes muestran que GR $\beta$ , en ausencia de GR $\alpha$ , puede regular la expresión génica y además es capaz de unir el ligando RU486. Los niveles relativos de expresión de estas dos isoformas, determinados por el tipo celular, constituyen así un mecanismo de la especificidad de acción de los glucocorticoides [51].

Recientemente, se ha informado otro mecanismo adicional para generar heterogeneidad del GR: la traducción del transcrito maduro del GR $\alpha$  puede iniciarse en sitios alternativos, codones AUG internos, generándose distintas isoformas de traducción que solo difieren en la longitud del dominio N terminal AF-1. Estudios realizados en ratón y rata muestran que el nivel de expresión de estas isoformas depende claramente del tejido analizado, y que cada isoforma regula de manera particular la expresión génica del tejido [51].

El término cofactores designa a familias de proteínas que regulan la actividad transcripcional de los NRs. Generalmente, los cofactores son proteínas enzimáticamente activas que median, principalmente reorganizando la cromatina, la señal entre el receptor unido al DNA y la maquinaria transcripcional. Clásicamente, los cofactores han sido clasificados como coactivadores o corepresores, dependiendo de la influencia que poseen sobre la actividad del NR. Los coactivadores son proteínas que, o bien poseen actividad acetiltransferasa de histonas, o bien reclutan otras proteínas con esta actividad, lo que conduce finalmente al remodelamiento de la cromatina y la subsiguiente activación de la transcripción [52] [53]. En cambio, los corepresores son proteínas con actividad deacetiltransferasa de histonas, o que reclutan otras con esta actividad, que resulta en una compactación de la cromatina, inhibiendo la transcripción [52]. Más de cien cofactores distintos han sido descubiertos [35] para los NRs, estando su expresión determinada por el tipo de tejido. Además, y no menos importante, es que la mayoría de estos cofactores no son específicos de un dado receptor sino que regulan la actividad de muchos NR distintos, así como la de otros factores de transcripción [54], siendo entonces elementos fundamentales de la regulación de la expresión génica. El nivel de expresión de un cofactor dado

depende del tipo de tejido y del contexto celular [53]. Así, el control espacial y temporal de la expresión de los cofactores constituye un mecanismo de la especificidad de acción de los NR.

Para el GR se conocen varias familias de coactivadores que interaccionan directamente con el receptor. Algunos interaccionan con el dominio AF-1, como BRG1 (SWI/SNF), o P/CAF (ADA/SAGA), y otros con el LBD, como la familia p160. La familia de coactivadores p160 contiene tres miembros, SRC-1/NCOA-1, TIF2 (o GRIP1) y p/CIP, que poseen repetidos motivos LxxLL adecuados para la unión al dominio AF-2 del LDB. Dado que estos coactivadores, además de unirse al GR, poseen la capacidad de interaccionar entre sí, existe comunicación entre los dominios AF-1 y AF-2 del receptor [52, 54] [52]. También se conocen corepresores, como NCoR o SMRT, que interaccionan directamente con el LBD del GR.

### 3.3 Mecanismo de acción de GR

#### Modelo disociado

El GR regula la expresión, positiva o negativamente, de cientos de genes, según tipo y contexto celular. Para ello, como se mencionó anteriormente, el GR interacciona, además de con el ligando, con una gran cantidad de otras proteínas (factores de transcripción, chaperonas, cofactores, etc), tanto en el citoplasma como dentro del núcleo, y con regiones específicas del DNA. Por lo tanto, debería considerarse una compleja red de interacciones al intentar explicar los mecanismos moleculares de acción de los glucocorticoides. A pesar de ello, en muchos ámbitos todavía se acepta un modelo extremadamente simplificado de cómo el receptor regula la expresión génica. Este modelo, que llamaremos *modelo disociado*, establece que existen dos grandes modos de acción por los cuales el GR actúa: un modo directo y otro indirecto (Fig. 3.10). En el modo directo, denominado *transactivación*, el receptor, luego de ser activado por la unión del ligando, se une como homodímero a sitios GRE presentes en los promotores de los genes blanco, lo cual conduce a la transcripción de estos genes. En cambio, en el modo indirecto, denominado *transrepresión*, el complejo ligando-receptor, como monómero, inhibe la expresión de genes activados por otros factores de transcripción, como NFκB o AP-1.

Si bien es cierto que muchos genes son regulados por alguno de estos mecanismos, hay muchos otros cuyo modo de acción no se corresponde con ninguno de ellos. El término transactivación debe su origen a razones históricas ya que, en realidad, este mecanismo debería nombrarse *cis-activación* debido a que en él ocurre la unión del GR al DNA.

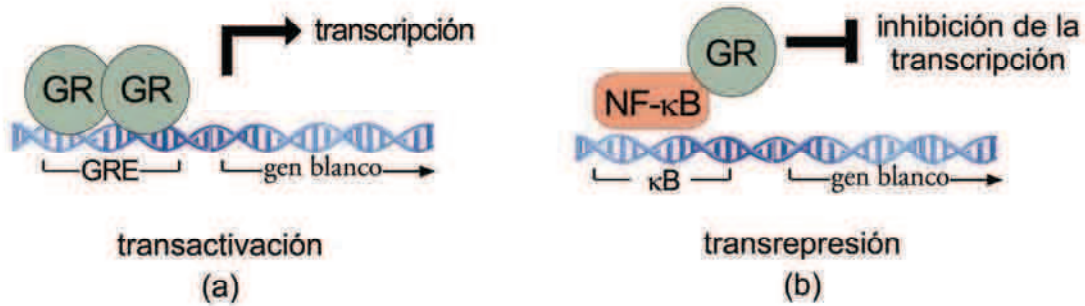


Figura 3.10 Principales modos de acción del GR según el modelo disociado

Incluso existen genes que poseen sitios denominados GRE negativos (nGRE) a los cuales se unen homodímeros de GR, pero que, en lugar de activar la transcripción, la inhiben y usualmente a este mecanismo también se lo clasifica como transactivación, cuando correspondería llamarlo *cis*-represión. El término transrepresión en ocasiones tampoco resulta adecuado, ya que también hay genes regulados por otros factores de transcripción, como STAT5, que en lugar de inhibirse en presencia del GR, se inducen.

Más allá de la terminología usada, el verdadero riesgo del modelo disociado está en que generalmente acepta que los genes regulados por el mecanismo de transactivación están asociados a los efectos metabólicos del uso de glucocorticoides (o sea los efectos adversos indeseables), mientras que los genes regulados por la transrepresión intervienen en los efectos antiinflamatorios (o sea los efectos benéficos deseados) (Fig. 3.11a).

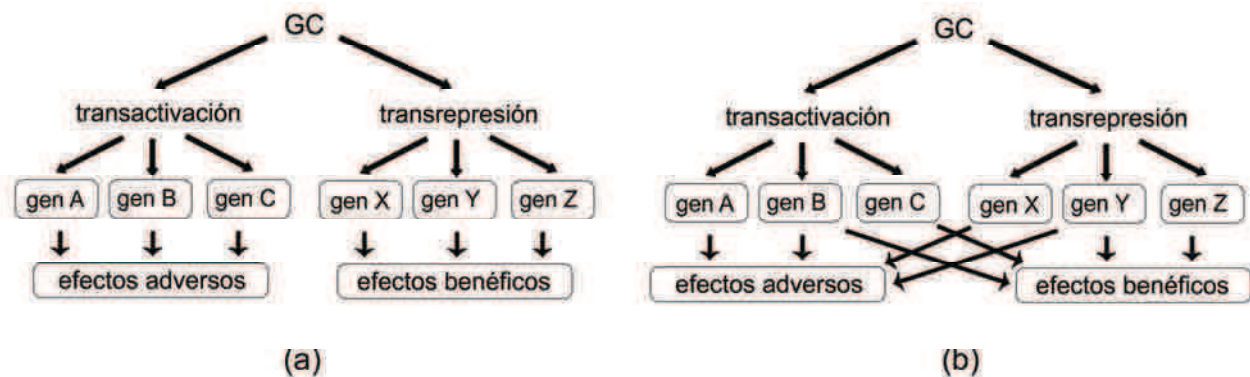


Figura 3.11 Esquemas del modo de acción del GR [55]

Bajo este supuesto surge entonces el concepto de glucocorticoide disociado: un glucocorticoide que sea capaz de hacer transreprimir pero no transactivar al GR, manteniendo los efectos antiinflamatorios benéficos pero sin los efectos adversos, siendo, desde el punto de vista farmacológico, el glucocorticoide ideal

### Limitaciones del modelo disociado

Si bien este modelo es altamente reduccionista, resulta de enorme utilidad a quienes buscan encontrar nuevos glucocorticoides disociados, ya que existen métodos relativamente sencillos para medir tanto la capacidad de transactivación (por ejemplo observando la expresión de genes reporteros manejados por promotores con sitios GRE), como la capacidad de transrepresión (por ejemplo, inhibición de la actividad de AP-1), de una gran cantidad de compuestos con elevada eficiencia. La aceptación del modelo disociado permite, por lo tanto, emplear métodos de screening simples de alta capacidad en busca de nuevos glucocorticoides con mejor índice terapéutico.

La creciente expectativa por encontrar algún glucocorticoide disociado ideal se vio reforzada con el descubrimiento del mutante A458T del mGR, denominado GR<sup>dim</sup>. Según sus descubridores, el GR<sup>dim</sup> es un receptor incapaz de homodimerizar que transreprime a otros factores de transcripción, como AP-1 y NFκB, pero no transactiva a genes regulados por sitios GRE [56] [57] [58]. De esta manera se estableció la idea de que si una mutación puntual es capaz de producir un cambio en el receptor que lo hace disociar las acciones de transrepresión de las de transactivación, muy probablemente existan ligandos que también puedan lograrlo. Dado que la aceptación del modelo disociado influye sobre el proceso de búsqueda de nuevos glucocorticoides, resulta verdaderamente importante analizar su validez.

En los últimos años, gran cantidad de trabajos muestran evidencia de por qué el modelo disociado debe ser sustituido por un modelo más general y abarcativo del mecanismo de acción de los glucocorticoides [59] [31] [55]. Numerosos compuestos, algunos quizás con buen perfil de actividad, pueden haber sido ignorados y descartados al evaluar únicamente la relación de actividades de transactivación y transrepresión. La asociación de los efectos adversos a la transactivación y de los benéficos a la transrepresión es una simplificación extrema, y equivocada, de la situación general de la acción del GR, pues, aún aceptando que la transactivación y transrepresión son los únicos mecanismos de acción del GR, existen tanto genes involucrados en respuestas benéficas regulados por transactivación como genes de respuestas adversas por transrepresión [60] (Fig. 3.11b).



Si bien los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides se relacionan tradicionalmente al mecanismo de transrepresión, la activación de genes juega un rol importante en estos efectos, con lo que aquellos ligandos incapaces de activar genes podrían carecer de una importante componente de la acción antiinflamatoria. En apoyo a esto, se ha demostrado que el GR<sup>dim</sup> puede actuar en algunos de los mecanismos inflamatorios, pero no en todos, no ejerciendo entonces los glucocorticoides una respuesta antiinflamatoria completa. Por ejemplo, en monos que expresan únicamente el GR<sup>dim</sup>, si bien el tratamiento con GCs de la dermatitis irritante produce los mismos resultados que en el caso del GR salvaje, la respuesta contra la hipersensibilidad de contacto desaparece, y mientras que la supresión de algunos mediadores inflamatorios se conserva, caso de TNF- $\alpha$  o MMP-13, no se observa la de otros como MCP-1 o IL-1beta. Por otro lado, los efectos adversos de los glucocorticoides no están dados exclusivamente por la activación de genes. Por ejemplo, si bien la inducción de enzimas catabólicas es suprimida en monos expresando el GR<sup>dim</sup>, la inducción de la osteoporosis resulta similar al caso de GR salvaje, indicando que la inhibición de genes participa en este efecto adverso [32].

El descubrimiento de ligandos como RU24858, ZK216348 y AL-438 (Fig. 3.12) también aporta evidencia contra el modelo disociado. A pesar de que estos ligandos en ensayos *in vitro* cumplen los requisitos para ser nombrados como disociados, es decir transreprimen pero no transactivan, cuando se los prueba *in vivo* ninguno logra alcanzar completamente la disociación de los efectos deseados de los adversos [32].

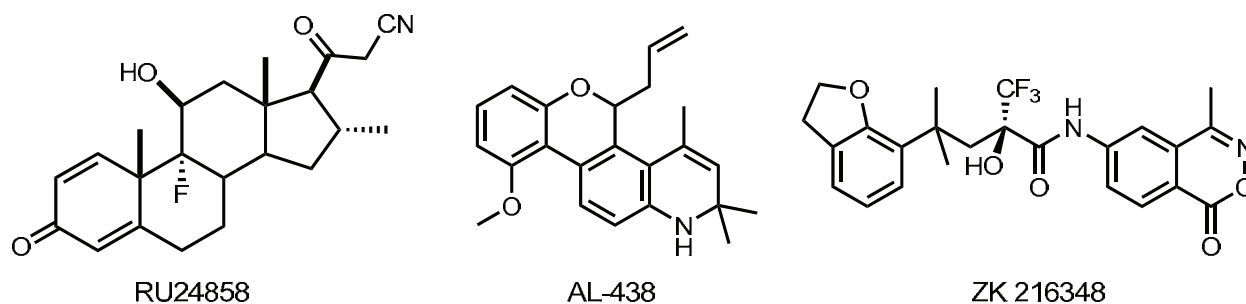


Figura 3.12 Glucocorticoides con actividad disociada *in vitro*

Pero no solo resulta equivocado el hecho de asociar la transactivación a los efectos adversos y la transrepresión a los efectos benéficos, sino que incluso la simple clasificación del mecanismo de acción en transactivación y transrepresión debe ser revisada. Prueba de ello es que la mayoría de los genes activados directamente por los GCs no parecen estar controlados por sitios GRE convencionales. Por ejemplo, un estudio de microarray en linfomas T de ratón

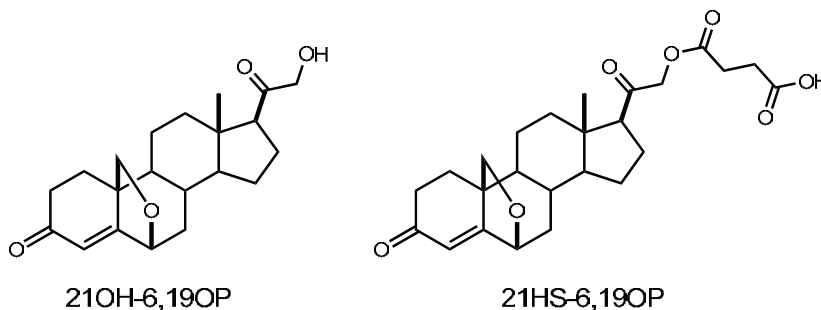
identificó 44 genes directamente regulados por GCs, de los cuales solo 5 poseen sitios que coinciden exactamente con la secuencia GRE consenso [61]. Todo esto sugiere que los GCs tienden a regular la expresión génica principalmente a través de elementos de secuencia que no son los clásicos GRE consenso. Incluso, genes como TAT o PEPCK, utilizados como modelo de transactivación y considerados representativos de los efectos adversos, son en verdad regulados de una manera mucho más compleja de lo que se aceptó originalmente [55].

### Moduladores selectivos del GR

La discusión anterior revela entonces que el concepto de glucocorticoide disociado debe ser abandonado y reemplazado por el de *modulador selectivo*. El concepto de *modulador selectivo* emergió con el descubrimiento del efecto del tamoxifeno en el ER. La actividad del tamoxifeno depende del tipo de tejido, en el útero posee efectos estrogénicos, mientras que en la mama es un antiestrogénico. Así, dado que el tamoxifeno modula selectivamente la actividad de su receptor según el tipo celular, se lo ha designado con el término de modulador selectivo del ER (SERM) [43, 44]. Este concepto rápidamente fue trasladado a otros receptores (PR, AR, etc), y finalmente adoptado para los NR en general (SNuRMs), constituyendo actualmente un concepto fundamental para el diseño de nuevas drogas de estos receptores. En el caso del GR, muy probablemente, el empeño en encontrar ligandos disociados ideales haya retrasado la aceptación del concepto de moduladores selectivos del GR (SGRMs).

### 3.4 Análogos rígidos de glucocorticoides

21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP (Fig. 3.13)<sup>6</sup> son dos análogos rígidos de glucocorticoides sintetizados en nuestro grupo de investigación, los cuales en ensayos biológicos previos exhibieron interesantes propiedades glucocorticoides.



**Figura 3.13** Estructura de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP

<sup>6</sup> Capítulo 1, Sección 4

Al evaluar la actividad de 21OH-6,19OP sobre los receptores GR, MR y PR se encontró que este análogo rígido es un antagonista del GR, sin afinidad por el MR y el PR. Este comportamiento hace que 21OH-6,19OP sea un compuesto sumamente atractivo desde el punto de vista farmacológico, ya que como vimos anteriormente aún no existe en el mercado una droga con actividad antiglucocorticoide específica. Por otro lado, la introducción de un grupo hemisuccinato en la posición 21 de 21OH-6,19OP conduce a un nuevo derivado, 21HS-6,19OP, también específico para el GR pero con una actividad diferente a la de su precursor.

En este trabajo se planearon y realizaron diferentes ensayos biológicos con la finalidad de profundizar el estudio sobre la actividad glucocorticoide de estos análogos rígidos. Antes de exponer los resultados obtenidos, se presenta análisis breve de las características estructurales de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP, y de los antecedentes de su actividad biológica.

### 21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona (21OH-6,19OP)

Al igual que dexametasona (dex) o cortisol, 21OH-6,19OP posee el sistema  $\Delta^4$ -3-ceto y la misma cadena lateral en posición  $17\beta$  (Fig 3.14), pero, a diferencia de estos ligandos agonistas, en el análogo rígido no existen los hidroxilos en posiciones  $11\beta$  y  $17\alpha$ . Como se mencionó anteriormente<sup>7</sup>, RU486 (Fig. 3.14) es una droga que posee fuerte actividad antiglucocorticoide y antiprogéstágena. Estructuralmente, 21OH-6,19OP y RU486 comparten algunas importantes características. En la Fig 3.14 se comparan las estructura obtenidas por cálculos HF/6-31G\*\* de estos esteroides con las de cortisol y dex. En esteroides  $\Delta^4$  como 21OH-6,19OP, el puente 6,19 tuerce el esqueleto esteroide en la unión entre anillos A y B, estabilizando una conformación global curvada, en la cual el anillo A está formando una semisilla invertida  $1\beta$ ,  $2\alpha$  (Fig. 3.14), disposición opuesta a la encontrada en el cortisol ( $1\alpha$ ,  $2\beta$ ), pero similar a la de RU486.

Al superponer la estructura cristalina que adopta RU486 dentro del GR LBD [62] con la estructura de mínima energía de 21OH-6,19OP, se observa que las conformaciones de estas dos moléculas resultan notablemente similares (Fig. 3.15a). En contraposición, la conformación de 21OH-6,19OP es muy diferente de la conformación global de dex dentro del GR LBD (Fig. 3.15b). Estas características estructurales se ven reflejadas en los valores del ángulo de torsión entre C1-C10-C5-C6, ángulo representativo del nivel de torsión del esteroide, ya que este resulta similar para 21OH-6,19OP y RU486 pero diferente para dex. No obstante, también existen diferencias estructurales fundamentales entre estos dos antiglucocorticoides. RU486 es una molécula muy flexible, cuya conformación global depende del entorno.

<sup>7</sup> Capítulo 3, sección 1.6

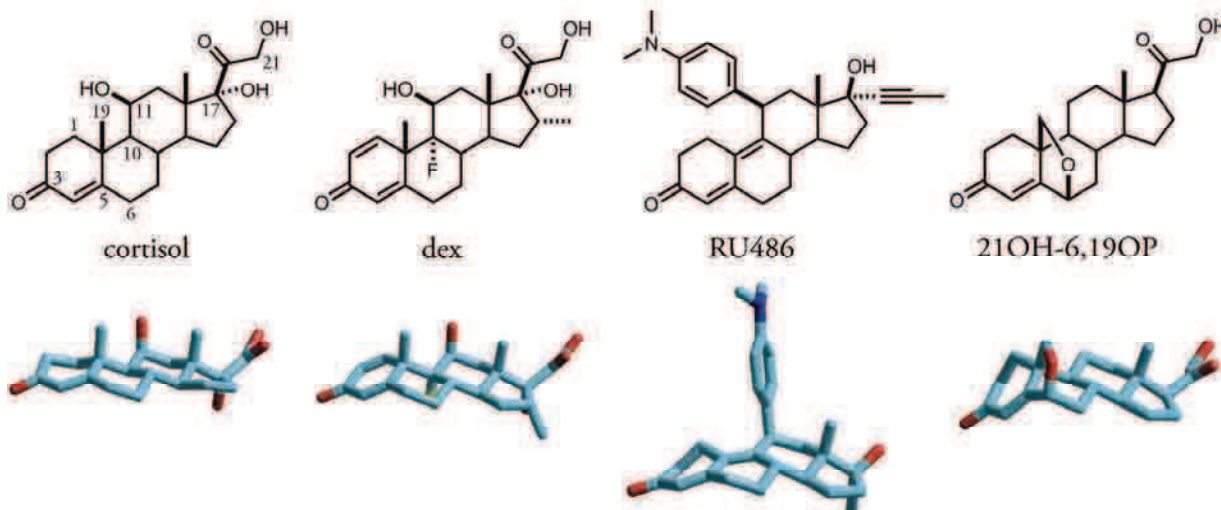
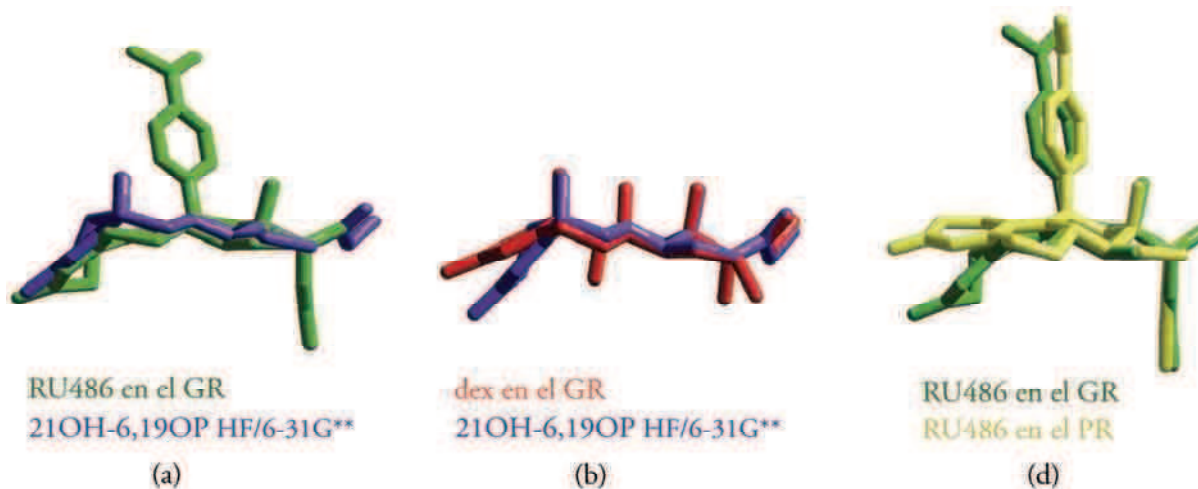


Figura 3.14 Geometrías optimizadas HF/6-31G\*\* de cortisol, dex, RU486 y 21OH-6,19OP



Ángulo de torsión C1-C10-C5-C6 (°):

|                        |       |
|------------------------|-------|
| RU486 en el GR LBD     | 160.5 |
| 21OH-6,19OP HF/6-31G** | 159.1 |
| dex en el GR           | 174.8 |
| RU486 en el PR LBD     | 177.1 |

Figura 3.15 a) Superposición de la estructura de 21OH-6,19OP optimizada HF/6-31G\*\* (violeta) con la estructura de RU486 en el GR LBD (verde). b) Superposición de la estructura de 21OH-6,19OP optimizada HF/6-31G\*\* (violeta) con la estructura de dex en el GR LBD (rojo). c) Ángulo de torsión C1-C10-C5-C6 para cada una de las estructuras que se indican. d) Superposición de la estructura de RU486 en el GR LBD (verde) con su estructura en el PR LBD (amarillo). RU486 en el GR LBD obtenida de pdb:1nhz, dex en el GR LBD obtenida de pdb:1m2z y RU486 en el PR LBD obtenida de pdb:2w8y.

Esto puede observarse en el hecho de que mientras que en el GR LBD RU486 adquiere una conformación torsionada, en el PR LBD la conformación es globalmente plana (Fig. 3.15d). Por lo tanto, la alta flexibilidad del esqueleto esteroideal estaría vinculada con la capacidad de RU486 de unirse a más de un receptor de esteroides (SR). En contraste, 21OH-6,19OP es una molécula con una conformación de menor flexibilidad, lo cual reduce la capacidad de adaptación a distintos. Debido a la presencia del puente 6,19 epóxido, 21OH-6,19OP no puede adoptar una conformación plana como la de RU486 en el PR sino que adopta una conformación torsionada como la observada para RU486 en el GR. Esto podría explicar, al menos en parte, la especificidad de acción por el GR de 21OH-6,19OP.

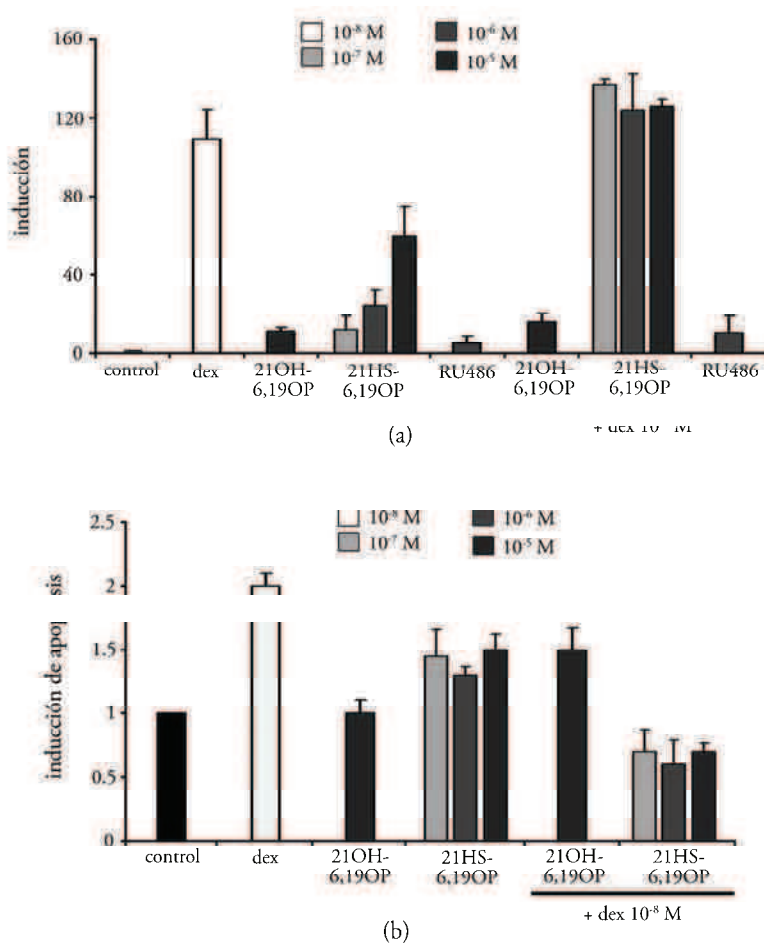
La determinación inicial del efecto de 21OH-6,19OP como hormona esteroideal reveló que si bien posee la capacidad de desplazar la [<sup>3</sup>H]corticosterona unida al GR de extractos de timo de rata, es incapaz de desplazar a [<sup>3</sup>H]aldosterona del MR de células de riñón o a [<sup>3</sup>H]progesterona del PR de células de útero [14]. Cuando fue evaluada *in vivo* la capacidad de producir un aumento de la cantidad de glucógeno depositado en hígados de rata, lo cual ocurre con los agonistas del GR, se encontró que este análogo rígido *per se* no posee efecto alguno [14]. El efecto antiglucocorticoide se evidenció al estudiar la actividad de la enzima tirosina aminotransferasa (TAT) en hepatocitos de rata, dado que con 21OH-6,19OP *per se* no se observó inducción de la expresión de TAT, pero cuando fue administrado junto a dex inhibió el 80% de la inducción alcanzada [14]. Del mismo modo, en células Cos-1 cotransfectadas con el gen reportero MMTV-LUC y con el vector que expresa el hGR, 21OH-6,19OP se comportó como un antiglucocorticoide puro, es decir inhibiendo a dexametasona, pero sin actividad *per se*. En cambio, utilizando las mismas células y el mismo gen reportero, pero expresando el hPRA, se observó que 21OH-6,19OP no posee actividad ni como progestágeno ni como antiprogestágeno. La actividad antagonista pura de 21OH-6,19OP fue también determinada evaluando el efecto apoptótico en timocitos de ratón [19].

Dadas sus propiedades antiglucocorticoides selectivas, 21OH-6,19OP también fue utilizado por el grupo de Funder para estudiar el mecanismo del antagonismo cortisol/progesterona en la regulación de la actividad de la 15-hidroxiprostaglandina dehidrogenasa [63] y recientemente por el grupo de Lubo para investigar el efecto del PR y del GR en la contracción de arterias uterinas [64].

Resumiendo, en los ensayos realizados con anterioridad a esta tesis 21OH-6,19OP se comportó como un antiglucocorticoide puro y específico.

### 21-hemisuccinato-6,19-epoxiprogesteroa (21HS-6,19OP)

21HS-6,19OP es el 21-hemisuccinato derivado de 21OH-6,19OP. Este compuesto fue diseñado con el fin de aumentar la solubilidad del precursor, de manera de conseguir un nuevo análogo con mejor biodisponibilidad para ensayos *in vivo*. Sin embargo, cuando este nuevo análogo rígido fue probado en el ensayo de inducción del gen reportero MMTV-LUC en células Cos-1 se observó, sorprendentemente, que poseía actividad agonista. Al igual que para 21OH-6,19OP, también se evaluó el efecto apoptótico en timocitos de ratón, encontrándose que la actividad de 21HS-6,19OP depende de la presencia o no de dex en el medio. Al administrarse solo, actúa como un glucocorticoide moderado, sin embargo cuando se administra junto con dex se comporta como un antiglucocorticoide muy potente. Por último, en el ensayo de inducción de MMTV-LUC en células Cos-1 expresando el hPRA se observó que 21HS-6,19OP no posee efecto alguno, lo cual indica que este derivado retiene la especificidad por el GR característica de 21OH-6,19OP.



**Figura 3.16** Antecedentes de actividad glucocorticoide de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP. a) Inducción de MMTV-LUC en células Cos-1. b) Apoptosis de timocitos

La Fig. 3.16 muestra los resultados obtenidos para ambos análogos rígidos en los ensayos de inducción del gen reportero MMTV-LUC y apoptosis de timocitos, los cuales serán discutidos conjuntamente a los obtenidos en esta tesis.

### 3.5 Actividad glucocorticoide de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP

En base a los resultados de actividad previos (Fig. 3.16), durante este trabajo de tesis se realizaron diferentes ensayos biológicos en busca de evaluar los efectos glucocorticoides de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP con mayor profundidad. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el grupo de la Dra. Adalí Pecci y llevados a cabo en su laboratorio.

Los fibroblastos de ratón L929 constituyen un buen modelo en el cual los glucocorticoides, de manera opuesta a los timocitos, poseen un efecto protector de la muerte celular programada. Por lo tanto, esta línea celular fue elegida para investigar la acción apoptótica de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP y comparar los resultados con los obtenidos anteriormente en timocitos. Antes de llevar a cabo este ensayo, se determinó la actividad de estos análogos rígidos sobre la inducción del gen reportero MMTV-LUC con el fin de evaluar si se comportan de la misma forma en las células L929 que en las células Cos-1. Además, utilizando las células BHK de riñón de hámster, las cuales poseen una alta eficiencia de transfección, se investigó el efecto de la sobreexpresión del coactivador TIF2 sobre la inducción del MMTV-LUC. Por otra parte, se desarrollaron distintas estrategias con el fin de determinar la capacidad de estos análogos rígidos de inhibir la acción de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y AP-1. Para ello se utilizaron distintas líneas celulares (L929, Cos-1, HeLa y BHK), consiguiendo solamente resultados satisfactorios en el caso de las células BHK. Finalmente, se determinó la actividad apoptótica de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP en las células L929 evaluando su efecto protector contra la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ .

En adelante, la expresión actividad glucocorticoide hace referencia a la actividad de un compuesto actuando *per se*, como único ligando del GR; en cambio, por actividad antiglucocorticoide se entiende la capacidad de bloquear la acción de dex, un agonista del GR. En todos los ensayos RU486 fue utilizado como control de actividad antiglucocorticoide.

### Inducción de MMTV-LUC en células L929

El modo de acción del GR es entendido con cierto detalle solamente para determinados promotores, como el del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) o el de tirosina aminotransferasa (TAT) [32]. El promotor MMTV presenta 5 sitios GRE y es frecuentemente utilizado para medir la actividad de transactivación del modelo disociado. Dado que el mecanismo molecular por el cual ocurre la transcripción está mayormente bien establecido, resulta una herramienta útil para investigar las bases moleculares de acción de los glucocorticoides.

Las células L929, las cuales expresan GR endógeno, fueron transfectadas con el gen reportero MMTV-LUC, y tratadas con 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP, en ausencia o presencia de dex. (Fig 3.17). Al igual que en las células Cos-1, 21OH-6,19OP se comporta como un antiglucocorticoide puro, inhibiendo a  $10^{-5}$  M la acción de dexametasona  $10^{-6}$  M. También al igual que en Cos-1, 21HS-6,19OP posee actividad glucocorticoide sin efectos como antiglucocorticoide. Estos resultados demuestran entonces que ambos análogos rígidos tienen la capacidad de unirse al GR endógeno de ratón, resultando complejos GR-ligando con una actividad similar a la observada en el caso del GR humano en células Cos-1. La actividad antiglucocorticoide de RU486 en las células L929 también es similar a la observada en las células Cos-1.

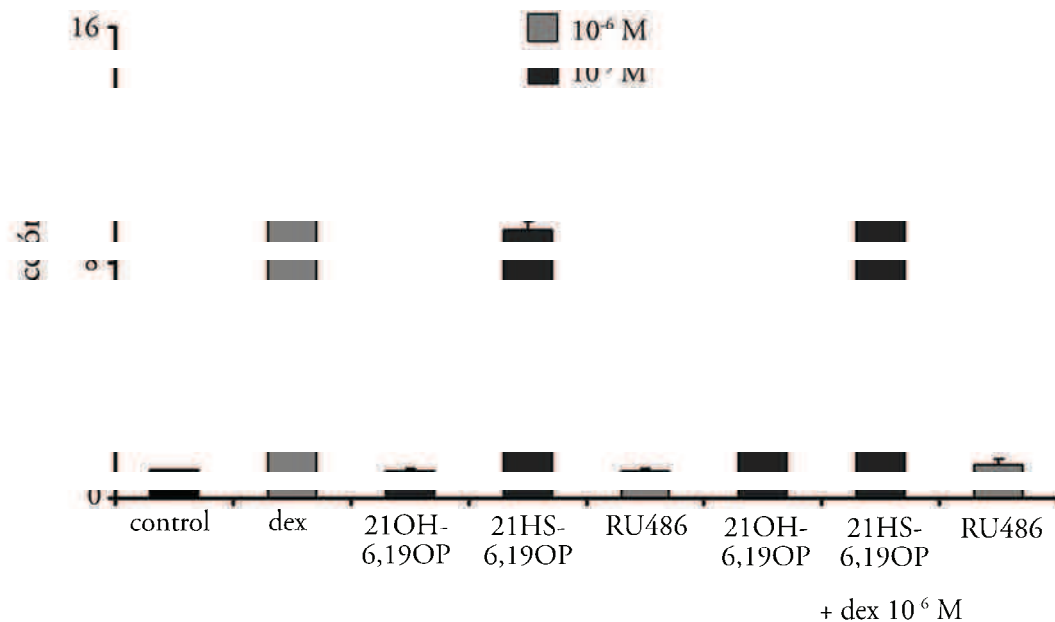


Figura 3.17 Inducción de MMTV-LUC en células L929



### Inducción de MMTV-LUC en células BHK con agregado de coactivador TIF2

Como se mencionó anteriormente, el término coactivador designa a una serie de proteínas que aumentan la actividad transcripcional de los NRs. Para los glucocorticoides son especialmente importantes los coactivadores de la familia p160, ya que estas proteínas interaccionan directamente con el GR LBD. Esta familia contiene tres miembros, SRC-1, TIF2 (o GRIP1) y p/CIP, los cuales poseen actividad acetiltransferasa de histonas, que remodelan la cromatina induciendo la transcripción. En estudios de sobreexpresión el efecto de las proteínas p160 varía desde un incremento de la transcripción hasta la inactividad, dependiendo de la concentración relativa del GR, de p160, del tipo celular y del promotor estudiado [54]. En ciertas condiciones, incluso se ha observado que en presencia de altas concentraciones de TIF2, algunos ligandos antagonistas adquieren la capacidad de inducir genes reporteros controlados por sitios GRE. Por lo tanto, el propósito de este ensayo fue evaluar cómo la presencia del coactivador TIF2 modifica la capacidad de los distintos ligandos estudiados de inducir el gen reportero MMTV-LUC. Para ello, se cotransfectaron células BHK con los plásmidos correspondientes para la expresión de MMTV-LUC y de TIF2, y se trataron con los distintos ligandos. Los resultados (Fig. 3.18) muestran que la presencia de TIF2 incrementa el nivel de inducción de dex y de 21HS-6,19OP, pero no afecta a la falta de actividad de 21OH-6,19OP y RU486.

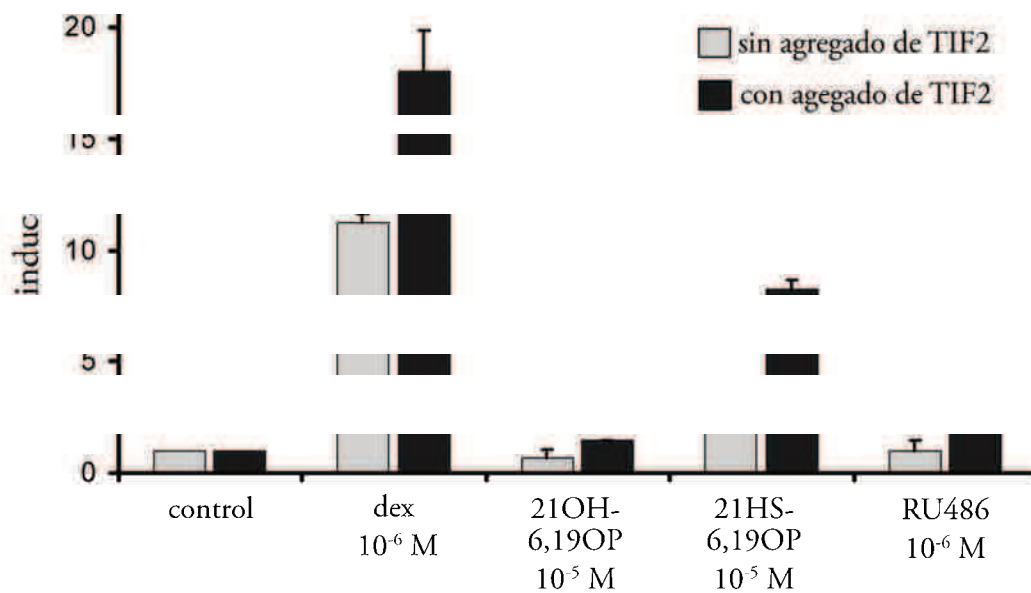


Figura 3.18 Inducción MMTV-LUC en células BHK con agregado de TIF

## Inhibición de la actividad de NFκB en células BHK

NFκB es un factor de transcripción presente en la mayoría de las células animales, involucrado en diversas respuestas inflamatorias e inducido por diversos estímulos como el estrés, citoquinas, radicales libres, antígenos, entre otros. Estructuralmente, NFκB es un heterodímero generalmente formado por la subunidad p65 (o RelA) y otra subunidad menor, p50 o p52 [65] [66]. Como vimos anteriormente, muchos de los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides están dados por la capacidad del GR de inhibir la actividad de NFκB (transrepresión del modelo disociado).

El mecanismo por el cual ocurre la represión de NFκB es múltiple, y aún no se conoce completamente. En la mayoría de los casos estudiados, se observa que la represión entre GR y NFκB es mutua y que ocurre sin modificación de la unión al DNA del factor inhibido. Además, ensayos de coimmunoprecipitación muestran que existe interacción física directa entre NFκB y GR, con el GR DBD formando parte de la interfase de interacción [66]. Según los estudios realizados con el GR<sup>dim</sup>, la capacidad del receptor de homodimerizar no resulta necesaria para la inhibición de NFκB, lo cual indica que en esta interacción el GR actúa como monómero [56]. Por otra parte, se ha determinado que el GR puede inhibir indirectamente la actividad de NFκB, induciendo la síntesis de su inhibidor IκBα [32] [34].

Para determinar la actividad sobre NFκB, se utilizó el gen reportero κB-LUC, el cual expresa la enzima luciferasa bajo el control de elementos κB del promotor HIV. En primer lugar, se intentó determinar la actividad inhibitoria de los análogos rígidos transfectando células L929 con el κB-LUC y activando a NFκB mediante la incubación con TNFα, no pudiéndose obtener resultados reproducibles. Se encontraron similares inconvenientes cuando se utilizó el mismo método en las células humanas HeLa.

Tampoco se pudo determinar la actividad de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP en células Cos-1, en este caso induciendo la expresión del gen reportero mediante la sobreexpresión de la subunidad p65. Finalmente, utilizando este método de activación pero en las células BHK, que poseen una alta eficiencia de transfección y expresan el GR de forma endógena, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Fig. 3.19.

Estableciendo la actividad de las células control (células no tratadas) como el 100%, puede observarse que la presencia de dex disminuye la actividad de p65 a la mitad. De igual manera, ambos análogos rígidos se comportan como agonistas del GR inhibiendo la acción de p65. 21OH-6,19OP resultó menos activo que dex, inhibiendo un 25% la acción de p65, mientras que 21HS-6,19OP mostró una actividad similar. En las condiciones utilizadas, RU486 también se

comportó como un agonista, inhibiendo fuertemente la acción de p65. Por otra parte, ninguno de los compuestos bloqueó la acción de dex.

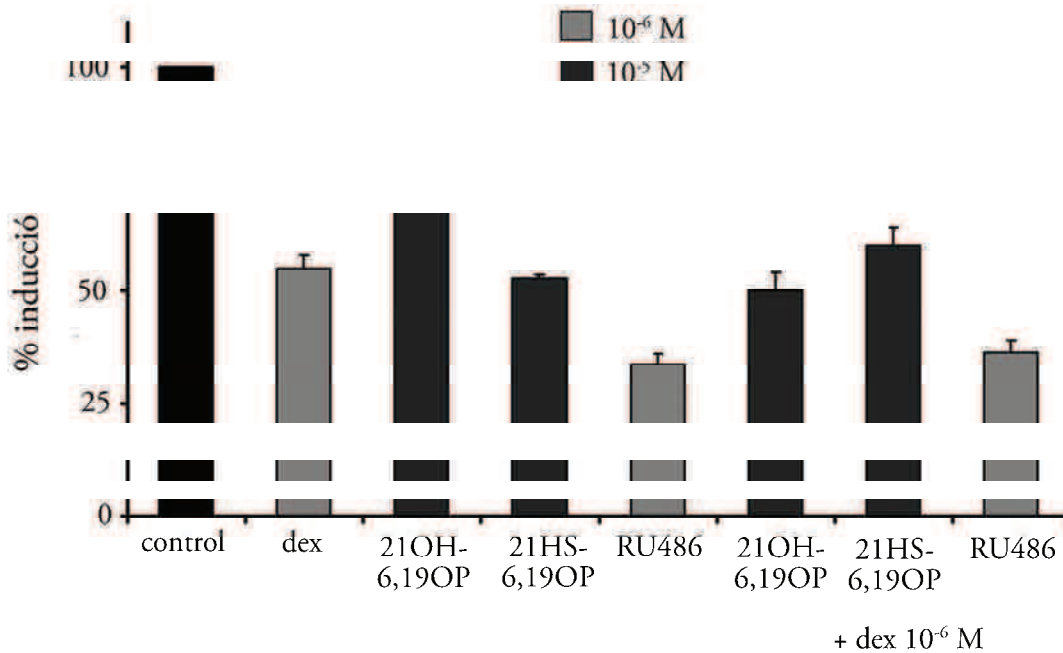


Figura 3.19 Inhibición de  $\kappa$ B-LUC en células BHK

### Protección contra la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ en células L929

TNF- $\alpha$  es una citoquina que induce la muerte celular de las células L929 vía necrosis y apoptosis [67]. El papel protector de los glucocorticoides contra la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$  fue descubierto hace más de 15 años [68], y puede ser utilizado como modelo para estudiar la capacidad antiapoptótica de diferentes ligandos del GR. Si bien el mecanismo de acción de este efecto protector de los glucocorticoides fue estudiado [68] [69], la información obtenida no resulta concluyente. De acuerdo a Mendoza-Milla y colaboradores, la activación de NF $\kappa$ B es requerida para que el complejo GR-dex ejerza su acción antiapoptótica [69]. Sin embargo, también ha sido demostrado que la inhibición de la actividad de NF $\kappa$ B no resulta necesaria para dicha acción [70], indicando que el efecto protector de los glucocorticoides en células L929 involucra un mecanismo de acción más complejo que el clásico modo de transrepresión del modelo disociado. Cuáles son los genes involucrados, y cómo son estos regulados por el GR y el NF $\kappa$ B, son aspectos de esta respuesta protectora de los glucocorticoides que permanecen aún desconocidos.

Estableciendo la supervivencia de las células no tratadas (control) como el 100%, puede observarse que el tratamiento con 2ng/mL de TNF $\alpha$  reduce la supervivencia al 53% (Fig. 3.20). Dex revierte la muerte celular inducida por TNF $\alpha$ , obteniéndose una supervivencia del 88%. Cuando 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP son testeados en este ensayo se observa que ambos revierten la acción de TNF $\alpha$ , aunque en menor medida que dex, con valores de supervivencia de 73% y 83%, respectivamente. Al administrar los análogos rígidos junto a dex, no se observa bloqueo del efecto, con valores de 94% para 21OH-6,19OP y de 90% para 21HS-6,19OP. Resumiendo, en este ensayo ambos análogos rígidos se comportan como glucocorticoides agonistas, sin efecto antiglucocorticoide.

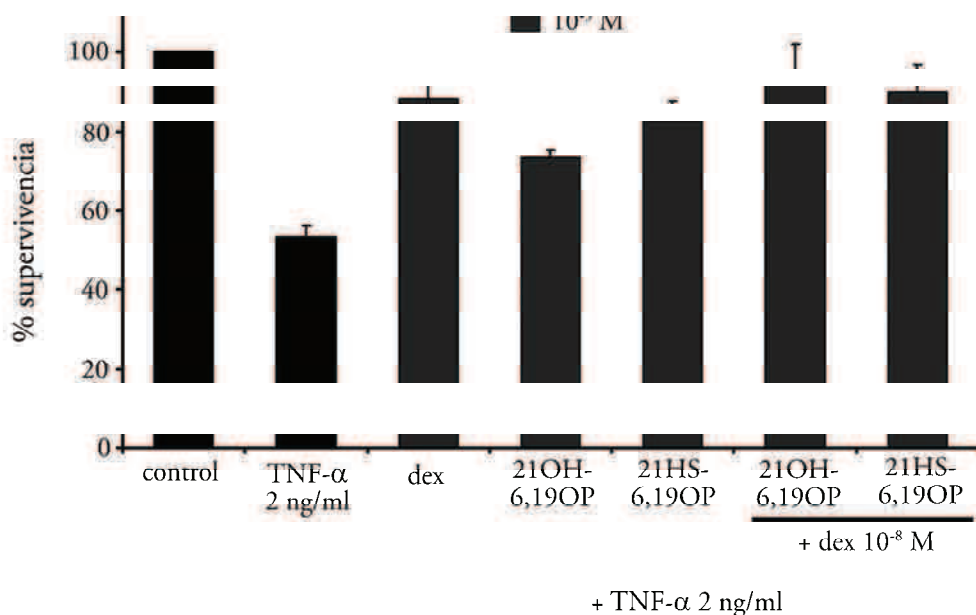


Figura 3.20 Apoptosis de células L929

### 3.6 Discusión

Un punto a considerar previamente al análisis de los resultados obtenidos, es la estabilidad del grupo hemisuccinato de 21HS-6,19OP en el medio biológico. Dos clases de evidencias apoyan el hecho de que 21HS-6,19OP no se degrada en las condiciones utilizadas en los ensayos realizados. Teniendo en cuenta que la hidrólisis de la unión éster conduce a una molécula de 21OH-6,19OP, los resultados significativamente diferentes de los ensayos de inducción del

MMTV-LUC demuestran que 21HS-6,19OP se mantiene estable. Así, si la hidrólisis de la unión éster fuese muy rápida, no podrían explicarse los efectos agonistas de 21HS-6,19OP. Por otro lado, otros derivados ésteres obtenidos en nuestro grupo de investigación (21-acetato, 21-propionato, 21-oleato, etc) fueron inactivos en el ensayo de apoptosis de timocitos, lo cual apoya el hecho de que la actividad antagonista de 21HS-6,19OP no se debe a la degradación a 21OH-6,19OP. Además, 21HS-6,19OP mostró ser estable cuando fue incubado a  $10^{-3}$  M en medio RPMI 1640 (vida media de 72 h).

Las tablas 4.1 y 4.2 reúnen los antecedentes previos y los resultados aquí obtenidos de la actividad biológica de los análogos rígidos estudiados. A partir de estos resultados se obtienen dos clases distintas de información según el tipo de ensayos involucrados. Una clase proviene de los ensayos para determinar como estos esteroides regulan la actividad de un determinado gen reportero, MMTV-LUC o  $\kappa$ B-LUC (Tabla 4.1). Si bien este tipo de ensayos no poseen relevancia fisiológica, ya que miden la expresión de un único gen plasmídico no integrado al genoma de la célula, resultan verdaderamente útiles para investigar las bases moleculares de acción de los distintos complejos GR-ligando.

|                    | Inducción MMTV-LUC         |                 |              |                 |              |              | Inhibición $\kappa$ B-LUC |  |
|--------------------|----------------------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|---------------------------|--|
|                    | células Cos-1 <sup>a</sup> |                 | células L929 |                 | células BHK  |              | células BHK               |  |
|                    | <i>gluco</i>               | <i>antigluc</i> | <i>gluco</i> | <i>antigluc</i> | <i>gluco</i> | <i>gluco</i> | <i>antigluc</i>           |  |
| <b>dex</b>         | +                          | nc              | +            | nc              | +            | +            | nc                        |  |
| <b>21OH-6,19OP</b> | -                          | +               | -            | +               | -            | +            | -                         |  |
| <b>21HS-6,19OP</b> | +                          | -               | +            | -               | +            | +            | -                         |  |
| <b>RU486</b>       | -                          | +               | -            | +               | -            | +            | -                         |  |

**Tabla 4.1** Resumen de los resultados de ensayos utilizando genes reporteros. nc=no corresponde, nd= no determinado. <sup>a</sup> Ensayo previo

En cambio, en los ensayos de apoptosis (Tabla 4.2), se mide una respuesta celular integrada, que depende del cambio de expresión de diversos genes, y es en este sentido, que estos ensayos representan un modelo más cercano al fisiológico para estudiar el efecto de los glucocorticoides.

|                    | Apoptosis              |                 |              |                 |
|--------------------|------------------------|-----------------|--------------|-----------------|
|                    | timocitos <sup>a</sup> |                 | células L929 |                 |
|                    | <i>gluco</i>           | <i>antigluc</i> | <i>gluco</i> | <i>antigluc</i> |
| <b>dex</b>         | +                      | nc              | +            | nc              |
| <b>21OH-6,19OP</b> | -                      | +               | +            | -               |
| <b>21HS-6,19OP</b> | +                      | ++              | +            | -               |
| <b>RU486</b>       | -                      | +               | nd           | nd              |

**Tabla 4.2** Resumen de los resultados de apoptosis.  
nc=no corresponde. <sup>a</sup> Ensayo previo

### *Inducción de MMTV-LUC e inhibición de NFκB*

Todos los ensayos de inducción del MMTV-LUC muestran con claridad que la introducción de un grupo hemisuccinato en la posición 21 del antagonista 21OH-6,19OP produce un nuevo análogo rígido con actividad agonista. Este resultado es sumamente importante, ya que muestra que la simple adición de un grupo lateral voluminoso a un glucocorticoide produce un cambio de antagonismo a agonismo sobre el GR. Evidentemente, este grupo hemisuccinato debe estar involucrado en la interacción proteína-ligando, estabilizando el complejo GR-21HS-6,19OP en una conformación adecuada para inducir la transcripción. Esto implica que la unión de 21HS-6,19OP al receptor produce un complejo capaz de llevar a cabo todos los eventos necesarios para la transcripción de un gen regulado por sitios GRE, entre los que se incluyen, como veremos más detalladamente en el próximo capítulo, la translocación, homodimerización, unión al DNA y reclutamiento de coactivadores. En el caso de 21OH-6,19OP, el complejo que forma con el GR debe fallar necesariamente en alguno, o más de uno, de estos eventos. Claramente, la presencia del grupo hemisuccinato en el GR LBD revierte esta incapacidad.

La potencia transcripcional de un dado ligando no depende solamente de su afinidad por el GR, también su concentración, la del GR, cofactores y DNA son factores que intervienen en la respuesta medida. Debido a la alta afinidad de dex por el GR, el estado de saturación, es decir la concentración a la cual mayores dosis no elevan el nivel de inducción, se alcanza a concentraciones del orden de  $10^{-8}$  M. En ambos tipos celulares, la inducción del MMTV-LUC alcanzada con 21HS-6,19OP  $10^{-5}$  M es alrededor de la mitad de la inducción alcanzada por concentraciones saturantes de dex. Esta menor potencia transcripcional puede ser entendida

considerando una baja afinidad de 21HS-6,19OP por el GR o una alterada afinidad del complejo GR-21HS-6,19OP por los cofactores, o por una combinación de ambos fenómenos. No se poseen datos sobre la afinidad de este análogo rígido por el receptor, con lo cual no resulta posible determinar inequívocamente las causas de su menor potencia transcripcional. Sin embargo, el hecho que en el ensayo de apoptosis de timocitos 21HS-6,19OP posea fuertes efectos antagonistas aún a bajas dosis podría estar indicando que este compuesto posee alta afinidad por el GR, de manera que su menor potencia transcripcional respecto a dex podría estar en parte asociada a la menor capacidad del complejo GR-21HS-6,19OP de unir coactivadores (o a la mayor capacidad de unir corepresores) que el complejo GR-dex.

El ensayo de inducción de MMTV-LUC con el agregado de TIF2 fue realizado con el objetivo de evaluar el efecto de este coactivador sobre la actividad *per se* de los distintos ligandos. Para los ligandos agonistas de este ensayo, dex y 21HS-6,19OP, se encontró, como se esperaba, que la actividad transcripcional aumenta en presencia de TIF2. En el caso de los ligandos antagonistas, 21OH-6,19OP y RU486, se observó que el agregado de TIF2 no produce efecto alguno en la actividad. Dado que TIF2 interacciona directamente con el dominio de unión al ligando (LBD) del GR, y que al trabajar a altas concentraciones de coactivador se estaría favoreciendo esta interacción, estos resultados sugieren que, o bien 21OH-6,19OP y RU486 no producen complejos con el GR capaces de interactuar con TIF2, o bien alguna otra etapa previa del mecanismo que lleva a la transcripción del MMTV-LUC resulta inhibido para estos ligandos.

Como hemos visto anteriormente, otro de los ensayos comúnmente usados para caracterizar la actividad de un glucocorticoide es el de inhibición de NFκB. En células BHK se observó que ambos análogos rígidos inhiben la actividad de NFκB. Si bien existen varios mecanismos por los cuales el GR puede reprimir a este factor de transcripción, en este caso, al sobreexpresarse la subunidad p65, se está determinando principalmente la capacidad de los distintos complejos del GR de interactuar físicamente con el NFκB. En esta interacción, el GR participaría como monómero, por lo tanto, el hecho de que 21OH-6,19OP se comporte como un agonista indica que el complejo GR-21OH-6,19OP posee la capacidad de actuar como monómero. Si adoptásemos el modelo disociado podríamos decir que 21OH-6,19OP es un glucocorticoide disociado, ya que es un antagonista de la transactivación y un agonista de la transrepresión. Sin embargo, dado el otro significado que atribuye este modelo a este término, es preferible decir que 21OH-6,19OP es un glucocorticoide que, si bien no puede inducir la

transcripción de genes manejados por sitios GRE, puede actuar como monómero reprimiendo a NFκB.

21HS-6,19OP también posee la capacidad de inhibir la acción de NFκB, resultado consistente con su actividad agonista en la inducción del MMTV-LUC. El complejo GR-21HS-6,19OP se comporta, al menos en parte, de forma similar al complejo GR-dex. En cuanto a RU486, se han informado distintos resultados respecto a su capacidad de inhibir a NFκB. Por un lado, en células Cos-1 sobreexpresando la subunidad p65 y el hGR, se observó que RU486  $10^{-6}$  M efectivamente inhibe la acción de NFκB [71]. Un resultado similar se obtuvo en células HeLa, utilizando un ensayo de doble híbrido y sobreexpresando p65 [72]. En cambio, también en HeLa pero induciendo la acción de NFκB con TNFα, RU486 se comporta como un antagonista, no afectando su acción [73]. Estos resultados en conjunto indican que la actividad inhibitoria de RU486 sobre NFκB depende del método empleado para medirla. Dado que en nuestro ensayo se ha sobreexpresado p65, la actividad agonista de RU486 observada resulta consistente con los resultados anteriores.

#### *Apoptosis de timocitos y de células L929*

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad apoptótica de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP demuestran claramente que estos ligandos son moduladores selectivos del GR (SGRMs), ya que la actividad depende del tipo celular. 21OH-6,19OP se comporta como un agonista en los fibroblastos L929 (Fig. 4.7) y como antagonista en timocitos (Fig. 4.3b). 21HS-6,19OP posee también actividad agonista en las L929 (Fig. 4.7), pero en los timocitos la actividad depende de la presencia de dex (Fig. 4.3b). Cuando en el medio sólo hay 21HS-6,19OP, este compuesto se comporta como un agonista débil, pero en presencia de dex se observa una fuerte actividad antagonista.

Como fue señalado anteriormente, el mecanismo molecular por el cual el GR interviene en el proceso antiapoptótico en las células L929 no está bien establecido. Si bien la activación de NFκB resulta necesaria, no es la represión por el GR lo que produce la respuesta antiapoptótica de los glucocorticoides. El hecho de que 21OH-6,19OP se comporte como un agonista, podría estar indicando que en este mecanismo el GR actúa como monómero, interaccionando con NFκB y regulando la expresión de genes claves en la respuesta de protección contra la muerte celular.



En cambio, los efectos proapoptóticos de los glucocorticoides en timocitos son mucho mejor comprendidos. Los glucocorticoides inducen la muerte celular de los timocitos principalmente modulando la expresión de algunos miembros de la familia de proteínas Bcl-2 [74] [75]. El modelo actualmente aceptado establece que la acción proapoptótica de los glucocorticoides requiere la presencia de un GR funcional, particularmente de su función de activación de genes [76]. Así, en timocitos que expresan únicamente el GR<sup>dim</sup>, los glucocorticoides pierden el efecto proapoptótico [56]. Por lo tanto, el antagonismo de 21OH-6,19OP en este ensayo es consistente con los resultados de inducción de MMTV-LUC, ya que en ambos este análogo rígido se comporta como una antiglucocorticoide puro.

La situación de 21HS-6,19OP es más compleja. Actuando *per se*, se comporta como un agonista, resultado también consistente con la actividad agonista en la inducción del MMTV-LUC. Al igual que el complejo GR-dex, GR-21HS-6,19OP posee la capacidad de activar la expresión de genes, lo que resulta en los efectos proapoptóticos observados. Sin embargo, en presencia de dex, en lugar de observarse la sumatoria de efectos agonistas, 21HS-6,19OP funciona como un antagonista, revirtiendo la apoptosis incluso a valores más bajos que el control. Estudios adicionales sobre el mecanismo molecular de acción de dex y 21HS-6,19OP en timocitos resultan necesarios para explicar este particular perfil de actividad. Variaciones en la afinidad de los complejos GR-dex y GR-21HS-6,19OP por cofactores limitantes y específicos de timocitos podrían ayudar a comprender este fenómeno a nivel molecular. Otra posibilidad es que los heterodímeros GR-dex/GR-21HS-6,19OP sea incapaces de activar la transcripción de los genes involucrados en la respuesta apoptótica, de manera que estos agonistas se bloquean mutuamente. Es importante notar que otros efectos no genómicos podrían estar involucrados en el efecto apoptótico global de 21HS-6,19OP.

Finalmente, desde el punto de vista farmacológico, el conjunto de los resultados obtenidos muestra que ambos análogos rígidos poseen potenciales aplicaciones como glucocorticoides. 21OH-6,19OP es un ligando que se comporta de forma similar a RU486 excepto que tiene la ventaja de ser específico del GR. 21HS-6,19OP es un ligando también específico del GR pero que actúa como agonista débil, excepto en el caso de la apoptosis de timocitos en presencia de dex donde se comporta como un antagonista fuerte. Por lo tanto, la adición de 21HS-6,19OP al tratamiento con glucocorticoides agonistas como dex podría resultar en una disminución del efecto inmunosupresor de estas drogas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que *in vivo* el grupo hemicusinato de 21HS-6,19OP podría hidrolizarse obteniéndose 21OH-6,19OP, es decir que debemos considerar a 21HS-6,19OP como un líder para desarrollar un glucocorticoide con un nuevo perfil de actividad pero no como el candidato a droga.

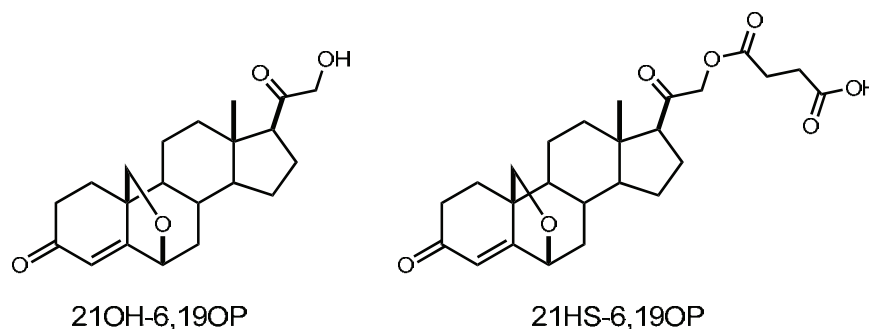
# CAPÍTULO 4

---

## BASES MOLECULARES DE ACCIÓN DE ANÁLOGOS RÍGIDOS DE GLUCOCORTICOIDES



En la última parte de esta tesis se presentan los resultados obtenidos al investigar las bases moleculares de acción de los análogos rígidos 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP (Fig. 4.1), cuya actividad glucocorticoide fue presentada en el capítulo anterior. Fundamentalmente, dado que su mecanismo molecular de acción es conocido con cierto detalle, se intentarán explicar los resultados obtenidos en los ensayos de inducción del gen reportero MMTV-LUC<sup>8</sup> (ensayo que a partir de aquí, para simplificar, se denominará con el término *transactivación* utilizado en el modelo disociado).



**Figura 4.1** Estructura de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP

Antes de exponer los resultados obtenidos se realiza una introducción sobre los aspectos moleculares de la transactivación y la forma en que las regiones fundamentales del dominio de unión al ligando (LBD) del GR intervienen en este mecanismo de acción. Además se discuten distintos modelos sobre la interacción ligando-receptor empleados para comprender las bases moleculares del antagonismo en el GR, y finalmente se describen los aspectos básicos de la técnica computacional empleada en esta investigación (simulación por Dinámica Molecular).

## 4.1 Bases moleculares de acción de los glucocorticoides

### Mecanismo Molecular de la Transactivación

Como se mencionó en el capítulo anterior<sup>9</sup>, se denomina transactivación al mecanismo por el cual genes cuyos promotores poseen sitios GRE son transcritos por el GR. La transactivación es un proceso sumamente complejo en el cual intervienen, además del GR y el ligando, una gran cantidad de proteínas citoplasmáticas y nucleares (chaperonas, inmunofilinas, cofactores, etc), las cuales modulan la acción del receptor interaccionando tanto directa como

<sup>8</sup> Capítulo 3, sección 5

<sup>9</sup> Capítulo 3, sección 3

indirectamente. En su forma más simplificada, la transactivación se puede representar como un mecanismo que involucra las etapas de unión del ligando al receptor, de liberación de las chaperonas (transformación), de translocación al núcleo, de homodimerización GR-GR y unión al DNA y de unión de coactivadores específicos y remodelación de la cromatina, lo cual finalmente conduce al ensamblaje de la maquinaria transcripcional (Fig. 4.2).

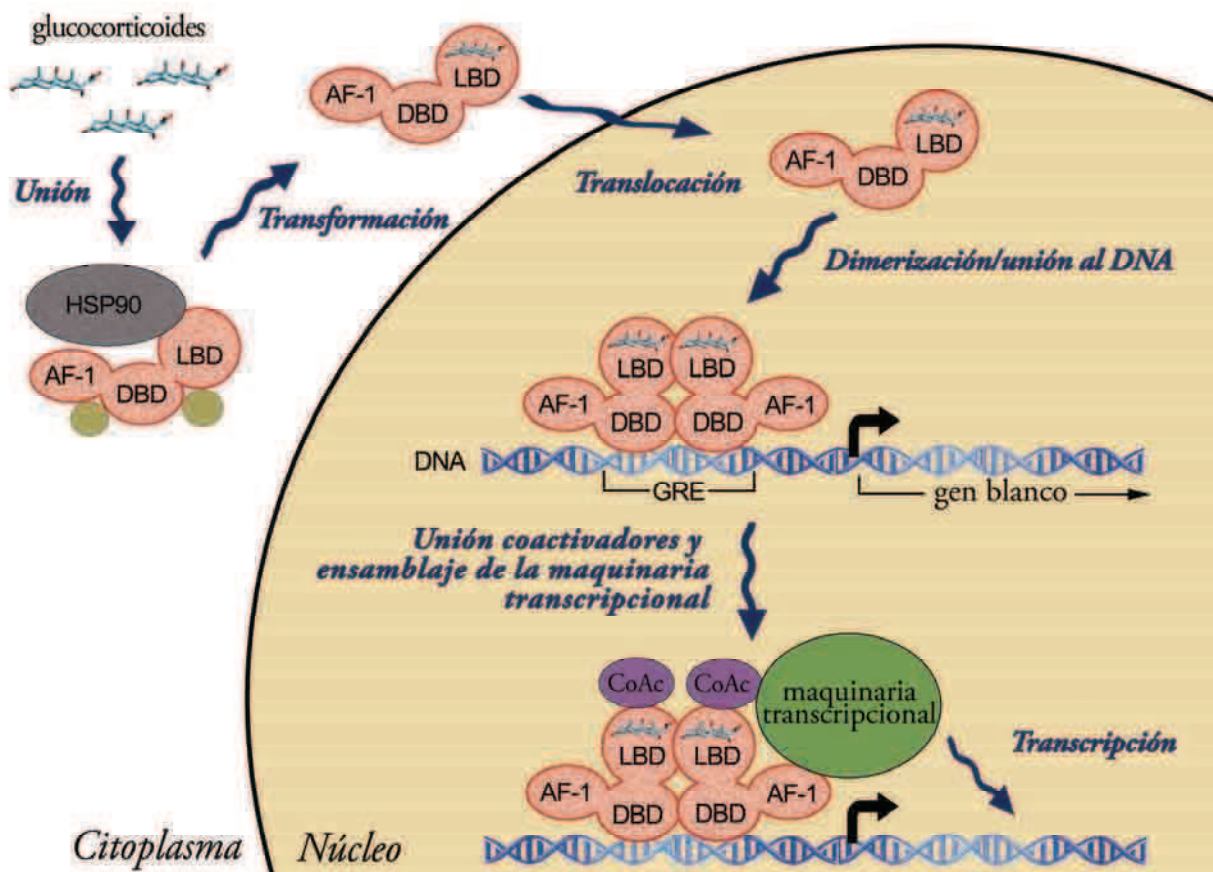


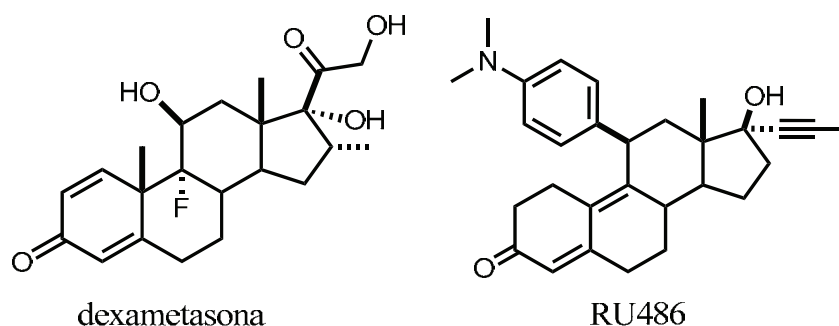
Figura 4.2 Esquema del mecanismo de transactivación del GR. CoAc = coactivadores

Como veremos más adelante, considerar la transactivación de esta manera, es decir como una sucesión de etapas independientes, resulta sumamente útil a la hora de investigar el modo de acción de los antagonistas del receptor, sin embargo, no debe olvidarse que este mecanismo es un proceso continuo y dinámico, estando cada uno de estos eventos estrechamente interconectados y que la respuesta final observada depende del comportamiento global del receptor en cada una de las interacciones con las demás proteínas y el DNA. De todas maneras, en este trabajo, al estar investigándose el modo en que los análogos rígidos modulan la estructura del receptor centraremos especialmente el estudio en las etapas de dimerización y de unión de cofactores, ya

que es bien sabido que en éstas el dominio de unión al ligando (LBD) cumple un rol fundamental.

### Estructura del dominio de unión al ligando del GR

Aunque el GR fue el primer NRs en ser clonado [77], fue el último LBD de un SR al cual se le determinó experimentalmente la estructura tridimensional [78]. A pesar de los reiterados esfuerzos, no se lograba expresar la cantidad y calidad de proteína necesaria para obtener cristales que pudieran ser analizados por difracción de rayos X. En el año 2002, Bledsoe y colaboradores introdujeron la mutación puntual F602S en el GR LBD, expresando una proteína más estable y soluble que pudo ser cristalizada unida a dexametasona (dex) (Fig. 4.3), resolviéndose la estructura a 2,5 Å (pdb:1m2z). El residuo 602 pertenece a la hélice H5 y se ubica en una zona que, aparentemente, no está involucrada en ninguna función fundamental conocida. Estos autores demostraron además que el GR F602S es capaz de unir al antagonista RU486 (Fig. 4.3), y que se comporta similarmente al GR salvaje en los ensayos de transactivación y transrepresión, sugiriendo que esta mutación, en principio, no afecta ninguna propiedad funcional del receptor.



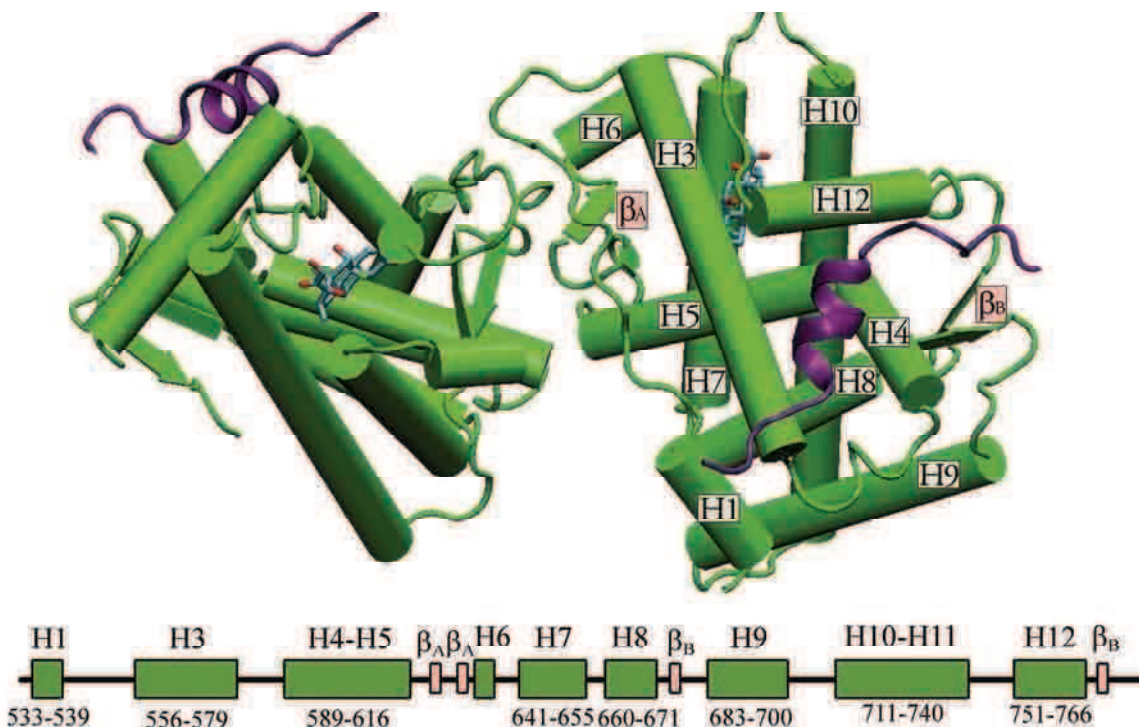
**Figura 4.3** Estructura de dexametasona (dex) y RU486

Posteriormente, en el año 2005, Kauppi y colaboradores obtuvieron dos estructuras más del GR LBD (mutante N517D, F602S y C638D), una con el antagonista RU486 (pdb:1nhz, resolución 2,3 Å) y otra nuevamente con dex (pdb:1p93, resolución 2,7 Å) [62]. Recientemente, el grupo de Bledose ha conseguido cristalizar el GR LBD complejoado con el furoato de fluticazona (pdb:3cld, mutaciones F602Y y C638G, resolución 2,84 Å) [79] y con el compuesto no esteroideal GSK866 (pdb:3e7c, mutaciones F602Y y C638G, resolución 2,15 Å) [80].

También en el año 2008, Suino-Poweel y colaboradores obtuvieron la estructura complejada con el ligando deacilcortivazol (pdb:3bqd, mutación F602S, resolución 2,5 Å) [81].

Al momento de comenzar este trabajo de tesis, únicamente existían las estructuras pdb:1m2z, 1nhz y 1p93. Debido a que la estructura pdb:1m2z es la única en la cual todos los átomos del GR LBD están resueltos, ésta fue la elegida como punto de partida para el estudio por simulación por dinámica molecular. Por lo tanto, salvo que se aclare lo contrario, en lo que sigue nos referiremos a la estructura cristalina pdb:1m2z.

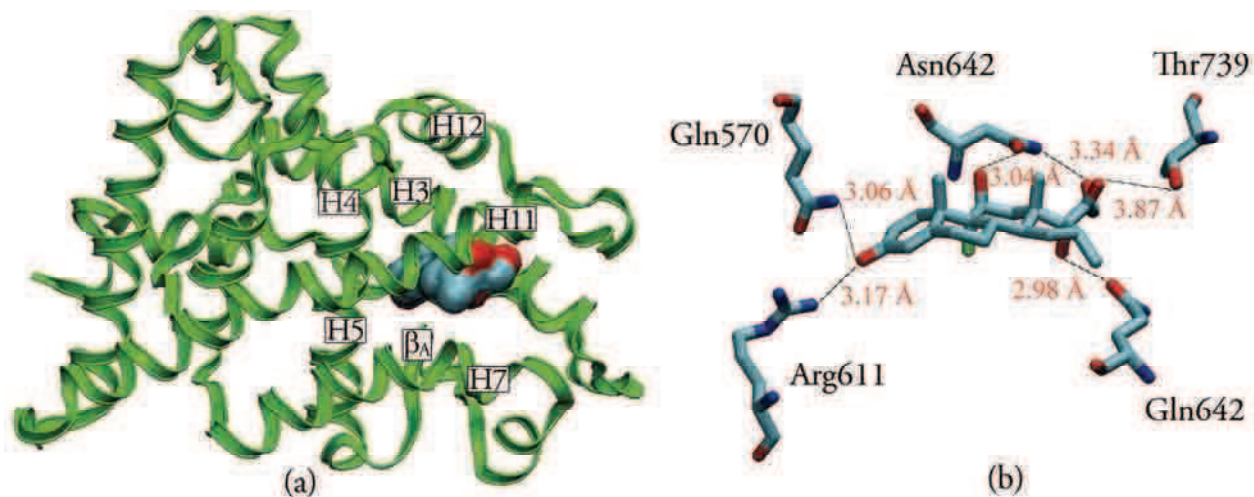
La estructura pdb:1m2z comprende dos moléculas de GR LBD F602S, dos del agonista dexametasona (dex) y dos de un péptido correspondiente al coactivador TIF2 (Fig. 4.4). El GR LBD está constituido por 250 residuos que forman 9  $\alpha$ -hélices y 2 hojas betas plegadas en una estructura globular en la cual se destacan tres regiones fundamentales para la actividad transcripcional del receptor: el bolsillo de unión al ligando (LBP), la zona de unión de coactivadores (AF-2) y la interfase de dimerización (ID).



**Figura 4.4** Estructura cristalina del dímero GR LBD (pdb:1M2Z) (arriba) y esquema de la estructura secundaria del GR LBD (abajo)

*Bolsillo de unión al ligando*

Según la estructura cristalina pdb:1m2z, el LBP es una cavidad interna de 599 Å<sup>3</sup> mayormente hidrofóbica, formada por residuos pertenecientes a las hélices H3, H4-H5, H7, H11, H12 y residuos del loop entre las hélices H11-H12. Hay 15 residuos que interactúan hidrofólicamente con el esqueleto carbonado esteroide y 5 son residuos polares (Asp564, Gln642, Arg611, Thr739 y Gln570) que forman interacciones por puente de hidrógeno con los grupos polares del ligando (Fig. 4.5). La molécula de dex se orienta de manera que el grupo 3-ceto interactúa con Arg611 y Gln570, el 11β-OH con Asp564, el 17α-OH con Gln642, el 21-OH con Asp564 y el 20-ceto con Thr739 [78]. Así, todos los grupos polares de dex (presentes también en el ligando natural cortisol) interactúan mediante puentes de hidrógeno con los residuos polares del LBP.



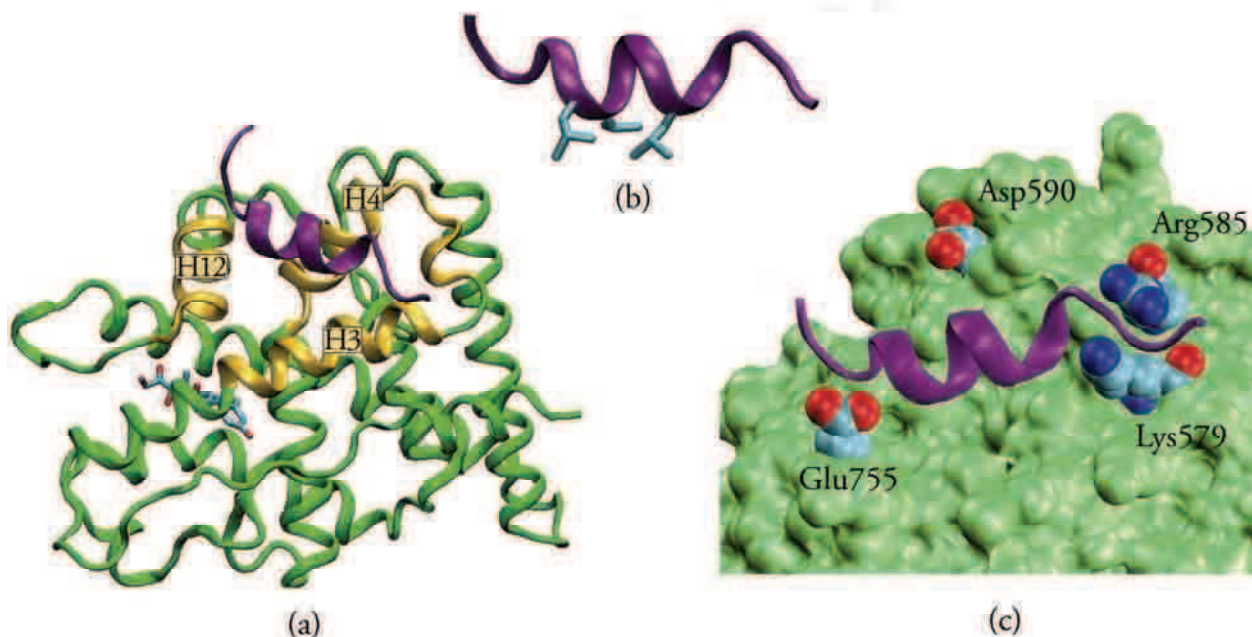
**Figura 4.5** Modo de unión de dex (pdb:1m2z). a) Ubicación de dex en el GR LBD. b) Interacciones por puente de hidrógeno entre dex y los residuos polares del LBP

El LBP no es una cavidad rígida, las cadenas laterales de los residuos que lo forman pueden cambiar la orientación de manera de acomodar grupos voluminosos presentes en el esteroide. Ejemplo de ello son el modo de unión de RU486, del cortivazol, y del furoato de fluticasona [62] [81] [82]. En todos estos casos se observa como la flexibilidad del receptor permite que ingresen grupos laterales voluminosos.



*Región AF-2*

Se denomina región AF-2 al hueco hidrofóbico en la superficie del receptor, formado por las hélices H3, H4 y la hélice C terminal H12 (Fig. 4.6). En presencia de ligandos agonistas, la región AF-2 adopta una conformación capaz de unir coactivadores de la familia p160. Estos coactivadores poseen dos o más motivos LLxxL (L=leucina, x=cualquier aminoácido) en forma de hélice, de manera que las leucinas no polares se orientan hacia un mismo lado e interaccionan con el hueco no polar AF-2.

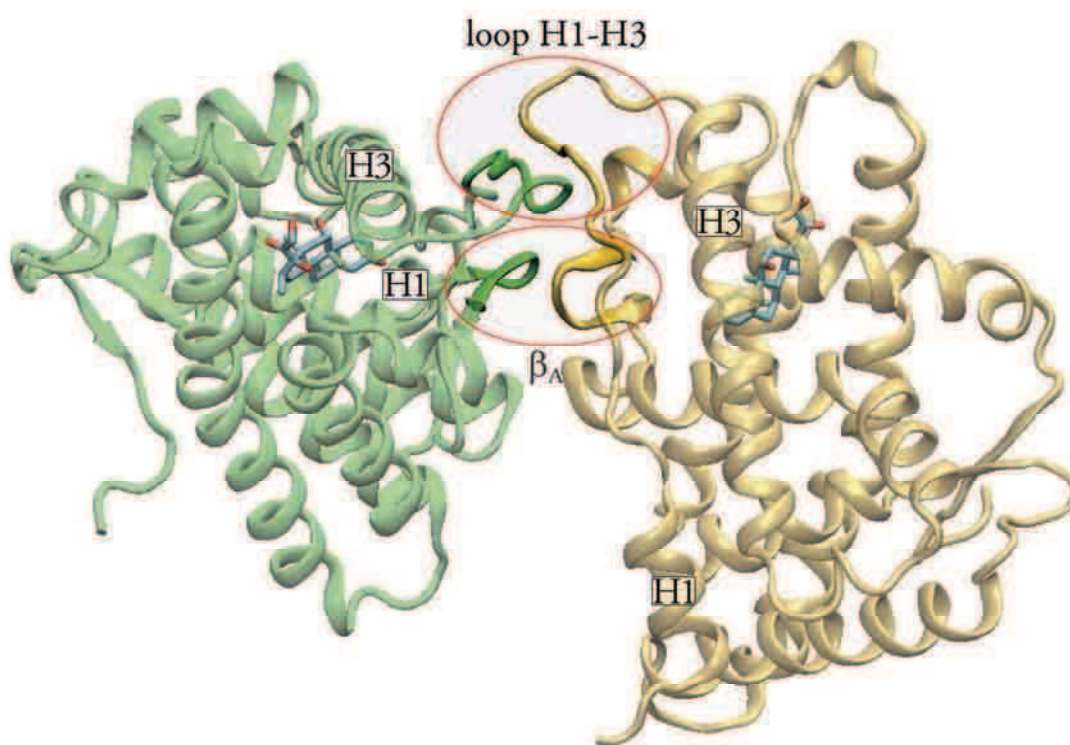


**Figura 4.6** a) Dominio AF-2 (amarillo) e interacción con el péptido correspondiente al coactivador TIF2 (violeta). b) Péptido correspondiente al coactivador TIF2. El motivo LxxLL adquiere forma de hélice con las leucinas orientadas hacia el mismo lado. c) Residuos polares del GR LBD (verde) que interaccionan electrostáticamente con el péptido correspondiente al coactivador TIF2 (violeta). (pdb:1m2z)

Aparte de esta interacción hidrofóbica, existe una interacción electrostática, denominada “charge clamp”, entre las cadenas laterales de los aminoácidos polares (residuos Lys579, Glu755, Arg585 y Asp590) del receptor y el coactivador, interacción que ayuda a mantener estable el contacto coactivador-GR LBD. Como se mencionó anteriormente, la unión de estos coactivadores, como TIF2 o GRIP1, es uno de los eventos claves que llevan al ensamblaje del transcriptosoma y la subsiguiente activación de la transcripción.

*Región de dimerización*

Como se discutirá más adelante, varios aspectos fundamentales sobre la homodimerización del GR permanecen aún desconocidos. En lo que se refiere al contacto proteína-proteína entre monómeros es sabido que, además del dominio de unión al DNA, el LBD participa directamente. De acuerdo con la estructura cristalina del dímero de GR LBD-dex (pdb:1m2z), el contacto entre monómeros ocurre a través de dos regiones distantes de la proteína (Fig. 4.7). Por un lado, dos residuos no polares de un monómero, Pro625 e Ile628, los cuales forman la lámina  $\beta$  ubicada entre las hélices H6 y H7, contactan con los mismos residuos del otro monómero, formando así un núcleo de interacción hidrofóbica. Por otro lado, cuatro residuos polares del loop H1-H3 (residuos 547 a 551) de cada monómero interactúan a través de cuatro puentes de hidrógeno, formando una estructura pseudo anti-lámina  $\beta$  entre monómeros.



**Figura 4.7** Interfase de homodimerización del GR LBD. Residuos de la lámina  $\beta_A$  de cada monómero forman un núcleo de interacción hidrofóbica y residuos del loop H1-H3 de cada monómero interactúan por puente de hidrógeno (pdb:1m2z)

En la otra estructura del complejo GR LBD-dex (pdb:1p93) el receptor aparece como tetramero. En éste hay dos monómeros (A y B) que forman un dímero similar al observado en la estructura cristalina anterior y otros dos monómeros (C y D) que se ubican a cada lado del dímero A-B. Los residuos involucrados en el contacto entre los monómeros A y B son los mismos que participan de la dimerización en pdb:1m2z, indicando que esta interfase de dimerización no sería un artificio de la cristalización. Además, la importancia funcional de este modo de dimerización del GR LBD, el cual difiere respecto del de otros receptores nucleares como ER, RXR o PR, ha sido demostrada por estudios mutacionales [78] [83].

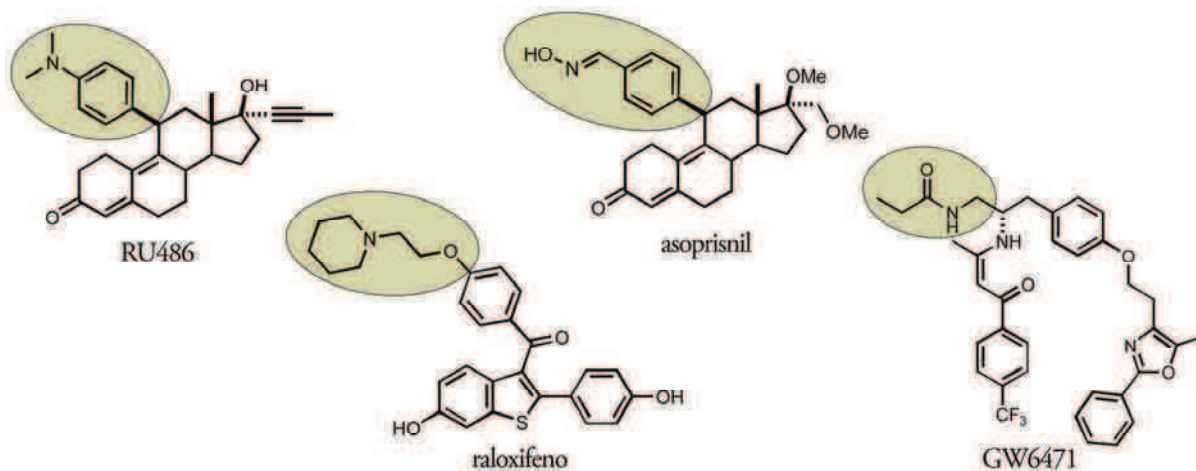
### **Bases moleculares del antagonismo en la transactivación**

Como se señaló anteriormente, un ligando agonista del GR en la transactivación es aquel que se une al receptor, induce la translocación del complejo al núcleo, la homodimerización, la unión a los sitios GRE y la unión de coactivadores a la zona AF-2. En cambio, un ligando antagonista del GR se define como aquel que bloquea la acción de los agonistas. En los NR, y en el GR en particular, los antagonistas actúan por competencia, es decir que se unen al receptor, impidiendo la unión de los agonistas, pero produciendo una estructura del complejo que resulta incapaz de inducir la transcripción génica. Si se consideran las etapas que involucra la transactivación podemos ver que existen varios puntos en los que el mecanismo que lleva a la activación puede ser interrumpido. Por ejemplo, el ligando antagonista puede unirse al receptor, pero no inducir la translocación del complejo, o el complejo puede ser incapaz de homodimerizar, o de unirse al DNA, o de reclutar los coactivadores necesarios.

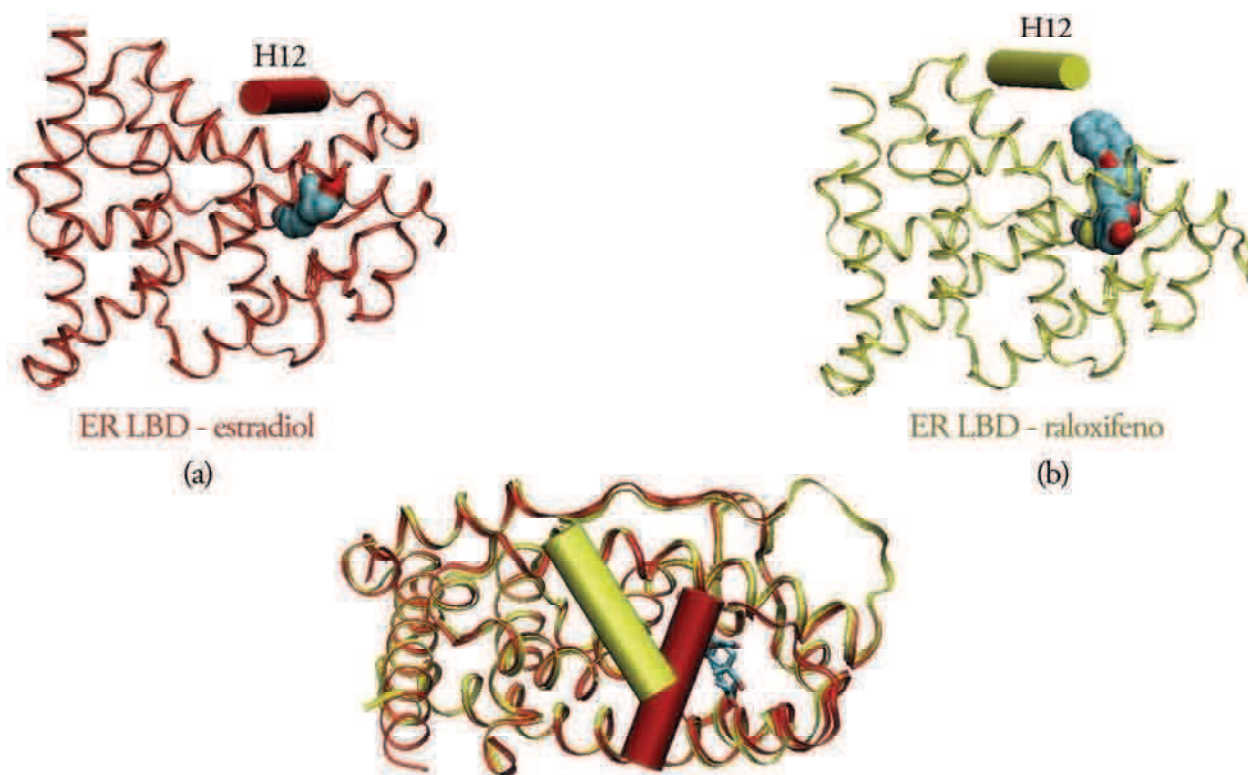
Como vimos anteriormente<sup>10</sup>, el antiglucocorticoide RU486 (Fig. 4.3), y sus derivados, poseen un grupo voluminoso en posición 11 $\beta$ . También muchos otros antagonistas de los NR presentan la característica de poseer un grupo lateral voluminoso, como por ejemplo asoprisnil para el PR $\alpha$  [84], raloxifeno para ER $\alpha$  [85] y GW6471 para el PPAR $\alpha$  [86] (Fig. 4.8).

Varios estudios cristalográficos muestran que cuando estos ligandos se unen al bolsillo de unión de su receptor, el grupo voluminoso no puede ser contenido, sobresaliendo del sitio de unión e interfiriendo con la hélice H12. Debido a esta interacción, la hélice H12 no puede adoptar la posición activa adquirida en el caso de los agonistas, sino que ocupa el espacio en el cual interaccionan los coactivadores de la familia p160, impidiendo así su unión (Fig. 4.9). Dada esta interferencia por impedimento estérico entre átomos del receptor y el ligando, a estos antagonistas se los suele denominar *antagonistas activos*.

<sup>10</sup> Capítulo 3, sección 4



**Figura 4.8** Antagonistas activos de los NR. Se destaca el grupo voluminoso que interfiere con la hélice H12.



**Figura 4.9** Antagonismo activo en el ER. a) Estructura del complejo ER LBD-estradiol (pdb:1ere). La hélice H12 adquiere una posición adecuada para interactuar con los coactivadores. b) Estructura del complejo ER LBD-raloxifeno (pdb:1err). El grupo voluminoso del raloxifeno provoca un cambio en la orientación de la hélice H12. c) Superposición de las estructuras ER LBD-estradiol (rojo) y ER LBD-raloxifeno (amarillo).

En el caso del GR, la estructura cristalina del complejo GR LBD-RU486 muestra como, por presencia del grupo voluminoso en posición 11 $\beta$  de RU486, la hélice H12 aparece totalmente distorsionada. Así, el antagonismo de RU486 en el GR puede ser explicado al considerar que, por presencia del grupo voluminoso, el complejo resulta incapaz de unir los coactivadores indispensables para el inicio de la transcripción.

Si bien este modelo de antagonismo, y en definitiva de cómo actúa el GR, resulta muy atractivo por su simpleza, veremos que existen muchos aspectos de la actividad de este receptor, y de los NR en general, que no pueden ser explicados considerando únicamente esta forma de acción. Uno de ellos es la existencia de ligandos con actividad antagonista que no poseen ningún grupo voluminoso que pueda alterar la posición de la hélice H12. Ejemplos de este tipo de ligandos, denominados *antagonistas pasivos*, para el GR son el análogo rígido 21OH-6,19OP estudiado en el capítulo anterior, y el acetato de ciproterona. Para los demás SR también existen casos de antagonismo pasivo, como ser el de flutamida para el AR [87], el enantiómero R,R de 5,6,11,12-tetrahidrocriseno-2,8-diol (THC) para el ER [88] y la progesterona para el MR [89], entre otros. Resulta evidente entonces que otras bases moleculares de acción son necesarias para explicar el comportamiento antagonista de este tipo de ligandos.

### **Cambio conformacional inducido versus selección conformacional**

El modo de acción de los antagonistas activos anteriormente explicado asume implícitamente que el receptor sólo puede existir en dos estados, un estado activo en presencia de agonistas, o un estado inactivo en presencia de antagonistas. La posición de la hélice H12 funcionaría como un interruptor molecular, controlado por el ligando, determinando el estado de actividad del receptor. La aceptación de este modelo está relacionada a la vez con el concepto de cambio conformacional inducido, muchas veces utilizado en el área de la química medicinal para explicar el modo de acción de drogas. El *modelo de cambio conformacional inducido* propone que el ligando agonista se une a un estado inactivo del receptor, de mínima energía, y que es esta unión la que produce un cambio conformacional de una parte fundamental de la proteína, la hélice H12 en el caso de los NR, conduciendo a un estado activo del receptor. De tal manera, si se considerara estrictamente este modelo, para los NR solamente existirían ligandos agonistas puros o antagonistas puros, lo cual no es cierto para la mayoría de estos receptores. Como demuestra la simple existencia de los moduladores selectivos de NR<sup>11</sup>, el modo en que se regula el LBD no es simplemente un proceso de prendido y apagado del receptor.

<sup>11</sup> Capítulo 3 sección 3

En contraste al modelo del cambio conformacional inducido, el *modelo de selección conformacional* asume que el receptor libre existe en un ensamble de conformaciones de energía similar, y que el ligando se une selectivamente a determinados conformómeros activos, incrementando su proporción en la población total. La unión del ligando al receptor no provoca el pasaje de un estado inactivo a otro activo, sino que selecciona un determinado subconjunto de las conformaciones que componen el ensamble. Este modelo de selección conformacional resulta mucho más adecuado que el de cambio conformacional inducido para comprender en profundidad el modo de acción de los NR y explicar las propiedades de los SNuRMs. Así, la actividad de un determinado SNuRMs estará dada por el conjunto de conformómeros que seleccione.

### Modelo de equilibrio de unión de cofactores

Como se mencionó anteriormente, el modelo de antagonismo activo en los NR presupone que, en el estado activo, la hélice H12 adquiere una posición tal que el dominio AF-2 resulta capaz de unir coactivadores, mientras que el estado inactivo la posición de esta hélice impide esta unión. Sin embargo, este modelo no tiene en cuenta que también los corepresores interactúan con el LBD. Muchos estudios muestran que la región de unión de los corepresores, como SMRT o NCoR, se superpone mayormente con la región de unión de los coactivadores, es decir el dominio AF-2 [90]. De manera que la posición de la hélice H12, la cual dependerá del ligando unido, no sólo determina la capacidad de unión de los coactivadores sino también la de los corepresores. Coactivadores y corepresores compiten por la unión al LBD, y el resultado de esta competencia, que en última instancia determina la actividad transcripcional del receptor, dependerá del ligando unido al LBD.

La actividad de cada ligando estaría dada entonces por las diferentes conformaciones del receptor que selecciona, y por la afinidad de estas conformaciones por los distintos cofactores presentes en el medio. Así, mientras para los ligandos agonistas el equilibrio estará desplazado hacia el lado de los coactivadores, para los antagonistas lo estará hacia los corepresores. Este modelo de equilibrio, a diferencia del modelo de dos estados mencionado anteriormente, permite explicar la existencia de los moduladores de NR.

Por otra parte, la concentración relativa entre coactivadores y corepresores también influye en la interacción de estos con el receptor. Por ejemplo, aunque dexametasona es un agonista que induce una conformación del receptor que une coactivadores, también se ha demostrado que en presencia de altas concentraciones de corepresores, éstos se pueden unir al complejo GR-dex [91].

Del mismo modo, si bien el complejo del GR con el antagonista RU486 une corepresores, también puede unir coactivadores cuando estos están en alta concentración [91]. Debido a que tanto los cofactores presentes como su concentración dependen del tipo celular, la selectividad de acción de los SNuRMs puede ser explicada considerando este modelo.

En conclusión, los cofactores son un elemento fundamental en la actividad del GR, por lo tanto, comprender cómo interactúan y cómo afecta esta interacción a la actividad del receptor resulta clave para explicar la actividad de los glucocorticoides. El modelo que establece que el receptor pasa de un estado inactivo que no une coactivadores a uno activo que sí los une por presencia del ligando, resulta incompleto e inadecuado para comprender la vasta complejidad del modo de acción del GR. En cambio, el modelo de equilibrio de cofactores permite explicar muchos más aspectos de cómo este receptor es modulado por los distintos ligandos.

### Dimerización y unión al DNA

La formación de homodímeros GR-GR es otro de los eventos clave en el mecanismo de transactivación. Se sabe que el contacto entre monómeros involucra a una región denominada loop D en el DBD y que una mutación en esa región produce el GR<sup>dim</sup>, mutante que resulta incapaz de homodimerizar<sup>12</sup>. Sin embargo, existe evidencia que muestra que los dominios AF-1 y LBD también participan en la formación de homodímeros. Aunque se conoce que la dimerización del receptor está estrechamente relacionada a la etapa de unión del GR al DNA, muchos aspectos moleculares de estos procesos permanecen aún desconocidos. Existe relativamente poca información acerca de la dimerización en estudios *in vivo*, y esta no resulta concluyente.

A fines de la década del 80 y principios del 90 Wrangé y colaboradores mostraron que el GR existe como dímero cuando está unido a sitios GRE, con un monómero en cada ½GRE. También observaron que a altas concentraciones de GR, y en ausencia de DNA, el GR homodimeriza. No obstante, según estos autores, la dimerización no es necesaria para la unión del receptor al DNA, ya que también observaron que monómeros de GR tienen la capacidad de reconocer y unirse a ½GRE [92] [93].

Trabajando solamente con el GR DBD, Gustaffson y colaboradores propusieron un proceso denominado de facilitación por el cual el receptor se une al DNA. Encontraron que los ½GRE del promotor TAT no se comportan igual, sino que un GR DBD se une preferentemente a uno, lo cual facilita la unión del otro monómero al ½GRE restante [94]. Esta facilitación depende del contacto proteína-proteína de una región cercana a los dedos de Zn del DBD (el

<sup>12</sup> Capítulo 3, sección 3

loop D), sugiriendo que esta región participa en la dimerización del receptor [95]. Contrariamente a este proceso de facilitación, utilizando el receptor entero, Nemer y colaboradores encontraron que la formación de homodímeros es la etapa limitante en la unión del GR al DNA [96]. Por otra parte, en 1996 se informó que si bien la afinidad de los monómeros por los sitios GRE no se ve afectada en mutantes sin los dominios AF-1 o LBD, la afinidad de los homodímeros por el GRE aumenta al utilizar el receptor entero, lo cual indica que el GR DBD no es el único dominio que participa en la dimerización [97].

En el caso de aceptarse que la dimerización es un proceso independiente al de unión al DNA, tampoco se conoce con certeza si esta ocurre en el citoplasma o en el núcleo. Muchos autores esquematizan la transactivación con la dimerización ocurriendo dentro del núcleo, pero otros tantos consideran que tiene lugar en el citoplasma. En el año 2001 Savory y colaboradores mostraron que la dimerización puede ocurrir en el citoplasma y que el loop D resulta necesario y suficiente en este proceso [98]. Por otra parte, recientemente Kinjo y colaboradores, analizando la movilidad del receptor dentro del núcleo, propusieron un modelo en el cual la dimerización es el último evento de la transactivación, es decir que ocurre después de la unión de los cofactores y de la unión al DNA, y por lo tanto la dimerización no es requerida para la unión al GRE [99] [100].

Aunque la dimerización es una etapa considerada fundamental para la actividad del GR, no existe evidencia concluyente respecto del modo en que ocurre.

### **Simulación por dinámica molecular**

Dado que el objetivo de esta investigación es comprender las bases moleculares de acción de los análogos rígidos 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP, decidimos utilizar una técnica computacional, denominada simulación por dinámica molecular (MD), que permite estudiar tanto el modo en que estos ligandos se unen al receptor como el efecto que esta unión provoca en la proteína.

Las proteínas son sistemas inherentemente flexibles. Esta movilidad, esencial para su función biológica, comprende un amplio rango de escalas, tanto temporales como espaciales [101] [102]. La movilidad de las proteínas es un aspecto usualmente ignorado en el área del diseño de drogas; mucho énfasis, quizás demasiado, ha sido puesto en las estructuras rígidas. Esto puede deberse, principalmente, al fuerte impacto que provocan las estructuras cristalinas (y a la belleza de las imágenes), lo que lleva a considerar usual e incorrectamente, que la estructura cristalina de una proteína es siempre la estructura correcta. Además, existen dificultades técnicas y conceptuales que limitan enormemente la capacidad de tener en cuenta la flexibilidad de las proteínas a la hora de encontrar nuevas drogas. La obtención de las estructuras cristalinas requiere



la utilización de condiciones extremas, como temperaturas y concentraciones, que no representan adecuadamente el medio biológico. En solución a temperatura fisiológica, las proteínas existen como un ensamble de conformaciones energéticamente accesibles, de manera que la estructura tridimensional de una proteína está mejor descrita cuando todos estos estados son representados. El uso estándar de la cristalografía da como resultado una estructura estática promediada en tiempo y espacio que, desafortunadamente, representa muy pobremente el ensamble total de conformaciones.

La simulación por dinámica molecular es, al presente, la mejor manera de obtener un conjunto más completo de estos conformeros [101]. Básicamente, con una simulación MD se puede determinar la posición exacta de cada átomo del sistema estudiado a intervalos regulares de tiempo (del orden de los fs) durante un determinado tiempo (actualmente alrededor de ns). De esta manera, esta técnica permite explorar distintas conformaciones de una proteína. Sin embargo, los tiempos de simulación limitados, junto a la posible presencia de altas barreras energéticas sólo permiten obtener un pequeño conjunto de todas las conformaciones posibles. En este trabajo se realizaron simulaciones de sistemas de alrededor de 27000 átomos durante 6 ns. Si bien este lapso de tiempo no resulta suficiente para estudiar los cambios conformacionales más lentos, el mismo basta para observar cambios conformacionales rápidos en la proteína y estudiar la interacción entre ligando y receptor teniendo en cuenta la orientación del ligando, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.

## 4.2 Bases Moleculares de acción de 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP

Dos preguntas esenciales, de las cuales derivan otras, constituyen la base que guía esta investigación: ¿Por qué 21OH-6,19OP funciona en la transactivación como antagonista del GR si no posee el grupo voluminoso característico de los antagonistas activos? y ¿Por qué al introducir un grupo hemisuccinato en posición 21 de 21OH-6,19OP se obtiene un derivado con actividad agonista, opuesta a la del precursor? En busca de posibles respuestas, se realizaron simulaciones por Dinámica Molecular de los distintos complejos receptor-ligando, a partir de las cuales se analizó el modo de interacción de los ligandos con el bolsillo de unión del GR LBD y la manera en que esta interacción afecta al comportamiento dinámico y a la conformación global del receptor.

Antes de llevar a cabo estas simulaciones fue necesario considerar la localización subcelular de los complejos, es decir si los ligandos son capaces de inducir la translocación del GR

al núcleo. En el caso de 21HS-6,19OP, agonista de la transactivación<sup>13</sup>, el complejo debe ser necesariamente nuclear, pero en el caso del antagonista 21OH-6,19OP, la localización debe ser investigada, ya que el antagonismo podría residir únicamente en la incapacidad del complejo de translocar al núcleo. La sublocalización nuclear del complejo GR LBD-21OH-6,19OP fue investigada mediante microscopía por el Lic. Diego Presman en el laboratorio de la Dra. Pecci, encontrándose que 21OH-6,19OP efectivamente hace translocar al GR. Por lo tanto, es el comportamiento dinámico del complejo nuclear el que debe ser estudiado para explicar el antagonismo de 21OH-6,19OP. Afortunadamente, la estructura cristalina 1m2z representa un estado adecuado del receptor en el núcleo, dado que está unido a dexametasona (dex), ligando que lo hace translocar, y a un péptido cuya secuencia corresponde a un coactivador nuclear. De esta manera, esta estructura resulta, en principio, una estructura inicial adecuada para estudiar el comportamiento de los complejos nucleares del GR con los análogos rígidos.

En este trabajo se realizaron simulaciones de los complejos GR LBD-dex, para estudiar como se comporta el receptor con un ligando agonista, GR LBD libre (apo), para estudiar como se comporta el receptor en ausencia de ligando, y de los complejos con los análogos rígidos GR LBD-21OH-6,19OP y GR LBD-21HS-6,19OP. En busca de presentar los resultados obtenidos con mayor claridad, primero serán expuestos los concernientes a la simulación de los sistemas GR LBD libre, GR LBD-dex y GR LBD-21OH-6,19OP, y posteriormente se presentarán los resultados obtenidos para el sistema GR LBD-21HS-6,19OP.

#### *4.2.1 Simulación de GR LBD-dex, GR LBD-21OH-6,19OP y GR LBD*

##### **Estabilidad de las trayectorias**

Antes de investigar detenidamente las trayectorias obtenidas en la simulación por MD resulta indispensable evaluar la estabilidad de las mismas, debido a que solo es posible extraer información válida sobre el comportamiento de un sistema a partir de trayectorias estables. La inspección visual de los complejos a lo largo de la simulación muestra que la conformación global de las proteínas permanece esencialmente intacta en todos los casos. La desviación cuadrática media por residuo (RMSD), medida para los átomos del esqueleto proteico respecto a la estructura inicial, revela que todos los sistemas son estables (Fig. 4.10), con un RMSD promedio de  $1.35 \pm 0.11$  Å,  $1.30 \pm 0.9$  Å y  $1.68 \pm 0.12$  Å para los sistemas de dex, 21OH-6,19OP, y receptor

<sup>13</sup> Capítulo 3, sección 5

libre respectivamente. Estos valores indican que la estructura libre de ligando sufre mayores cambios conformacionales que los receptores con ligando. La ausencia de ligando en el LBP causa cambios en la estructura del receptor durante el primer ns, luego del cual permanece estable hasta el fin de la simulación.

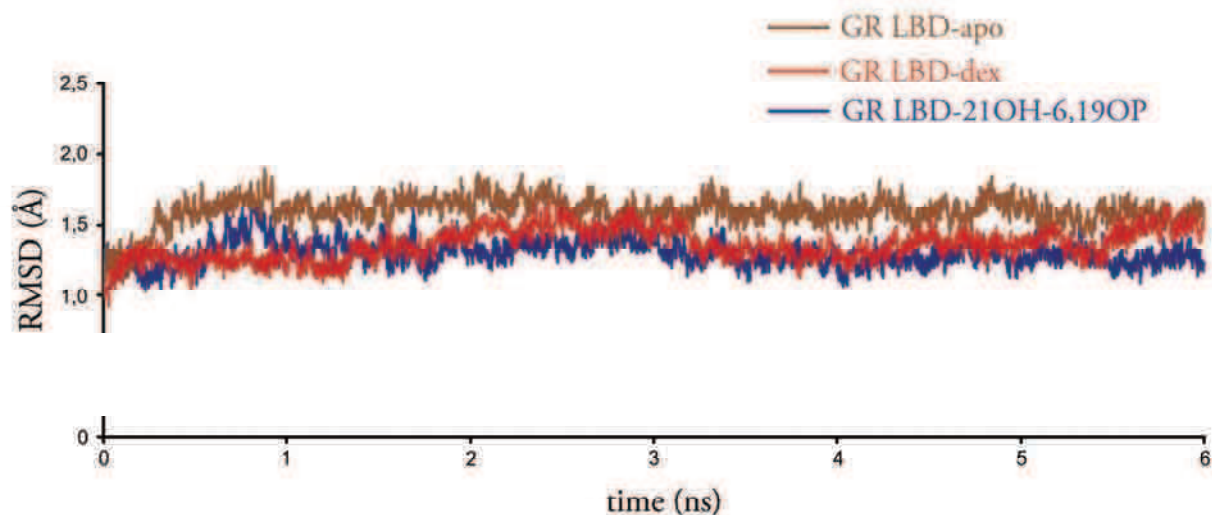
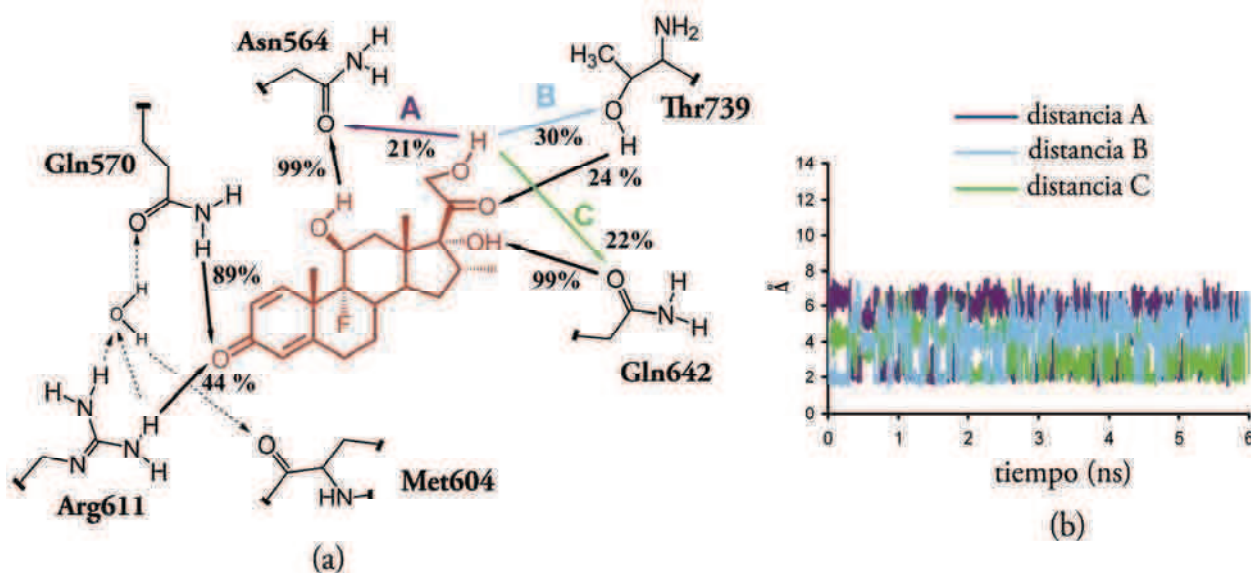


Figura 4.10 Estabilidad de las trayectorias

### Modo de unión de dexametasona

La figura Fig 4.11 muestra los contactos por puente de hidrógeno entre dex y LBP encontrados durante la simulación, junto al porcentaje de tiempo en el cual cada interacción está formada (frecuencia del puente de hidrógeno, considerando que se forma un puente de hidrógeno cuando la distancia entre átomos pesados es menor a 3.5 Å). En primer lugar, se destacan dos interacciones fuertes que permanecen estables durante la casi totalidad de la simulación: el 17 $\alpha$ -OH con Gln642 y el 11 $\beta$ -OH con Asn564. Estas interacciones, observadas también en la estructura cristalina, juegan un rol fundamental en el reconocimiento entre receptor y ligando, manteniendo la orientación de éste dentro del LBP.



**Figura 4.11** Modo de unión de dex. a) Interacciones por puente de hidrógeno entre dex y los residuos polares del LBP del GR LBD. El valor junto a las flechas indica la frecuencia de formación de puente de hidrógeno entre los átomos involucrados. b) Distancias A, B y C indicadas en a) en función del tiempo

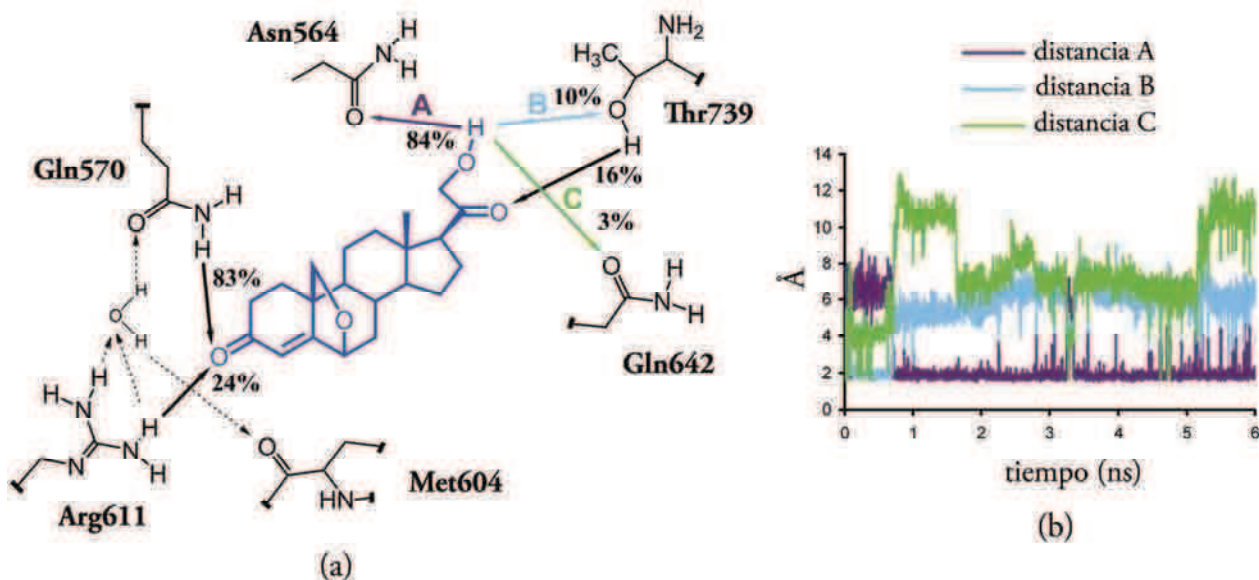
Alrededor del anillo A, se observa que el grupo 3-ceto participa de una red de puentes de hidrógeno que involucra a Gln570, Arg611 y una molécula de agua. Esta molécula de agua es una molécula intercambiable (es decir no es siempre la misma, sino que a lo largo de la simulación distintas aguas ocupan esa posición), que estabiliza la conformación de esos dos residuos de forma apropiada para la interacción con el átomo de oxígeno del grupo 3-ceto del ligando. Si bien en la estructura cristalina no existe una molécula de agua en esta región, otras simulaciones de SRs muestran el mismo fenómeno aquí observado [103] [104], sugiriendo quizás que se trata de una característica conservada de esta familia de receptores.

En solución, la conformación de la cadena lateral  $17\beta$  de esteroides como dex no está restringida. El ángulo de torsión determinado por los átomos C16, C17, C20, C21 puede rotar, de manera que el 21-OH se mueve libremente. En contraste a este comportamiento, la simulación muestra que dentro del receptor la orientación de la cadena lateral alterna entre tres posiciones bien definidas, determinadas por tres puentes de hidrógeno entre el 21-OH y los residuos Asn564, Thr739 y Gln642. Al graficar las distancias entre el oxígeno del 21-OH y el átomo involucrado en la interacción de cada residuo en función del tiempo, se observa que a lo largo de la simulación el 21-OH fluctúa continuamente, resultando una frecuencia similar para cada interacción, de manera que en el complejo GR LBD-dex este hidroxilo no posee una orientación preferencial.

## Modo de unión de 21OH-6,19OP

La molécula de 21OH-6,19OP fue introducida en el LBP superponiendo los átomos de carbono del anillo C con los correspondientes átomos de dex en la estructura cristalina. La inspección visual de la posición global de 21OH-6,19OP muestra que esta molécula permanece en su posición original prácticamente durante toda la simulación. 21OH-6,19OP posee solamente tres grupos capaces de formar interacciones por puente de hidrógeno con el receptor: el grupo 3-ceto, la cadena lateral en posición 17 $\beta$  y el átomo de oxígeno del puente 6,19 intramolecular.

Alrededor del grupo 3-ceto (Fig. 4.12) se encuentra una red de puentes de hidrógeno similar a la observada en el sistema de dex, también con una molécula de agua intercambiando interactuando con los residuos Arg611 y Gln570. Sin embargo, como 21OH-6,19OP posee una estructura esteroidea más tensionada que dex, el átomo de oxígeno de C-3 está más alejado del átomo de nitrógeno de Arg611, con lo cual esta interacción se debilita y disminuye su frecuencia respecto al caso de dex.



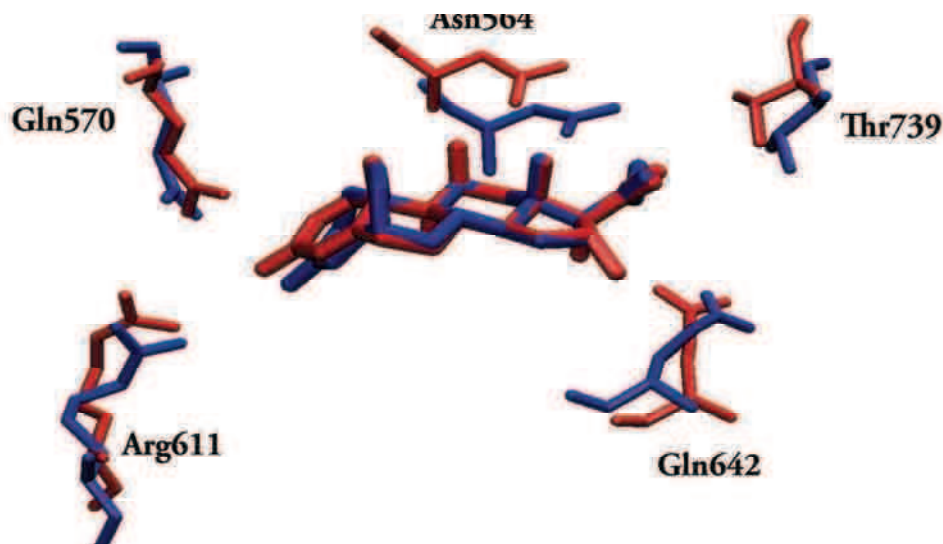
**Figura 4.12** Modo de unión de 21OH-6,19OP. Interacciones por puente de hidrógeno entre 21OH-6,19OP y los residuos polares del LBP del GR LBD. El valor junto a las flechas indica la frecuencia de formación de puente de hidrógeno entre los átomos involucrados. b) Distancias A, B y C indicadas en a) en función del tiempo

En contraste al sistema de dex, el 21-OH de 21OH-6,19OP no alterna a lo largo de la simulación entre las tres posiciones definidas por la interacción con Asn564, Thr739 y Gln642,

sino que luego de una primera etapa en la cual se orienta hacia la Thr739, este hidroxilo interactúa por puente de hidrogeno con Asn564 hasta el final de la simulación. La orientación preferencial de 21-OH se ve reflejada en la mayor frecuencia de unión con Asn564. Dos fenómenos pueden ser claves para comprender el diferente comportamiento de 21-OH en los sistemas de dex y de 21OH-6,19OP. Primero, a causa del puente intramolecular, 21OH-6,19OP es una molécula más corta que dex; las optimizaciones de geometría usando HF/6-31G\*\* predicen que la distancia C3-C17 es de 8,23 Å para dex y de 7,71 Å para 21OH-6,19OP. En consecuencia, el 21-OH se encuentra más alejado de los residuos Thr739 y Gln642 pero más cerca de Asn564. Segundo, la falta del hidroxilo en posición 11 permite al residuo Asn564 adquirir una orientación más favorable para interactuar con el 21-OH.

Por último, el examen del LBP alrededor del puente intramolecular de 21OH-6,19OP muestra que no hay ningún residuo polar capaz de formar puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno.

En resumen, analizando a nivel molecular el modo de unión de dex y 21OH-6,19OP, se encontró que si bien la orientación y posición global de los esteroides resulta similar, existen importantes diferencias en la forma en que interaccionan los residuos polares del LBP y los grupos con capacidad de formar puentes de hidrógeno de los ligandos (Fig. 4.13).

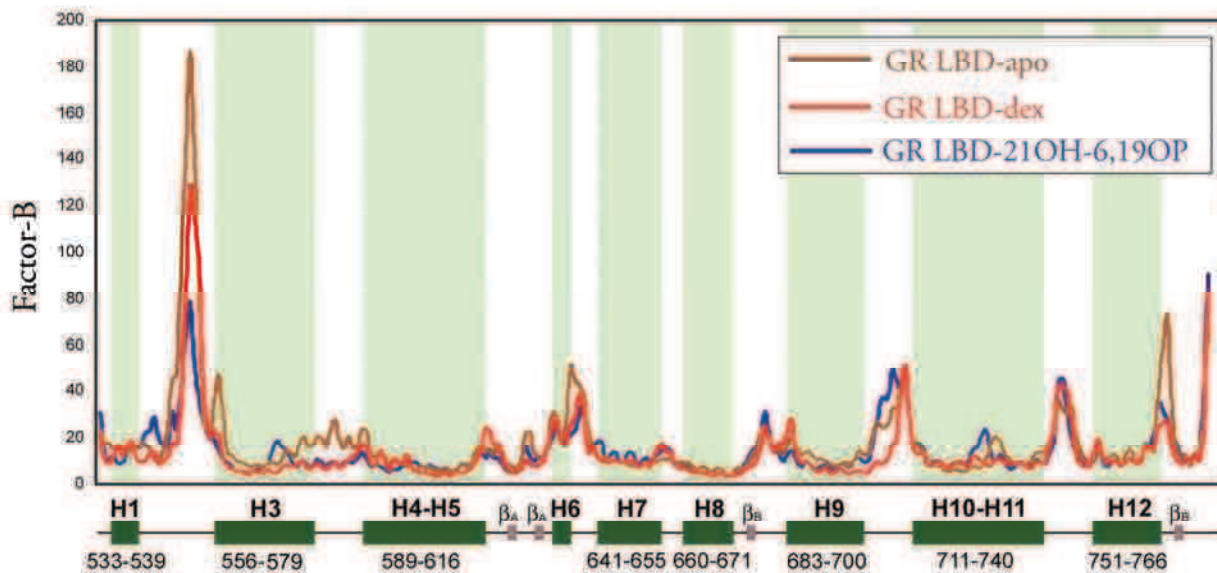


**Figura 4.13** Superposición de las estructuras promedio de dex (rojo) y 21OH-6,19OP (azul) dentro del GR LBD

Principalmente, el comportamiento del 21-OH de 21OH-6,19OP difiere sustancialmente respecto al de dex, probablemente debido a la estructura más torsionada de este análogo rígido y a la falta de hidroxilo en posición 11 $\beta$ .

### Fluctuaciones del esqueleto de la proteína

Para estudiar el comportamiento dinámico de la proteína una vez alcanzado el estado de equilibrio, se calculó el factor B, valor que representa la fluctuación por residuo promediada en el tiempo, para cada residuo sobre los últimos 4ns de la simulación de cada sistema simulado. La Fig. 4.14 muestra que los tres sistemas simulados poseen un perfil de fluctuación similar.



**Figura 4.14** Fluctuación del receptor. Factor-B por residuo de los últimos 4 ns de la simulación. En el eje x se esquematiza la estructura secundaria de GR LBD.

Como era predecible, las regiones con mayores valores del factor B corresponden a loops, mientras que las regiones más estructuradas, hélices y láminas beta, poseen menor fluctuación. Sin embargo, comparando los sistemas entre sí puede observarse que existen diferencias significativas en la movilidad del receptor, principalmente en dos regiones: el loop H1-H3 y la región C terminal de la H12. Los residuos del loop H1-H3, más móviles que el resto de la proteína en los tres sistemas, fluctúan más cuando el receptor se encuentra libre de ligando. Además, estos residuos tienen mayor movilidad cuando el receptor está unido a dex que cuando lo está a 21OH-6,19OP. El análisis estructural y dinámico de esta región de la proteína, resulta

de particular interés ya que estos residuos participan activamente en la homodimerización de GR LBD. En cuanto a los residuos de la H12, otra importante región del receptor, el factor B también es apreciablemente mayor para el receptor libre que para el receptor unido a alguno de estos ligandos. Las implicancias de estas diferencias en la movilidad de cada uno de los sistemas serán analizadas posteriormente, conjuntamente a los resultados obtenidos al analizar las estructuras promedio de cada sistema.

### Estructuras promedio

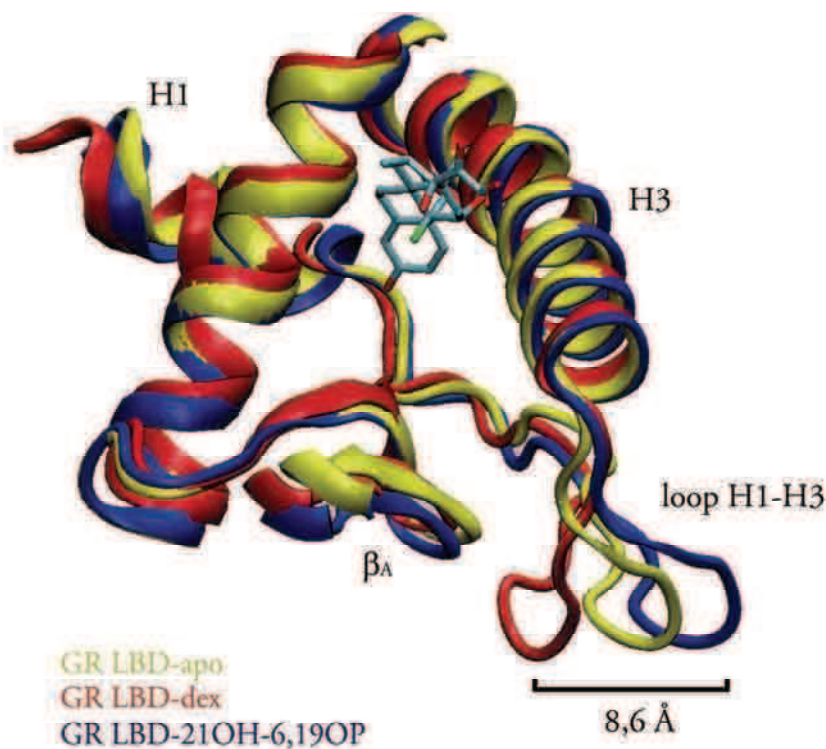
Para comparar los cambios conformacionales del esqueleto de la proteína ocurridos durante la simulación se obtuvieron las estructuras promedio de los últimos 4 ns para cada uno de los sistemas simulados. Al superponer estas estructuras (minimizando el RMSD), se observa que existen importantes diferencias en las dos regiones fundamentales de la proteína: el loop H1-H3 (interfase de dimerización) y la H12 (dominio AF-2).

#### *Interfase de dimerización*

Como puede observarse en la Fig. 4.15, la conformación promedio de la región N terminal del loop H1-H3 depende fuertemente del estado del LBP. En el estado libre, este loop adquiere una posición intermedia entre los estados ligados. Esta posición resulta desplazada hacia una más cercana a la proteína cuando está unido dex, y más lejana cuando el ligando presente es 21OH-6,19OP. El desplazamiento en la posición del átomo C $\alpha$  del residuo Ser551 en los complejos GR LBD-dex y GR LBD-21OH-6,19OP es de alrededor de 8,6 Å, indicando un cambio conformacional importante en la proteína por la presencia del análogo rígido en el LBP.

Por lo tanto, al determinar la estructura promedio y la fluctuación de cada residuo para los sistemas simulados se encuentra que el comportamiento dinámico del loop H1-H3 depende del estado del LBP. En el estado agonista, es decir con dex presente, este loop fluctúa moderadamente alrededor de una posición cercana a la H6. En el estado libre, las fluctuaciones son mayores y la posición resulta más alejada de la H6. Finalmente, en el estado antagonista, es decir con 21OH-6,19OP presente, el loop evoluciona hacia una conformación rígida muy alejada del resto de la proteína.

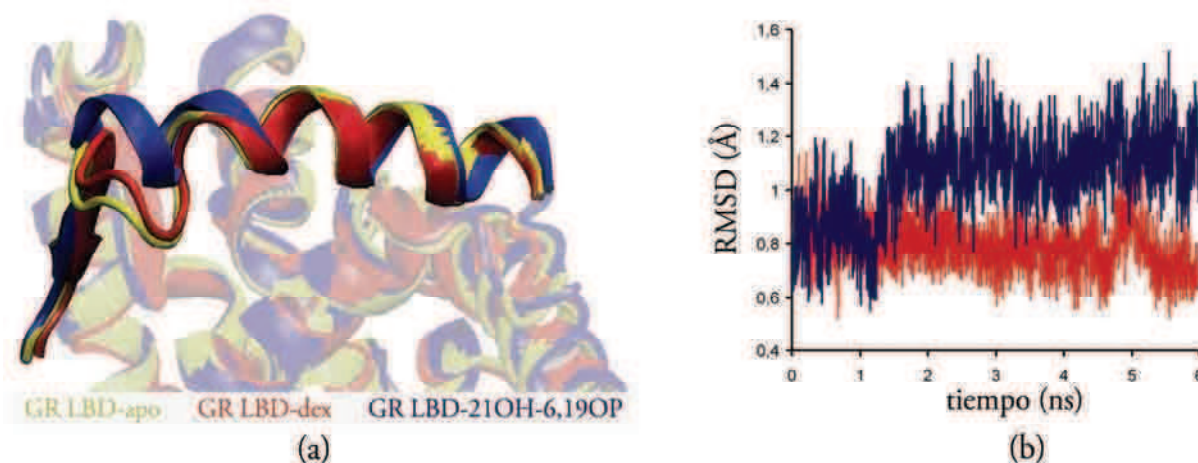




**Figura 4.15** Superposición de las estructura promedio (últimos 4 ns) de la interfase de dimerización de los complejos GR LBD-dex (rojo), GR LBD-21OH-6,19OP (azul) y GR LBD libre (amarillo).

### *Dominio AF-2*

Analizando las estructuras promedio también se observa que existe una conexión entre la conformación promedio de los residuos N terminales del GR LBD y el estado del LBP. La superposición de estas estructuras claramente muestra que en el complejo GR LBD-21OH-6,19OP, los residuos 762-767 adoptan una conformación más estructurada (Fig. 4.16a), de tal manera que la hélice H12 se hace cinco residuos más larga comparada con la estructura original. En contraste, en el sistema de dex, la conformación de esos residuos permanece muy similar a la original. El RMSD de los átomos del esqueleto de la hélice H12 respecto a la estructura inicial indica que el cambio que acontece en el sistema de 21OH-6,19OP no es un proceso gradual, sino que un salto del valor de RMSD ocurre alrededor de 1.4 ns (Fig. 4.16b).



**Figura 4.16** a) Superposición de las estructura promedio (últimos 4 ns) de la hélice H12 de los complejos GR LBD-dex (rojo), GR LBD-21OH-6,19OP (azul) y GR LBD libre (amarillo). b) RMSD de la hélice H12 respecto de la estructura inicial medido sobre los átomos del esqueleto de GR LBD-dex (rojo) y GR LBD-21OH-6,19OP (azul).

Para analizar con mayor profundidad los cambios ocurridos que pueden afectar el comportamiento de AF-2, se calcularon las distancias entre los átomos  $C\alpha$  de los residuos que interaccionan electrostáticamente con los coactivadores (ver Fig. 4.6c). La posición relativa de estos cuatro átomos puede considerarse como una medida de la apertura de la superficie hidrofóbica AF-2. La tabla 4.1 muestra que las únicas distancias que difieren apreciablemente entre los sistemas simulados son aquellas en las que participa el residuo Glu755, residuo ubicado en la H12. Esto indica que el ligando unido podría afectar, no solo la longitud de la H12, sino también su posición respecto al resto de la proteína, determinando la accesibilidad de los coactivadores al hueco AF-2.

| Residuo   |                  | Distancia $C\alpha$ - $C\alpha$ (Å) |                    |          |
|-----------|------------------|-------------------------------------|--------------------|----------|
| <i>i</i>  | <i>j</i>         | GR LBD-dex                          | GR LBD-21OH-6,19OP | $\Delta$ |
| 755 (H12) | 579 (H3)         | 19,38                               | 18,90              | 0,48     |
| 755 (H12) | 585 (H3-H4 loop) | 22,59                               | 21,99              | 0,60     |
| 755 (H12) | 590 (H4)         | 15,79                               | 15,18              | 0,61     |
| 579 (H3)  | 585 (H3-H4 loop) | 5,30                                | 5,29               | 0,01     |
| 579 (H3)  | 590 (H4)         | 10,80                               | 10,83              | -0,03    |
| 590 (H4)  | 585 (H3-H4 loop) | 10,92                               | 10,91              | 0,01     |

**Tabla 4.1** Distancia entre los  $C\alpha$  de los residuos del GR LBD que interaccionan electrostáticamente con el coactivador TIF2

## Discusión

Las simulaciones por MD realizadas en este trabajo fueron planteadas con el objetivo de investigar las bases moleculares de acción de 21OH-6,19OP. Específicamente, la intención era encontrar algún fenómeno a nivel molecular que pueda dar cuenta del antagonismo pasivo de este ligando. Para ello se estudió el comportamiento dinámico del complejo GR LBD-21OH-6,19OP y se lo comparó con el del complejo GR LBD-dex, tomando este último como modelo de comportamiento agonista. Al realizar esta comparación no solo se encontró que existen cambios sustanciales en el modo de unión de cada ligando, sino que la movilidad y la estructura global de regiones fundamentales del receptor difieren entre ambos complejos. Cuando el antagonista pasivo está unido al GR LBD la conformación de una zona que participa en la homodimerización, el loop H1-3, resulta notablemente modificada respecto al caso del ligando agonista. El diferente comportamiento de este loop podría estar asociado a las diferencias observadas en la interacción de cada ligando con el residuo Asn564, localizado en la hélice H3. Dado que el complejo GR-21OH-6,19OP resulta incapaz de transactivar el gen MMTV, y que una etapa imprescindible de este mecanismo de acción consiste en la homodimerización del GR, surge la hipótesis de que el antagonismo de 21OH-6,19OP se basa, al menos en parte, en la incapacidad de este ligando de producir una conformación del GR que pueda homodimerizar.

La otra región en la cual se pueden advertir diferencias entre los complejos, aunque mucho menos pronunciadas que en el caso del loop H1-H3, es en la región AF-2. Por un lado, con el antagonista pasivo la H12 se extiende cinco residuos más hacia el lado N terminal. Por otro lado, al medir las distancias entre los residuos que forman la interacción electrostática entre el receptor y el coactivador, se observa que la dimensión del dominio AF-2 es distinta cuando el antagonista pasivo está unido. Si estos leves cambios producidos en la región AF-2 comprometiesen la habilidad del complejo GR-21OH-6,19OP de reclutar los coactivadores necesarios para la transactivación, constituirían un mecanismo adicional para explicar el antagonismo pasivo de 21OH-6,19OP.

### 4.2.2 Simulación de GR LBD-21HS-6,19OP

Los resultados de actividad biológica presentados en el capítulo 3 demuestran que el grupo hemisuccinato de 21HS-6,19OP participa, de alguna manera, activamente en la estabilización de una estructura del receptor que resulta capaz de transactivar el MMTV-LUC. Para investigar este fenómeno a nivel molecular se decidió realizar la simulación del complejo GR LBD-21HS-6,19OP, y comparar esta trayectoria con las ya obtenidas para dex y 21OH-6,19OP. La introducción de 21HS-6,19OP dentro del LBP para obtener la estructura inicial de la simulación no es un proceso trivial como en el caso de 21OH-6,19OP, ya que, por un lado, el grupo hemisuccinato voluminoso puede existir en distintas conformaciones, y por otro, es necesario evitar la superposición de átomos del ligando y el receptor. Analizando los alrededores del LBD en la estructura cristalina se observó que existe una pequeña cavidad formada por las hélices H3, H7 y H11 en la cual el grupo hemisuccinato, en su forma extendida, puede ser acomodado fácilmente sin impedimento estérico. Por lo tanto, la estructura inicial del complejo GR LBD-21HS-6,19OP se obtuvo superponiendo los átomos de carbono del anillo C con los correspondientes a dex y adaptando la conformación del grupo hemisuccinato de tal manera que entre en esta cavidad. Además, considerando el pH fisiológico, el grupo ácido terminal del hemisuccinato fue introducido en su forma desprotonada.

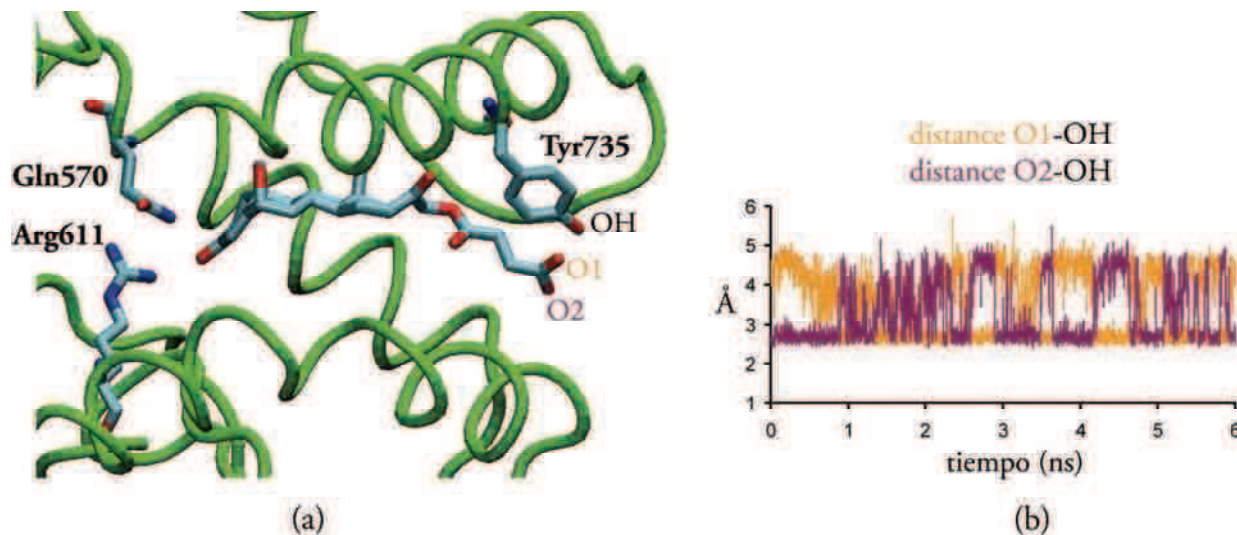
El sistema así obtenido fue simulado durante 6 ns en idénticas condiciones que los sistemas de dex y 21OH-6,19OP. La inspección visual y la determinación del RMSD de la trayectoria del complejo GR LBD-21HS-6,19OP muestran que la estabilidad es similar a la de los complejos antes simulados.

#### Modo de unión de 21HS-6,19OP

La inspección visual de la trayectoria del complejo GR LBD-21HS-6,19OP muestra que tanto la posición como la conformación global del esqueleto esteroideal resulta similar a la adoptada por 21OH-6,19OP en el LBD. También se observa en este sistema la red de puentes de hidrógeno alrededor del anillo A antes descrita para dex y 21OH-6,19OP, con una frecuencia de unión con los residuos Arg611 y Gln570 similar a la de 21OH-6,19OP (Fig. 4.12). Al igual que en el sistema de 21OH-6,19OP, no hay interacción entre el átomo de oxígeno del puente intramolecular 6,19 de 21OH-6,19OP y los residuos polares de LBD.

El grupo hemisuccinato permanece alrededor de su posición inicial durante toda la simulación (Fig. 4.17). Además, se observa que el grupo carboxilato terminal del hemisuccinato

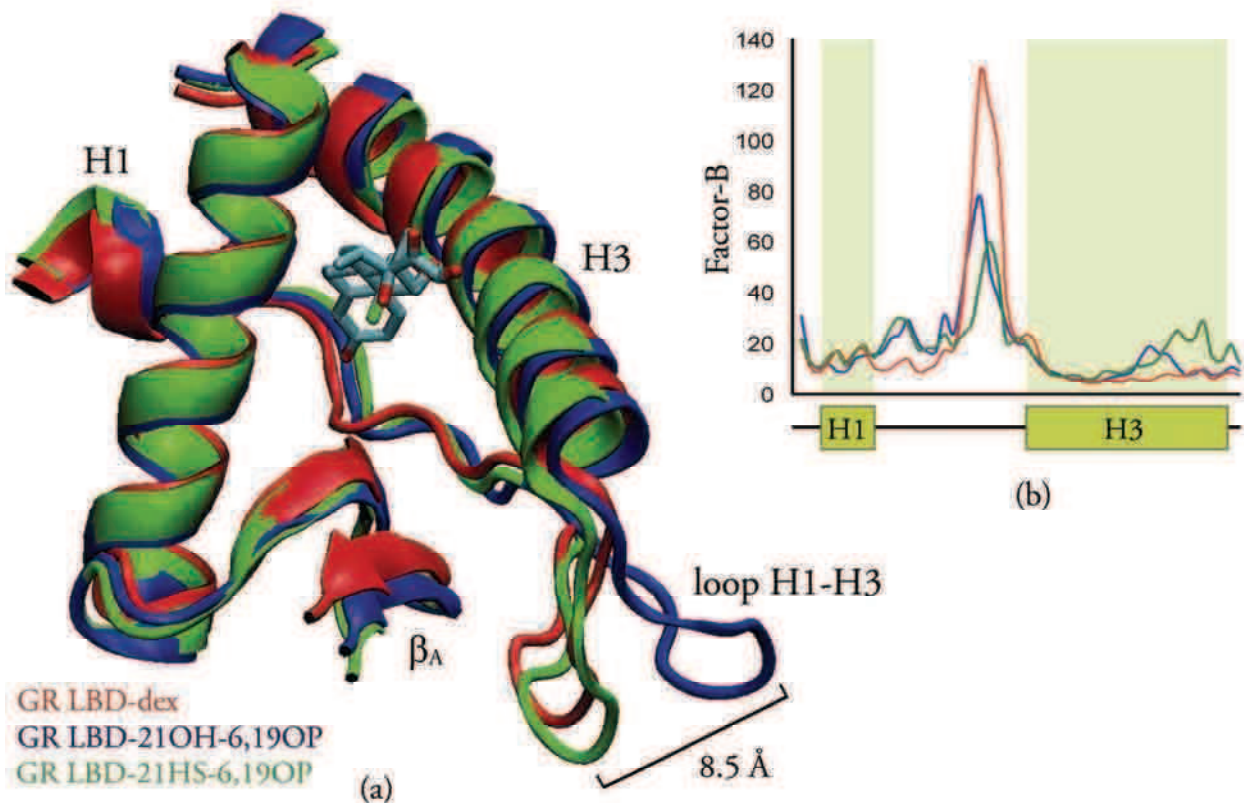
forma un puente de hidrógeno estable con el hidroxilo fenólico del residuo Tyr735, residuo localizado en la hélice H11. El análisis de la evolución temporal de la distancia entre los átomos de oxígeno del carboxilato y el átomo de oxígeno del OH de Tyr735 revela que al menos un puente de hidrógeno siempre está formado.



**Figura 4.17** Modo de unión de 21HS-6,19OP a) Estructura representativa del modo de unión de 21HS-6,19OP en el LBP del GR LBD. b) Distancia entre el átomo OH de la Tyr735 y los átomos O1 y O2 del grupo carboxilato terminal de 21HS-6,19OP en función del tiempo

### Interfase de dimerización

Como en las simulaciones anteriores, el comportamiento dinámico del loop H1-H3 del complejo GR LBD-21HS-6,19OP fue evaluado calculando su fluctuación y la posición promedio. En la Fig. 4.18b se observa que, como en el caso del sistema de 21OH-6,19OP, el loop H1-H3 del complejo GR LBD-21HS-6,19OP posee una fluctuación menor que el loop H1-H3 del sistema de dex. Sin embargo, en contraste al sistema de 21OH-6,19OP, la conformación promedio de este loop resulta muy similar a la conformación adoptada en el sistema de dex (Fig. 4.18a). La inspección visual de la trayectoria de GR LBD-21HS-6,19OP revela que, luego de un período inicial en el cual este loop posee alta fluctuación, provocada seguramente por la presencia del grupo hemisuccinato, el loop H1-H3 pierde movilidad y adopta una posición cercana al resto de la proteína, similar a la adoptada en el sistema de dex pero muy diferente a la adoptada en el sistema de 21OH-6,19OP.

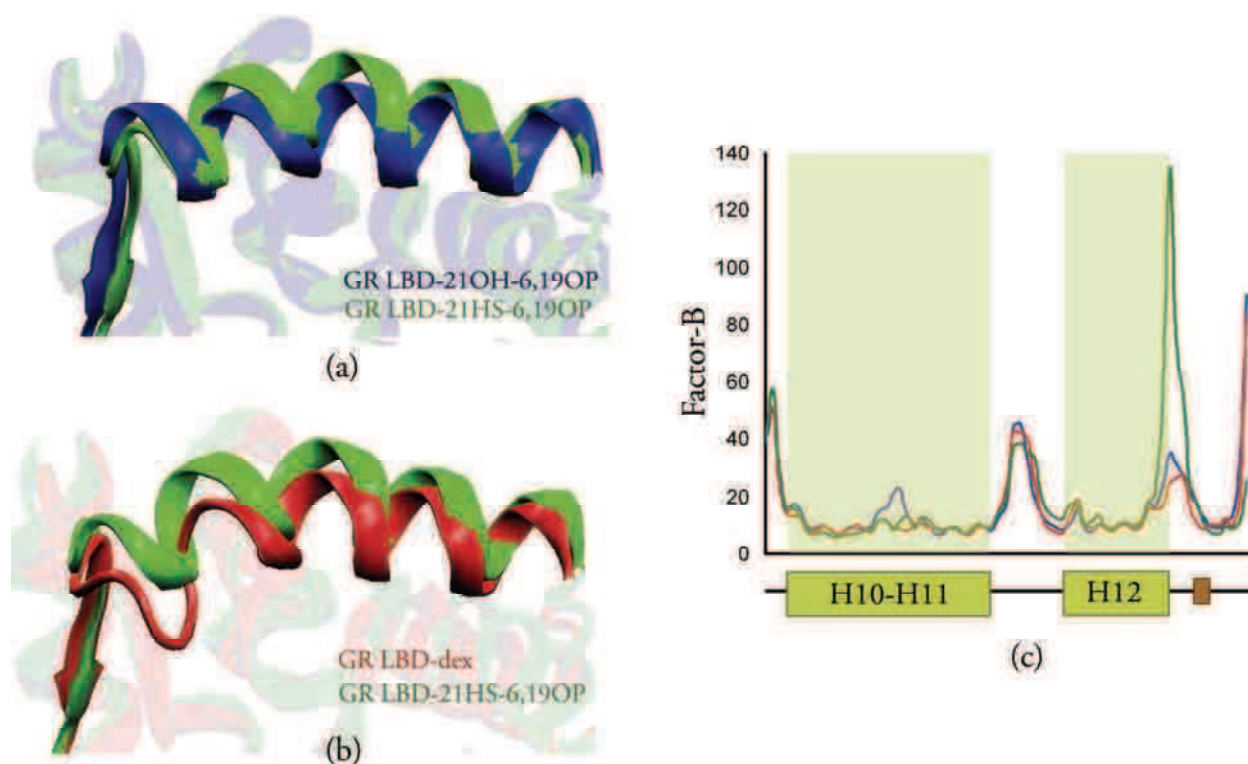


**Figura 4.18** a) Superposición de las estructura promedio (últimos 4 ns) de la interfase de dimerización de los complejos GR LBD-dex (rojo), GR LBD-21OH-6,19OP (azul) y GR LBD-21HS-6,19OP (verde). b) Factor-B por residuo (últimos 4 ns). En el eje x se esquematiza la estructura secundaria de GR LBD.

## Dominio AF-2

Comparando la estructura promedio del complejo GR LBD-21HS-6,19OP con la de los complejos GR LBD-21OH-6,19OP y GR LBD-dex, puede observarse que ocurre el mismo fenómeno de extensión de la H12 anteriormente descrito (Fig. 4.19a). Además, respecto a la posición observada en el complejo GR LBD-dex, la H12 del complejo GR LBD-21HS-6,19OP sufre un importante desplazamiento (Fig. 4.19b), posiblemente provocado por la presencia del grupo hemisuccinato voluminoso. No obstante, la diferencia más marcada reside en la mayor fluctuación de la parte C terminal de la H12 del complejo GR LBD-21HS-6,19OP respecto de los complejos GR LBD-dex y GR LBD-21OH-6,19OP (Fig. 4.19c).

Al determinar las distancias entre los átomos C $\alpha$  de los residuos que forman las interacciones electrostáticas con el coactivador TIF2 para todos los sistemas simulados (Tabla 4.2), puede observarse que la presencia de 21HS-6,19OP no solo modifica las distancias en las cuales está involucrado el residuo 755 de la hélice H12 (lo que ocurre con 21OH-6,19OP) sino también aquellas en las cuales participa el residuo 579 de la H3. Por lo tanto, respecto al sistema de 21OH-6,19OP (Tabla 2.1), el grupo hemisuccinato de 21HS-6,19OP causa un cambio mayor en la estructura del dominio AF-2.



**Figura 4.19** a) Superposición de las estructura promedio (últimos 4 ns) de la hélice H12 de los complejos GR LBD-dex (rojo) y GR LBD-21HS-6,19OP (verde). b) Superposición de las estructura promedio (últimos 4 ns) de la hélice H12 de los complejos GR LBD-21OH-6,19OP (azul) y GR LBD-21HS-6,19OP (verde). c) Factor-B por residuo (últimos 4 ns). En el eje x se esquematiza la estructura secundaria de GR LBD.

| Residuo   |                  | Distancia C $\alpha$ -C $\alpha$ (Å) |                    |          |
|-----------|------------------|--------------------------------------|--------------------|----------|
| <i>i</i>  | <i>j</i>         | GR LBD-dex                           | GR LBD-21HS-6,19OP | $\Delta$ |
| 755 (H12) | 579 (H3)         | 19,38                                | 18,90              | 0,67     |
| 755 (H12) | 585 (H3-H4 loop) | 22,59                                | 21,99              | 0,58     |
| 755 (H12) | 590 (H4)         | 15,79                                | 15,18              | 0,41     |
| 579 (H3)  | 585 (H3-H4 loop) | 5,30                                 | 5,29               | -0,71    |
| 579 (H3)  | 590 (H4)         | 10,80                                | 10,83              | -1,41    |
| 590 (H4)  | 585 (H3-H4 loop) | 10,92                                | 10,91              | -0,04    |

**Tabla 4.2** Distancia entre los C $\alpha$  de los residuos del GR LBD que interaccionan electroestáticamente con el coactivador TIF2

## Discusión

La simulación por dinámica molecular del complejo GR LBD-21HS-6,19OP fue realizada con el objetivo de investigar el modo en que el grupo hemisuccinato de 21HS-6,19OP interactúa con el receptor y lleva a un complejo con actividad agonista en la transactivación. Interesantemente, los resultados obtenidos muestran una serie de fenómenos que podrían estar involucrados en el mecanismo molecular de acción de este análogo rígido.

Primero, existe al menos una forma de acomodar el grupo hemisuccinato de 21HS-6,19OP dentro del GR LBD sin problemas de impedimento estérico, de manera de obtener una trayectoria del complejo estable. Como vimos anteriormente, existe una gran cantidad de glucocorticoides con cadenas laterales voluminosas en posición 17 $\alpha$  y 21. Desde el punto de vista rígido de la estructura cristalina (pdb:1m2z), si bien existe una gran cavidad alrededor de la posición 17 $\alpha$  que puede dar lugar a la presencia de grupos voluminosos en esta posición, un grupo voluminoso en posición 21 no encontraría lugar suficiente. Sin embargo, utilizando simulación por dinámica molecular hemos encontrado que efectivamente el receptor posee la plasticidad necesaria para acomodar grupos voluminosos en posición 21 como el de 21HS-6,19OP.

Segundo, la longitud del grupo hemisuccinato es tal que el carboxilato terminal interactúa fuertemente con el hidroxilo fenólico de Tyr735. Estudios mutacionales realizados por Ray y colaboradores han mostrado que este residuo resulta fundamental para la transactivación del GR [105]. El reemplazo de esta Tyr por Phe o Val no afecta la afinidad de unión de dex pero sí disminuye su potencia transcripcional. Por lo tanto, esta interacción ligando-receptor adicional



para 21HS-6,19OP respecto de 21OH-6,19OP podría estar involucrada en el mantenimiento de una conformación del GR capaz de transactivar.

Tercero, la presencia del grupo hemisuccinato revierte el cambio conformacional del loop H1-H3 observado en el complejo GR LBD-21OH-6,19OP, obteniéndose una estructura promedio similar a la del sistema de dex, lo cual correlaciona bien con la actividad agonista de 21HS-6,19OP. El paso de antagonismo a agonismo observado cuando se introduce un grupo hemisuccinato en posición 21 de 21OH-6,19OP podría residir en el cambio conformacional que produce este grupo sobre el loop H1-H3, cambio que podría restablecer la capacidad del receptor de homodimerizar.

Por último, 21HS-6,19OP causa cambios más profundos en el dominio AF-2 que los observados para 21OH-6,19OP, especialmente en la movilidad de la parte C terminal de la hélice H12, cambios que podrían afectar la capacidad del complejo de interactuar con los cofactores.

# CAPÍTULO 5

---

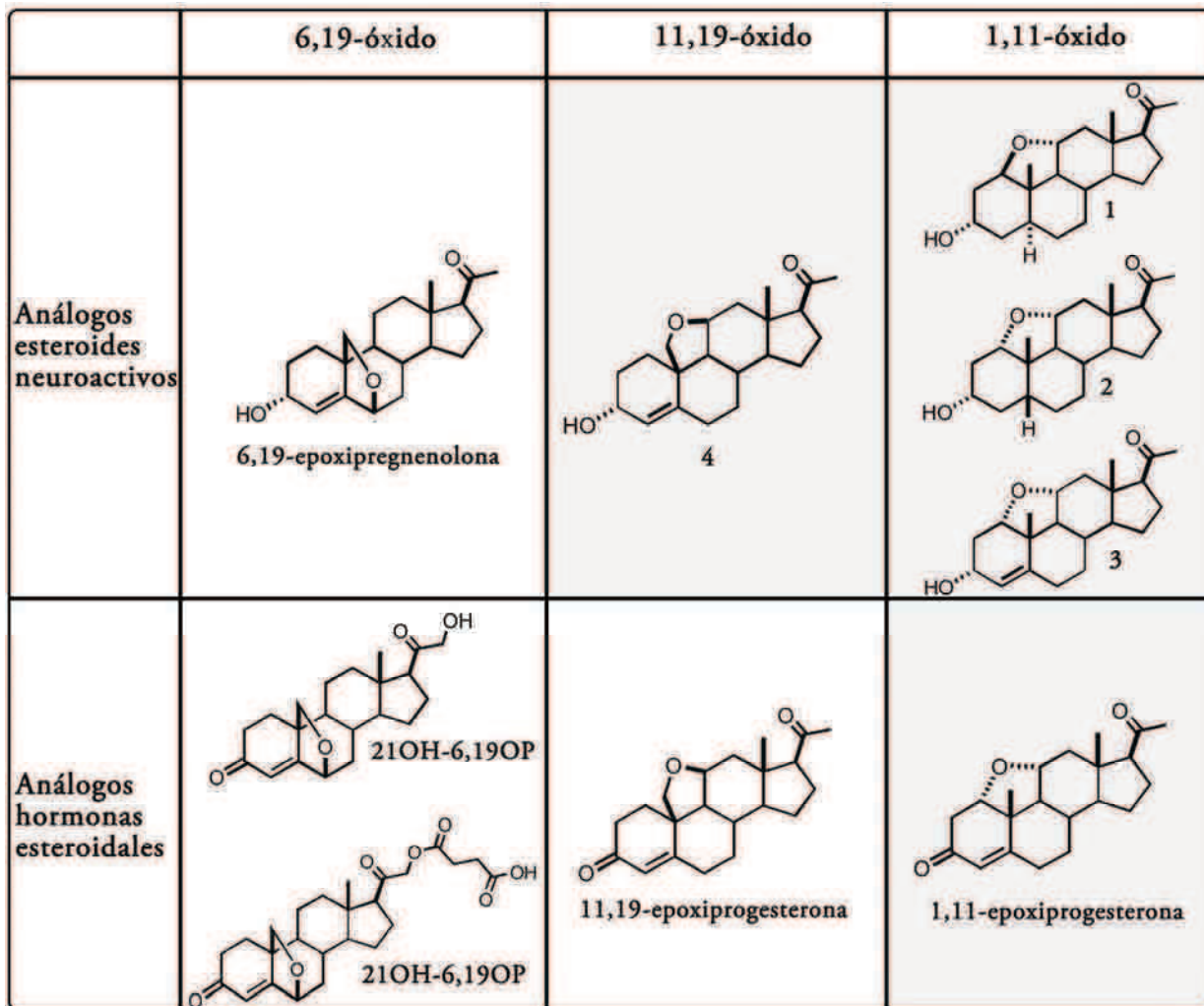
## CONCLUSIÓN



La selección natural ha concedido a los esteroides un rol fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la vida. Su bajo peso molecular y su alto carácter lipofílico hacen a estas moléculas especialmente aptas para actuar como mensajeros químicos en el organismo. Además, la flexibilidad del esqueleto esteroideal permite que pequeñas modificaciones de los grupos funcionales presentes, alteren la conformación global de la molécula originando ligandos para diversos receptores a partir de una misma estructura base. Desde un punto de vista farmacológico, esta flexibilidad representa en muchas ocasiones un grave obstáculo para el diseño de nuevas drogas esteroidales. La flexibilidad del esteroide y la alta similitud de secuencia entre las proteínas que los unen son las principales causas de la promiscuidad observada entre ligandos y receptores. Al introducir puentes intramoleculares que conecten átomos del esqueleto carbonado se fija la conformación del esteroide, disminuyendo su flexibilidad y aumentando la posibilidad de que sea específico para un dado receptor. En base a esto, en nuestro grupo de investigación se han desarrollado diversas estrategias sintéticas para obtener análogos rígidos de esteroides bioactivos con puentes epóxido. La Fig. 5.1 muestra los compuestos con puente epóxido obtenidos con anterioridad a esta tesis (21OH-6,19OP, 21HS-6,19OP, 6,19-epoxipregnenolona y 11,19-epoxiprogesterona) y los obtenidos durante el desarrollo de la misma (análogos 1-4 y 1,11-epoxiprogesterona), según el tipo de puente presente y la clase de análogo.

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación habían mostrado que ciertos derivados de 6,19-epoxiprogesterona y la 11,19-epoxiprogesterona tenían propiedades biológicas inusuales. También se había observado la actividad sobre el receptor GABA<sub>A</sub> de la 6,19-epoxipregnenolona. Esas actividades están fuertemente relacionadas con la particular conformación que adoptan estas moléculas en la fusión de anillo A/B por la combinación del doble enlace en posición 4,5 y un puente intramolecular entre el C-19 y un átomo del núcleo esteroideal.

En esta tesis se aplicaron técnicas de diferentes disciplinas con el fin de ampliar el conocimiento de la química y bioquímica de esteroides con puentes epóxido, específicamente de aquellos que pueden regular y fijar conformaciones en la fusión de anillos A/B. Por una parte, se exploró la obtención de puentes 1,11 $\alpha$ -epóxido desarrollando métodos de síntesis para obtener análogos de los esteroides neuroactivos pregnanolona y allopregnanolona. El estudio de la reacción de funcionalización remota de la posición 1 en 11 $\alpha$ -hidroxiesteroides y el análisis computacional de los intermediarios permitió comprender los requerimientos estéricos y estereoquímicos de esta reacción y obtener los análogos 1-3. La evaluación de la actividad de los análogos 1 y 2 sobre el receptor GABA<sub>A</sub> mostró una fuerte dependencia con la distancia O3-O20.



**Figura 5.1** Análogos rígidos de hormonas esteroidales y neuroesteroides con puente epóxido sintetizados en nuestro grupo de investigación.

Así, la menor actividad del análogo 1, estructuralmente relacionado a allopregnanolona, puede relacionarse con una menor distancia O3-O20 a la requerida para un esteroide de conformación global plana (ver Fig. 2.20a, pág. 47). Por otra parte la alta actividad observada para el análogo 2 estructuralmente relacionado a pregnanolona es concordante con una distancia O3-O20 muy similar a la de esta última (Ver Fig. 2.20b, pág. 47). El paralelismo en las relaciones estructura-actividad observados para los esteroides 5 $\alpha$  y 5 $\beta$ -reducidos, sugieren la existencia de un sitio de unión común en el receptor GABA<sub>A</sub> con diferentes puntos de anclaje para la región alrededor del anillo A según se trate de esteroides planos (5 $\alpha$ -H) o curvos (5 $\beta$ -H) [25]. El hecho que las distancias O3-O20 de los análogos 1 y 2 sean practicamente idénticas (10,33 y 10,34 Å respectivamente) refuerza esa hipótesis. Así, una distancia en el rango 10,3-10,6 Å sería óptima para los puntos de anclaje de un esteroide curvo (2, pregnanolona) pero

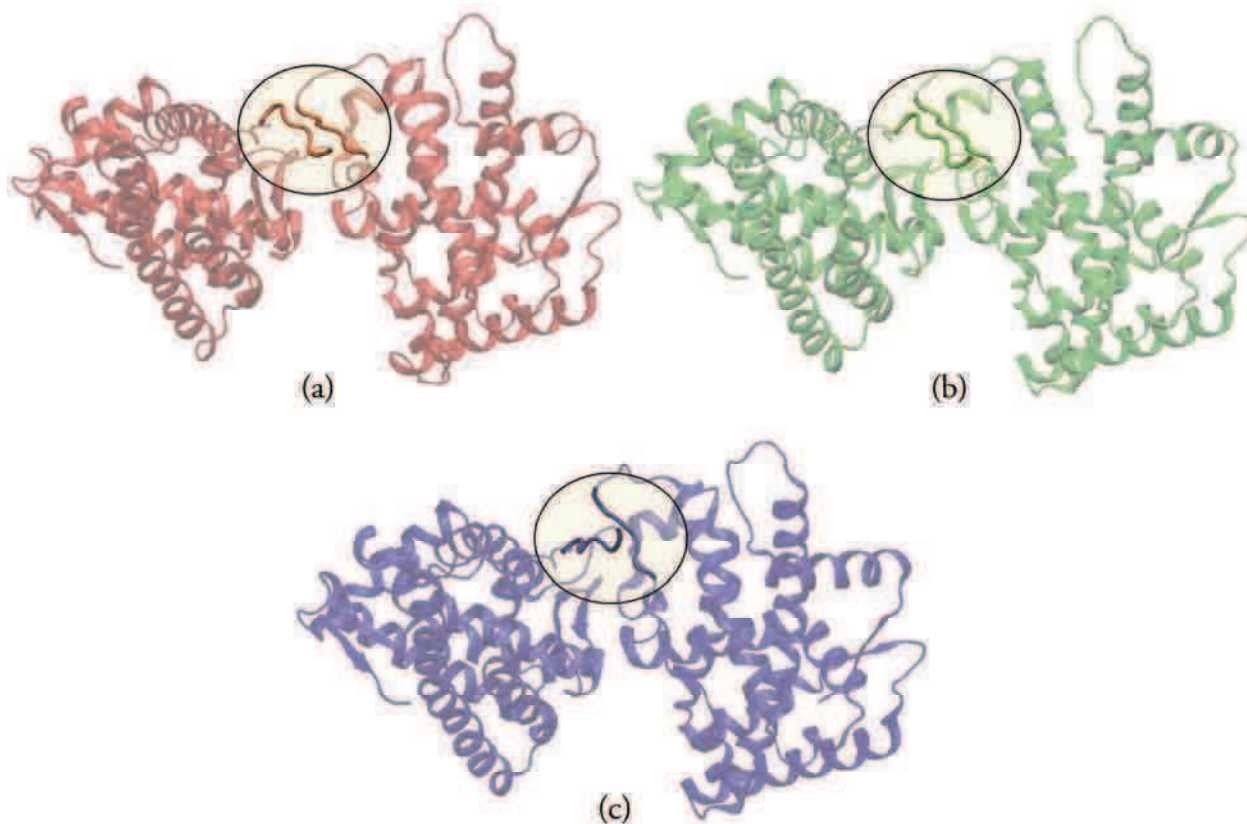
insuficiente para los de un esteroide plano (1, allopregnanolona) que requeriría una distancia superior a 10,9 Å. La síntesis del análogo plano 4 con un puente 11,19-epóxido que resultó con actividad comparable a allopregnanolona, corrobora esa hipótesis ya que su distancia O3-O20 de 11,28 Å estaría en el límite superior del rango de distancias aceptable para un esteroide plano (Ver Fig. 2.20d, pág. 47).

En la segunda parte de esta tesis se estudió la actividad glucocorticoide y las bases moleculares de acción de los análogos de desoxicorticosterona con puente 6,19-epóxido 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP. 21OH-6,19OP fue elegido por ser una antiglucocorticoide específico, lo cual lo hace un compuesto único desde el punto de vista farmacológico. 21HS-6,19OP fue elegido para estudiar por qué la introducción del grupo hemisuccinato provoca un cambio en la actividad, y además porque los ensayos previos mostraron que posee un potente efecto antiapoptótico en timocitos. Se ha intentado dejar en claro que para poder caracterizar el comportamiento biológico de un dado glucocorticoide resulta estrictamente necesario considerar las múltiples formas en que el complejo GR-ligando puede regular la expresión génica. Debido en parte a la forma en que se ha desarrollado el conocimiento sobre el GR, y en parte a la conveniencia de adoptar un modelo sencillo, conceptos extremadamente simplificados sobre el mecanismo molecular de acción han sido aceptados. El modelo disociado y el modelo de antagonismo activo son claros ejemplos de ello. Ambos modelos comparten la característica de intentar explicar la complejidad del modo de acción del GR mediante solo dos posibilidades: transactivación y transrepresión para el modelo disociado y estado activo y estado inactivo para el modelo de antagonismo activo. Sin embargo, el comportamiento de muchos glucocorticoides, entre los que se incluyen 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP, resultan incompatibles con estos modelos sobre la forma de acción del GR. La actividad tejido específica y el antagonismo pasivo necesitan ser explicados mediante modelos más amplios y abarcativos sobre el modo de acción de este sistema ligando-receptor.

El GR es un factor de transcripción activado por ligando que puede regular la expresión génica a través de una gran diversidad de mecanismos. Estos mecanismos no solo dependen del gen, sino también del contexto celular (chaperonas, cofactores, otros factores de transcripción, etc) y de la estructura del ligando. Para comprender cómo cada ligando determina la actividad del GR es preciso investigar los aspectos moleculares involucrados, considerando especialmente el comportamiento dinámico del complejo. La habilidad de medir o simular los cambios dinámicos que ocurren en las proteínas por la unión del ligando es un tema central en el diseño de compuestos bioactivos y particularmente importante en el caso del GR, que ha demostrado una importante flexibilidad interna que le permite acomodar ligandos variados. Con este objetivo, en

este trabajo se utilizó la simulación por MD, técnica computacional que permite evaluar tanto la flexibilidad del ligando como la del receptor.

Realizando simulaciones de 6 ns del GR LBD unido a dex, 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP se observaron importantes cambios en el comportamiento del loop H1-H3, el cual según la estructura cristalina del complejo GR LBD-dex (pdb:1m2z) participa de la homodimerización del receptor, uno de los eventos claves para la transcripción de genes regulados por sitios GRE. Notablemente, los ligandos activos para la transcripción a partir del promotor MMTV (dex y 21HS-6,19OP) producen una conformación similar del loop H1-H3, mientras que el ligando inactivo (21OH-6,19OP) lleva a una conformación notablemente diferente. Si se toman dos estructuras promedio de cada complejo GR-ligando y se superponen con cada uno de los monómeros de la estructura cristalina pdb:1m2z se observa que en el caso de dex y 21HS-6,19OP los loop H1-H3 de cada monómero quedan dispuestos de manera antiparalela, con lo cual podrían interactuar entre sí mediante la formación de puentes de hidrógeno (Fig. 5.2a y b).



**Figura 5.2.** Para cada complejo simulado, GR LBD-dex (a), GR LBD-21HS-6,19OP (b) y GR LBD-21OH-6,19OP, se superpusieron dos estructuras promedio con cada uno de los monómeros de la estructura cristalina pdb:1m2z

En cambio, la presencia de 21OH-6,19OP produce una conformación en la cual los loops H1-H3 quedan de forma aproximadamente perpendicular, imposibilitados de formar puentes de hidrógeno entre sí (Fig. 5.2c). De esta manera surge la hipótesis que establece que las bases moleculares de acción de 21OH-6,19OP podrían residir, al menos en parte, en la incapacidad del complejo GR-21OH-6,19OP para homodimerizar. La aceptación de esta hipótesis permitiría explicar además el rol del grupo hemisuccinato de 21HS-6,19OP en la estabilización de un complejo capaz de homodimerizar y de inducir entonces la transcripción a partir del promotor MMTV.

Los resultados experimentales obtenidos muestran además que 21OH-6,19OP es capaz de actuar como monómero, inhibiendo la actividad del factor de transcripción NFκB. Por lo tanto, 21OH-6,19OP es un ligando que reúne una serie de características que los hacen sumamente interesante desde el punto de vista de su potencial farmacológico. En cuanto a 21HS-6,19OP los resultados obtenidos en los ensayos de apoptosis muestran que la actividad depende fuertemente del tipo celular, lo cual convierte a este análogo rígido en un modular selectivo del receptor de glucocorticoides (SMGR). Si bien las bases moleculares de esta selectividad no han sido investigadas, los resultados de la MD muestran que existen cambios apreciables en la conformación de la hélice H12 que podrían estar vinculados al reclutamiento diferencial de cofactores tejido-específicos. En relación a esto, es necesario considerar que la unión de un ligando al GR no induce simplemente el pasaje de un estado inactivo a otro activo, sino que la hélice H12 es capaz de adquirir muchas posiciones diferentes según la estructura química del ligando.

Los glucocorticoides cumplen muy variadas funciones en el organismo humano, muchas de las cuales son esenciales para la vida. El uso de los glucocorticoides como antiinflamatorios fue descubierto hace muchos años, y desde ese momento constituyen una de las clases de drogas más utilizadas. Actualmente, si bien existen muchos glucocorticoides aprobados en el mercado que son utilizados en una gran cantidad de tratamientos clínicos, los graves efectos secundarios que produce su uso crónico limitan su utilidad. ¿Existe la posibilidad de aumentar los efectos benéficos y al mismo tiempo disminuir los adversos? El conocimiento preciso de las bases moleculares de acción de los glucocorticoides resulta crítico para la obtención de nuevas drogas con el perfil de actividad deseado. Sin embargo, esta investigación debería realizarse en un marco global que considere todos los posibles modos de acción del GR y que tenga en cuenta aquellos aspectos relacionados a la selectividad del tejido.





---

# PARTE EXPERIMENTAL Y MÉTODOS COMPUTACIONALES



## 6.1 Capítulo 2

### *Generalidades*

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros IR se determinaron en un espectrofotómetro FT-IR Magna 550 sobre discos de KBr.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN  $^1\text{H}$ ) y de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) se realizaron en un espectrómetro Bruker AC-200 a 200,13 y 50,32 MHz, respectivamente, o en un espectrómetro Bruker Avance II 500 a 500,13 y 125,77 MHz respectivamente. En todos los casos se utilizó cloroformo deuterado como solvente, en tubos de 5 mm de diámetro. Los desplazamientos químicos para RMN  $^1\text{H}$  se expresan en la escala  $\delta$ , en partes por millón (ppm) respecto del tetrametilsilano utilizado como referencia interna (0,00 ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las señales se indican en cada caso como singulete (s), singulete ancho (sa), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c), quinteto (q), doble doblete (dd), multiplete (m) y doblete ancho (da). Los desplazamientos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  se expresan en ppm utilizando como referencia el pico central correspondiente a la señal del cloroformo deuterado (77,0 ppm)

Las asignaciones completas de los espectros protónicos y de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos descriptos fueron realizadas utilizando una combinación de técnicas mono y bidimensionales. La estrategia básica utilizada consistió en la medición de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , asignando la mayor cantidad de señales posible. El paso siguiente fue la medición de un espectro de correlación heteronuclear (HETCOSY ó HSQC) con desacople  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para obtener los desplazamientos químicos de cada uno de los protones de la región de mayor superposición de señales (0,8-2,4 ppm). La verificación de estas señales se realizó por comparación con los espectros de correlación homonuclear y heteronuclear COSY 45 y HMBC respectivamente. Cuando fue necesario determinar o confirmar la orientación espacial de algún grupo presente en la molécula se recurrió al espectro NOESY o ROESY.

Los espectros de masa por introducción directa se realizaron en un espectrómetro Shimadzu QP-5000, ionizando con impacto electrónico a 70 eV (LANAIS-EMAR, CONICET-FCEN, UBA). Los espectros de masa de alta resolución (EMAR) se realizaron en un espectrómetro ZAB2SE (VG analytical) (UCR Mass Spectrometry Facility, UCLA).

La reacción asistida por microondas fue realizada en un reactor CEM Discover en tubo cerrado con power max habilitado.

Las cromatografías analíticas en capa delgada (CCD) se realizaron utilizando la técnica ascendente en soportes de aluminio (Sílicagel 60 F254, Merck). La detección se hizo por inmersión de las placas en una solución de ácido sulfúrico 20% en etanol o una solución de  $Ce(SO_4)_2$  0,1% p/v y  $Mo_7O_{24}(NH_4)_6$  5 % p/v en  $H_2SO_4$  10% y posterior calentamiento a  $120^\circ C$  o por detección al UV (254 nm).

Las cromatografías en capa delgada preparativas para muestras de hasta 25 mg se realizaron en cromatoplasmas para CCD en soporte de aluminio (Sílicagel 60 F254, Merck).

Las cromatografías flash en columna se realizaron utilizando sílicagel (Sílicagel 60, malla 230-400 Merck o Florisil) y aplicando presión de nitrógeno para acelerar el paso del solvente de elución, el cual se indica en cada caso.

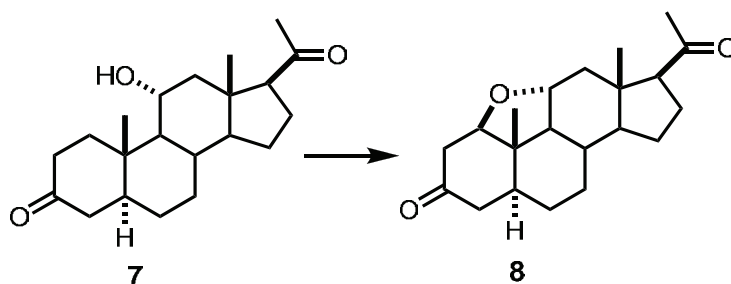
Las cromatografías flash en columna seca se realizaron utilizando sílicagel (Sílicagel 60 G, Merck) empleando embudos con placas filtrantes de vidrio sinterizado y haciendo vacío para acelerar el paso del solvente de elución, el cual se indica en cada caso.

Las muestras para microanálisis fueron secadas a  $60^\circ C$  en vacío durante dos horas con pentóxido de fósforo como agente desecante.

Todos los solventes utilizados se purificaron previamente por destilación. Los solventes anhidros se destilaron bajo atmósfera de nitrógeno. *Diclorometano*: se secó sobre pentóxido de fósforo durante 18 hs y se destiló recogiéndolo sobre tamices moleculares de 3 Å. *Tetrahidrofurano*: se dejó 18 hs sobre hidruro de calcio, se reflujo sobre sodio con benzofenona hasta que adquirió una coloración azul y se destiló inmediatamente antes de usar. *Dimetilformamida*: se dejó 18 hs sobre hidruro de calcio, se destiló a presión reducida y se guardó sobre tamices moleculares de 3 Å.

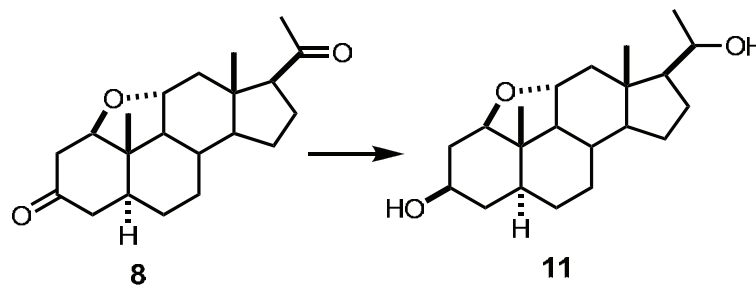
### Síntesis del análogo 1

#### • $1\beta,11\alpha$ -Epoxi- $5\alpha$ -pregnano-3,20-diona (8)



La  $1\beta,11\alpha$ -epoxi- $5\alpha$ -pregnan-3,20-diona (8) se preparó a partir de  $11\alpha$ -hidroxiprogesterona según la técnica descrita por Veleiro A. S. *et al* [20].

• 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Epoxi-5 $\alpha$ -pregnano-3,20-diol (11)

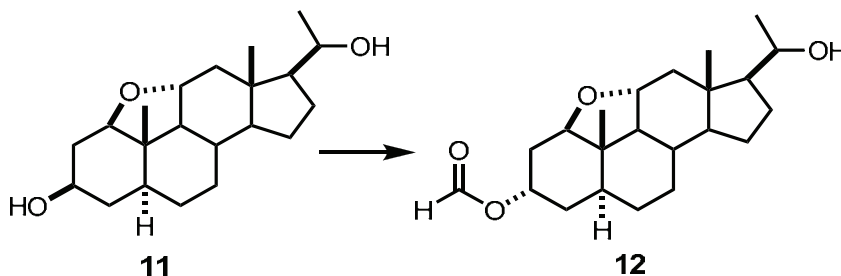


A una solución del compuesto **8** (73 mg, 0,22 mmol) en diclorometano (1,7 ml) y metanol (1,7 ml) a temperatura ambiente se le agregó NaBH<sub>4</sub> (14 mg, 0,37 mmol) y se agitó durante 90 min. La mezcla de reacción se acidificó con HCl 1M hasta pH 6 y se concentró al tercio del volumen. A este residuo se le agregó agua y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílica gel, diclorometano/metanol 20:1) obteniéndose el compuesto **11** (59 mg, 80%).

**RMN <sup>1</sup>H** (500,13 MHz): 4,00 (1H, m, H-3); 3,79 (1H, m, H-11); 3,68 (1H, m, H-20); 3,60 (1H, dd, J = 12,1 y 5,7 Hz, H-1); 2,60 (1H, m, H-12 $\beta$ ); 2,10 (1H, m, H-2 $\beta$ ); 1,77 (1H, s, H-4 $\beta$ ); 1,66 (1H, m, H-2 $\alpha$ ); 1,43 (1H, m, H-17); 1,35 (1H, m, H-4 $\alpha$ ); 1,15 (1H, m, H-12 $\alpha$ ); 1,14 (3H, d, J = 6,2 Hz H-21); 0,94 (3H, s, H-19); 0,78 (3H, s, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C** (125,77 MHz): 84,9 (C-1); 75,3 (C-11); 70,1 (C-20); 68,3 (C-3); 64,4 (C-9); 58,1 (C-14); 56,7 (C-17); 47,5 (C-13); 44,0 (C-12); 41,2 (C-5); 38,0 (C-10); 36,2 (C-2 o C-4); 34,3 (C-4 or C-2); 32,4 (C-6); 31,4 (C-8); 26,8 (C-7 o C-16); 26,7 (C-16 o C-7); 23,8 (C-21); 22,8 (C-15); 16,2 (C-19); 13,6 (C-18).

• 3 $\alpha$ -Formiloxi-1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -epoxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ol (12)



A una solución del compuesto **11** (59 mg, 0,17 mmol), trifenilfosfina (131 mg, 0,35 mmol) y ácido fórmico (16 mg, 0,35 mmol) en THF anhidro (2,1 ml) se le agregó gota a gota una solución de DEAD (61 mg, 0,35 mmol) en THF anhidro (0,32 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 hs y luego se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 6:4) obteniéndose el compuesto **12** (38 mg, 60%) como sólido blanco.

**Punto de fusión:** 156-157 °C (acetato de etilo).

**IR** (KBr): 3418, 2862, 1722, 1413, 1207  $\text{cm}^{-1}$ .

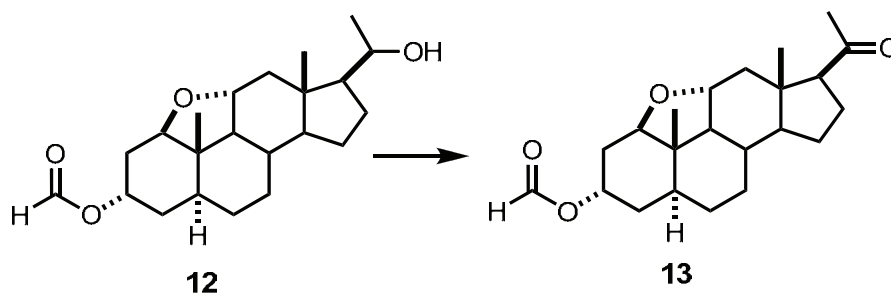
**RMN  $^1\text{H}$**  (500,13 MHz): 8,00 (1H, s, formiato); 5,44 (1H, m, H-3); 3,91 (1H, dd,  $J = 11,8$  y 5,7 Hz, H-1); 3,79 (1H, m, H-11); 3,69 (1H, m, H-20); 2,61 (1H, dd,  $J = 11,4$  y 4,9 Hz, H-12 $\beta$ ); 2,16 (1H, m, H-2 $\beta$ ); 2,06 (1H, s, H-4 $\beta$ ); 1,67 (1H, m, H-2 $\alpha$ ); 1,42 (1H, m, H-17); 1,24 (1H, m, H-4 $\alpha$ ); 1,15 (1H, m, H-12 $\alpha$ ); 1,14 (3H, d,  $J = 6,2$  Hz, H-21); 0,92 (3H, s, H-19); 0,77 (3H, s, H-18).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (125,77 MHz): 160,0 (formiato); 82,6 (C-1); 74,7 (C-11); 70,9 (C-3); 70,1 (C-20); 64,3 (C-9); 58,1 (C-14); 56,6 (C-17); 47,4 (C-13); 44,0 (C-12); 42,7 (C-5); 38,0 (C-10); 32,4 (C-6); 31,4 (C-8); 31,2 (C-2 y C-4); 26,8 (C-7 o C-16); 26,6 (C-16 o C-7); 23,8 (C-21); 22,8 (C-15); 15,5 (C-19); 13,6 (C-18).

**EM:**  $m/z$  362 ( $M^+$ , 1), 316 (7), 283 (5); 270 (8); 229 (19); 43 (100).

**EMAR:**  $m/z$  [ $M^+$ ] 362,2451 (calculado 362,2457).

• **3 $\alpha$ -Formiloxi-1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -epoxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (13)**



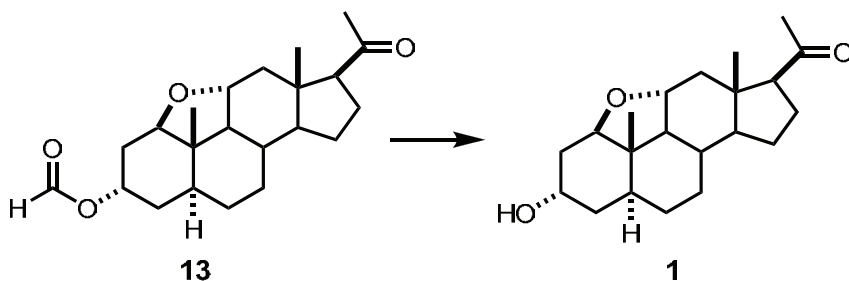
A una mezcla de PCC (95 mg, 0,51 mmol), carbonato de bario (39 mg, 0,28 mmol) y tamiz molecular de 3 Å (76 mg) en diclorometano seco (3,8 ml) bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, se le agregó una solución del compuesto **12** (38 mg, 0,105 mmol) en diclorometano seco (2,5 ml), y se continuó la agitación. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min, se diluyó con éter y se filtró por un lecho de florisil y acetato de etilo/hexano 8:2. Por

evaporación del solvente se obtuvo un sólido que fue purificado por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 1:1) obteniéndose el compuesto **13** (38 mg, 60%).

**RMN <sup>1</sup>H** (500,13 MHz): 8,00 (1H, s, formiato); 5,45 (1H, m, H-3); 3,93 (1H, dd, J = 11,8 y 6,0 Hz, H-1), 3,77 (1H, m, H-11); 2,64 (1H, t, J = 9,0 Hz, H-17); 2,41 (1H, dd, J = 11,0 y 5,0 Hz, H-12β); 2,16 (1H, m, H-2β); 2,13 (3H, s, H-21); 2,06 (1H, s, H-4β); 1,66 (1H, m, H-2α); 1,23 (1H, m, H-4α); 1,15 (1H, m, H-12α); 0,92 (3H, s, H-19), 0,66 (3H, s, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C** (125,77 MHz): 209,2 (C-20); 160,4 (formiato); 82,8 (C-1); 74,1 (C-11); 70,9 (C-3); 64,4 (C-9); 61,5 (C-17); 58,8 (C-14); 48,4 (C-13); 43,0 (C-12); 42,7 (C-5); 38,0 (C-10); 32,3 (C-6); 31,9 (C-8); 31,2 (C-2 o C-4); 31,1 (C-4 o C-2); 26,5 (C-7); 24,4 (C-16); 23,8 (C-21); 22,8 (C-15); 15,5 (C-19); 14,5 (C-18).

· **3α-hidroxi-1β,11α-epoxi-5α-pregnan-20-ona (1)**



A una solución del compuesto **13** (29 mg, 0,079 mmol) en metanol (2,2 ml) se le agregó una solución de KHCO<sub>3</sub> (82,1 mg) en metanol (1,2 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min, se neutralizó con HCl 1M y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 4:6) obteniéndose el análogo **1** (19,6 mg, 75 %) como sólido blanco.

**Punto de fusión:** 169-169 °C (metanol).

**IR** (KBr): 3410, 2890, 1715, 1425, 1029 cm<sup>-1</sup>.

**RMN <sup>1</sup>H** (500,13 MHz): 4,42 (1H, sa, W1/2 8,5 Hz, H-3); 4,03 (1H, dd, J = 11,8 y 5,7 Hz, H-1); 3,77 (1H, ddd, J = 11,0, 10,5 y 4,8 Hz, H-11); 2,65 (1H, t, J = 8,2 Hz, H-17); 2,42 (1H, dd, J = 11,0 y 4,8 Hz, H-12β); 2,24 (1H, m, H-16β); 2,12 (3H, s, H-21); 2,08 (1H, m, H-2α); 1,94 (1H, m, H-4β); 1,93 (2H, m, H-6); 1,87 (1H, m, H-5); 1,71 (2H, m, H-15α y H-16α); 1,65 (1H, m, H-8); 1,63 (1H, m, H-2β); 1,54 (2H, m, H-7); 1,35 (1H, m, H-12α); 1,27 (1H,



m, H-14); 1,23 (1H, m, H-15 $\beta$ ); 1,19 (1H, m, H-4 $\alpha$ ); 0,97 (1H, m, H- 9); 0,94 (3H, s, H-19); 0,64 (3H, s, H-18).

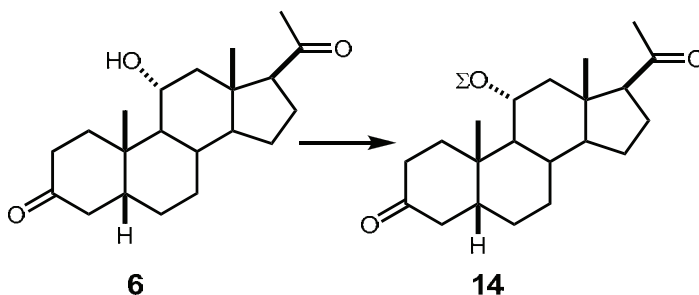
RMN  $^{13}\text{C}$  (125,77 MHz): ver Capítulo 2, pág. 26.

EM: m/z 332 ( $\text{M}^+$ , 3), 314 (5), 299 (2), 271 (2); 244 (8); 159 (12); 43 (100).

EMAR: m/z [ $\text{M}^+$ ] 332,2353 (calculado 332,2351).

### Síntesis del análogo 2

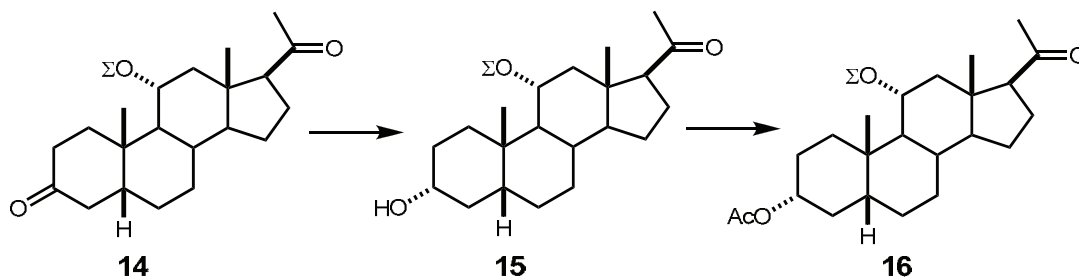
#### • 11 $\alpha$ -t-Butildimetilsililoxi-5 $\beta$ -pregnan-3,20-diona (14)



A una solución de **6** (390 mg, 1,18 mmol) en DMF anhidro (6 ml) se le agregaron sucesivamente imidazol (470 mg, 6,90 mmol) y TBDMSCl (700 mg, 4,64 mmol). La mezcla se agitó a 50 °C durante 3 hs bajo atmósfera de nitrógeno, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se extrajo con éter etílico. La fase orgánica se lavó con solución saturada de cloruro de sodio y luego con agua, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 3:7) obteniéndose el compuesto **14** (262 mg, 50%).

RMN  $^1\text{H}$  (200,13 MHz): 4,08 (1H, m, H-11); 2,60 (1H, m, H-17); 2,12 (3H, s, H-21); 1,11 (3H, s, H-19); 0,89 (9H, s, *t*-butil-Si); 0,63 (3H, s, H-18); 0,10 (6H, s,  $\text{CH}_3$ -Si); 0,09 (6H, s,  $\text{CH}_3$ -Si).

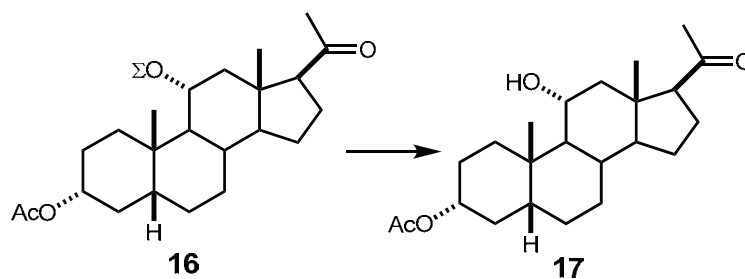
• **3 $\alpha$ -Acetoxi-11 $\alpha$ -*t*-butildimetilsililoxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (16)**



A una solución del compuesto **14** (262 mg, 0,59 mmol) en diclorometano (5,3 ml) y metanol (5,3 ml) a temperatura ambiente, se le agregó  $\text{NaBH}_4$  (22,4 mg, 0,59 mmol) y se agitó durante 30 min. La mezcla de reacción se acidificó con HCl 1M hasta pH 6 y se concentró al tercio del volumen. A este residuo se le agregó agua y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó el solvente. El sólido resultante se trató con anhídrido acético (1,87 ml) y piridina (1,87 ml) durante 23 horas a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano, se lavó con HCl 1M y luego con agua y la fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Una vez evaporado el solvente, el sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, hexano/acetato de etilo 7:3 $\rightarrow$ 1:1) obteniéndose el compuesto **16** (212 mg, 73%).

RMN  $^1\text{H}$  (200,13 MHz): 4,78 (1H, m, H-3); 3,94 (1H, m, H-11); 2,60 (1H, m, H-17); 2,13 (3H, s, H-21); 2,04 (3H, s, acetato); 1,08 (3H, s, H-19); 0,89 (9H, s, *t*-butil-Si); 0,64 (3H, s, H-18); 0,10 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -Si); 0,09 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -Si).

• **3 $\alpha$ -Acetoxi-11 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (17)**



En un recipiente de teflón se disolvió el compuesto **16** (212mg, 0,43 mmol) en una mezcla de THF (5 ml) y acetonitrilo (5,5 ml). Sobre esta solución se agregó ácido fluorhídrico 40 % (4,4 ml) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla de reacción se neutralizó con  $\text{KHCO}_3$  5%, se diluyó con agua destilada y se extrajo con acetato de etilo. La

fase orgánica se lavó con agua, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 4:6) obteniéndose el compuesto **17** (140 mg, 85%) como sólido blanco.

**Punto de fusión:** 140-141 °C (acetato de etilo/hexano).

**IR** (KBr): 3410, 2880, 1715, 1420, 1130  $\text{cm}^{-1}$ .

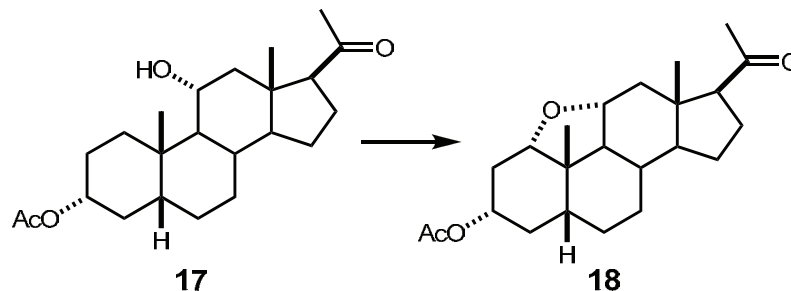
**RMN  $^1\text{H}$**  (200,13MHz): 4,78 (1H, m, H-3); 3,92 (1H, m, H-11); 2,55 (1H, m, H-17); 2,14 (3H, s, H-21); 2,04 (3H, s, acetato); 1,05 (3H, s, H-19); 0,61 (3H, s, H-18).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (50,32 MHz): 209,6 (C-20); 171,0 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 74,5 (C-3); 69,0 (C-11); 63,4 (C-17); 55,6 (C-14); 50,7 (C-12); 47,1 (C-9); 44,2 (C-13); 43,4 (C-5); 37,9 (C-4 o C-1); 35,8 (C-10); 34,7 (C-8); 32,6 (C-1 o C-4); 31,4 (C-21); 27,6 (C-2 o C-6); 27,3 (C-6 o C-2); 26,1 (C-7); 24,4 (C-16); 23,7 (C-15); 22,9 (C-19); 21,4 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 14,4 (C-18).

**EM:** m/z 376 ( $\text{M}^+$ , 2), 358 (1), 316 (6); 298 (36); 283 (15); 255 (23), 43 (100).

**Microanálisis:**  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_4$ . Calculado: C 73,37%, H 9,64%. Encontrado: C 73,76%, H 9,90%.

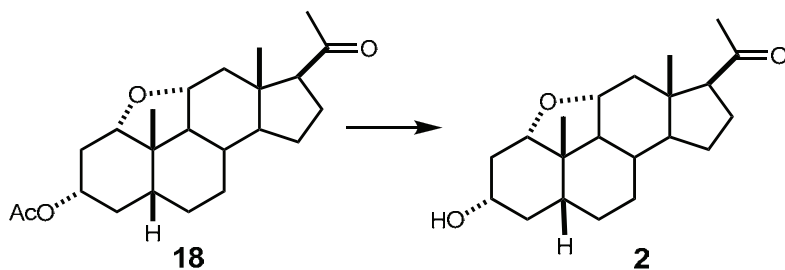
• **3 $\alpha$ -Acetoxi-1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (18)**



A una solución del compuesto **17** (140 mg, 0,37 mmol) en diclorometano recientemente destilado (33 ml) se le agregó DAIB (145 mg, 0,45 mmol) y yodo (93,8 mg, 0,37 mmol). La mezcla de reacción fue vigorosamente agitada a 25 °C e irradiada con lámpara de tungsteno de 300W (5000 lm) durante 20 min. La solución se lavó con solución de tiosulfato de sodio, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (florisil, acetato de etilo/hexano 6:4) obteniéndose el compuesto **18** (112 mg, 80%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (200,13 MHz): 4,67 (1H, m, H-3); 3,99 (1H, dd,  $J = 7.0$  y  $8.0$  Hz, H-1); 3,91 (1H, m, H-11); 2,68 (1H, m, H-17); 2,14 (3H, s, H-21); 2,03 (3H, s, acetato); 1,09 (3H, s, H-19); 0,66 (3H, s, H-18).

· 3 $\alpha$ -Hidroxi-1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (2)



Al compuesto **18** (112 mg, 0,30 mmol) se le agregó una solución de  $K_2CO_3$  (50 mg) en metanol (10 ml) y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue neutralizada con HCl 1M y extraída con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con  $Na_2SO_4$  y se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 4:6) obteniéndose el análogo **2** (80 mg, 80%) como sólido blanco.

**Punto de fusión:** 150-151 °C (metanol).

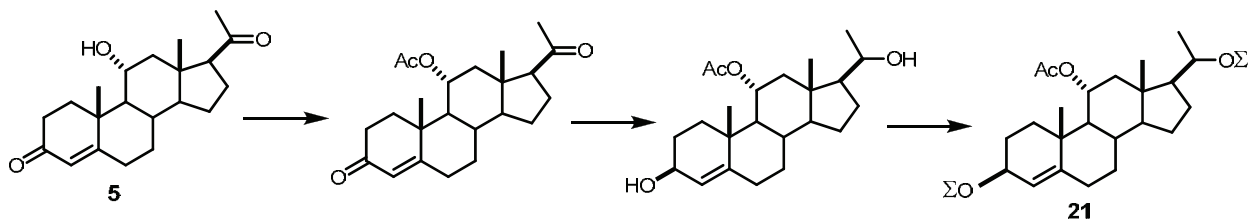
**IR** (KBr): 3413, 2856, 1724, 1357, 1035  $cm^{-1}$ .

**RMN  $^1H$**  (500,13 MHz): 3,95 (1H, dd,  $J = 9,3$  y  $7,5$  Hz, H-1); 3,90 (1H, dt,  $J = 11,0$ ,  $11,0$  y  $4,3$  Hz, H-11); 3,59 (1H, m,  $W_{1/2} = 30,0$  Hz, H-3); 2,63 (1H, t,  $J = 9,0$  Hz, H-17); 2,48 (1H, dd,  $J = 11,0$  y  $4,3$  Hz, H-12 $\beta$ ); 2,30 (1H, m, H-2 $\alpha$ ); 2,14 (3H, s, H-21); 2,06 (1H, m, H-16 $\beta$ ); 1,89 (1H, m, H-5); 1,86 (2H, m, H-7 $\beta$ ); 1,77 (1H, m, H-16 $\alpha$ ); 1,71 (1H, m, H-15 $\alpha$ ); 1,67 (1H, m, H-6 $\alpha$ ); 1,61 (2H, m, H-4); 1,47 (1H, m, H-7 $\alpha$ ); 1,43 (1H, m, H-8); 1,41 (1H, m, H-9); 1,40 (1H, m, H-2 $\beta$ ); 1,38 (1H, t,  $J = 11,0$  Hz, H-12 $\alpha$ ); 1,28 (1H, m, H-14); 1,23 (1H, m, H-15 $\beta$ ); 1,07 (3H, s, H-19); 1,01 (1H, m, H-6 $\beta$ ); 0,64 (3H, s, H-18).

**RMN  $^{13}C$**  (125,77 MHz): ver Capítulo 2, pág. 28

**EM:**  $m/z$  332 ( $M^+$ , 46), 314 (68), 299 (18), 271 (26); 244 (78); 159 (100).

**EMAR**  $m/z$  [ $M^+$ ] 332,2345 (calculado 332,2351).

*Síntesis del análogo 3**Obtención del intermediario 19*• 11 $\alpha$ -Acetoxi-3 $\beta$ ,20-bis(t-butildimetilsililoxi)-4-pregнено (21)

11 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona (5) (500 mg, 1,52 mmol) se trató con anhídrido acético (3,5 ml) y piridina (3,5 ml) durante 2 hs a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó con HCl 1M y luego con agua, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el solvente obteniéndose el 11-acetoxiesteroide (535 mg, 95%).

**RMN <sup>1</sup>H** (200,13 MHz): 5,76 (1H, s, H-4); 5,25 (1H, m, H-11); 2,50 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-17); 2,11 (3 H, s, H-21); 2,04 (3H, s, acetato); 1,26 (3H, s, H-19); 0,73 (3H, s, H-18).

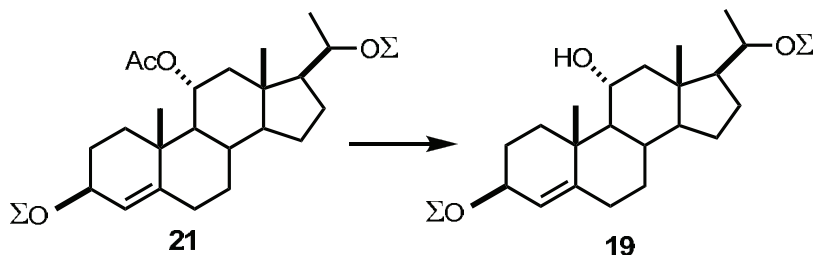
El compuesto anterior (535 mg, 1,44 mmol) disuelto en una mezcla de diclorometano (11 ml) y metanol (11 ml) fue reducido con NaBH<sub>4</sub> (77 mg, 2,41 mmol) a temperatura ambiente durante 90 min siguiendo la metodología utilizada para la obtención del compuesto 11. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, diclorometano/metanol 20:1) obteniéndose el 3,20-diol (447 mg, 83%).

**RMN <sup>1</sup>H** (200,13 MHz): 5,35 (1H, s, H-4); 5,24 (1H, m, H-11); 4,14 (1H, m, H-3); 3,71 (1H, m, H-20); 1,98 (3H, s, acetato); 1,15 (3H, s, H-19); 1,12 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-21); 0,83 (3H, s, H-18).

El compuesto anterior (200 mg, 0,53 mmol) fue sililado a temperatura ambiente durante 45 min utilizando el procedimiento empleado para la obtención del compuesto 14: DMF anhidro (6,46 ml), imidazol (53 mg, 0,81 mmol) y TBDMSCl (81 mg, 0,54 mmol). El sólido resultante fue purificado por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 0,1:4) obteniéndose el compuesto 21 (161 mg, 50%).

**RMN <sup>1</sup>H** (200,13 MHz): 5,29 (1H, s, H-4); 5,18 (1H, m, H-11); 4,15 (1H, m, H-3); 3,71 (1H, m, H-20); 1,96 (3H, s, acetato); 1,12 (3H, s, H-19); 1,03 (3H, d, J = 7,0 Hz, H-21); 0,90 (9H, s, *t*-butil-Si); 0,88 (3H, s, H-18); 0,12 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si).

· **3β,20-bis(*t*-butildimetilsililoxi)-11α-hidroxi-4-pregнено (19)**



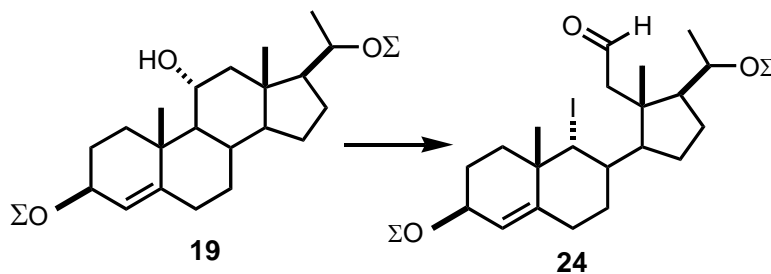
A una solución de **21** (150 mg, 0,25 mmol) en THF (13,0 ml) y metanol (13,0 ml) se agregaron 2,2 ml de una solución acuosa de KOH 5%. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 hs, se neutralizó con HCl 2N y se concentró al décimo de su volumen original. Luego de agregar agua, el residuo se extrajo con diclorometano. El sólido resultante fue purificado por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 80:1,5) obteniéndose el compuesto **19** (87 mg, 63%).

**RMN <sup>1</sup>H** (200,13 MHz): 5,26 (1H, s, H-4); 4,17 (1H, m, H-3); 3,93 (1H, m, H-11); 3,72 (1H, m, H-20); 1,19 (3H, s, H-19); 1,07 (3H, d, J = 7,0 Hz, H-21); 0,90 (9H, s, *t*-butil-Si); 0,89 (3H, s, H-18); 0,07 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si).

**EM:** m/z 562 (M<sup>+</sup>, 2), 281 (16), 159 (85), 119 (70); 103 (31); 75 (100).

**EMAR** m/z [M<sup>+</sup>] 562,4237 (calculado 562,5328).

· **3β,20- bis(*t*- butildimetilsililoxi)-9α-iodo-11-oxo-9,11-seco-4-pregнено**



Sobre una solución del compuesto **19** (25 mg, 0,044 mmol) en diclorometano recientemente destilado (5 ml) se realizó la reacción de hipiodito durante 2 horas utilizando el mismo procedimientos empleado para la obtención del compuesto **18**: DAIB (17 mg, 0,052 mmol) e iodo (11 mg, 0,044 mmol). El sólido resultante se purificó por cromatografía en columna (florisil, acetato de etilo/hexano 9:1) obteniéndose el compuesto **24** como un sólido amorfo (5 mg, 16 %).

**RMN <sup>1</sup>H** (500,13 MHz): 9,98 (1H, dd, J = 4,3 y 1,2 Hz, H-11); 5,40 (1H, sa, H-4); 4,40 (1H, as, H-9); 4,21 (1H, m, H-3); 3,81 (1H, m, H-20); 3,12 (1H, dd, J = 14,2 y 1,2, H-12b); 2,29 (1H, dd, J = 14,2 y 4,4, H-12a); 1,42 (1H, s, H-19); 1,13 (3H, d, J = 6,0 Hz, H-21); 0,90 (9H, s, *t*-butil-Si); 0,84 (3H, s, H-18); 0,08 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si).

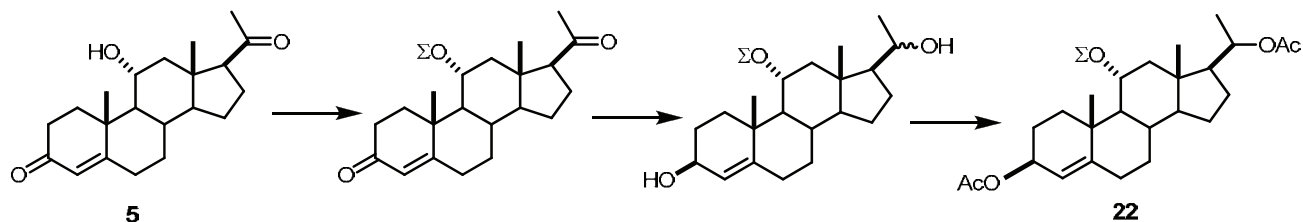
**RMN <sup>13</sup>C** (125,77 MHz): 204,8 (C-11); 138,4 (C-5); 129,1 (C-4); 71,6 (C-3); 70,0 (C-20); 68,3 (C-9); 53,1 (C-17); 52,2 (C-14); 50,1 (C-12); 46,9 (C-13); 41,8 (C-10); 39,6 (C-1); 35,8 (C-8); 30,9 (C-7); 30,0 (C-6); 29,6 (C-2); 26,1 y 25,8 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-Si); 25,0 (C-16); 24,6 (C-19); 23,9 (C-21); 22,9 (C-15); 18,3 y 18,1 (C-Si); 16,1 (C-18); -3,6, -3,8, -4,4 y -4,6 (CH<sub>3</sub>C-Si).

**EM**: m/z 688 (M<sup>+</sup>, 0,5), 503 (9), 371 (4), 295 (5); 159 (43); 75 (100).

**EMAR** m/z [(M-I)<sup>+</sup>] 561.4177 (calculado 561.4154).

#### Obtención del intermediario 20

#### • 3β,20-Diacetoxi-11α-*t*-butildimetilsililoxi-4-pregнено (22)



11α-Hidroxiprogesterona (**5**) (1000 mg, 3,03 mmol) fue sililada a 50 °C durante 3 h utilizando el procedimiento empleado para la obtención del compuesto **14**: DMF anhidro (15,8 ml), imidazol (593 mg, 9,07 mmol) y TBDMSCl (907 mg, 6,05 mmol). El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano de 2:8 →4:6) obteniéndose el 11-*t*-butilsililoxi esteroide (753 mg, 56%).

**RMN <sup>1</sup>H** (200,13 MHz): 5,72 (1H, s, H-4); 4,11 (1H, m, H-11); 2,12 (3H, s, H-21); 1,27 (3H, s, H-19); 0,90 (9H, s, *t*-butil-Si); 0,68 (3H, s, H-18); 0,12 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (50,32 MHz): 209,6 (C-3); 200,3 (C-20); 171,3 (C-4); 124,2 (C-5); 70,2 (C-11); 63,1 (C-17); 58,5 (C-9); 55,3 (C-14); 50,0 (C-12); 43,9 (C-13); 39,6 (C-10); 36,9 (C-1); 34,9 (C-8); 33,8 (C-2); 33,3 (C-6); 31,6 (C-7); 31,1 (C-21); 26,1(( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>C-Si); 24,11 (C-15); 22,7 (C-16); 18,2 (C-19); 18,1(C-Si); 14,4 (C-18); -3.01 y -3.06 ( $\text{CH}_3\text{C-Si}$ ).

**EM:** m/z 444 ( $\text{M}^+$ , 0,7), 387 (56), 75 (60), 43 (100).

El compuesto anterior (750 mg, 1,69 mmol) disuelto en una mezcla de diclorometano (12,8 ml) y metanol (12,8 ml) se trató con  $\text{NaBH}_4$  (86,2 mg, 2,71 mmol) a temperatura ambiente durante 1 h siguiendo la metodología utilizada para la obtención del compuesto **11**, obteniéndose la mezcla de alcoholes epímeros  $20\alpha$  y  $20\beta$  (1:9) (643 mg, 85%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (200,13 MHz) epímero  $20\beta$ : 5,31 (1H, s, H-4); 4,10 (1H, m, H-3); 4,04 (1H, m, H-11); 3,69 (1H, m, H-20); 1,15 (3H, s, H-19); 1,12 (3H, d, J = 7,0 Hz, H-21); 0,88 (9H, s, *t*-butil-Si); 0,78 (3H, s, H-18); 0,08 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (50,32 MHz): 147,50 (C-5); 124,6 (C-4); 70,5 (C-3 o C-20); 70,2 (C-3 o C-20); 67,6 (C-11); 59,6 (C-17); 58,2 (C-9); 54,9 (C-14); 51,2 (C-12); 42,7 (C-13); 38,5 (C-10); 36,8 (C-1); 35,1 (C-8); 33,0 (C-6); 32,8 (C-7); 29,3 (C-2); 26,2 (( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>C-Si); 25,5 (C-15 o C-16); 24,42 (C-15 o C-16); 23,7 (C-21); 19,6 (C-19); 18,2(C-Si); 13,5 (C-18); -3.02 y -3.06 ( $\text{CH}_3\text{C-Si}$ ).

**EM:** m/z 448 ( $\text{M}^+$ , 1,2), 299 (14), 281 (60), 173 (38), 75 (100).

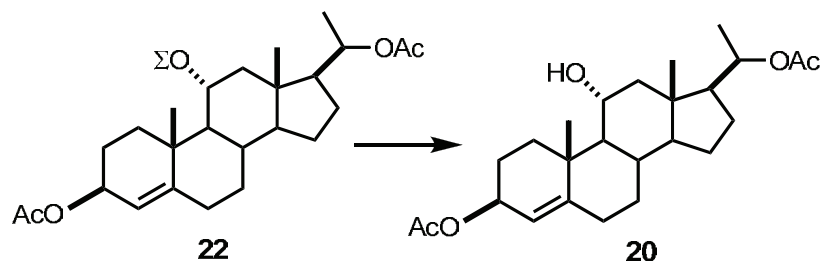
El compuesto anterior (640 mg, 1,43 mmol) se trató con anhídrido acético (3 ml) y piridina (3 ml) durante 14 hs a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó con HCl 1M y luego con agua, la fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 2:8) obteniéndose el compuesto **21** (686 mg, 90%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (500,13 MHz): 5,26 (1H, s, H-4); 5,22 (1H, m, H-3); 4,77 (1H, m, H-20); 4,03 (1H, m, H-11); 2,05 (6H, s, acetato); 1,16 (3H, s, H-19); 1,14 (3H, d, J = 7,0 Hz, H-21); 0,88 (9H, s, *t*-butil-Si); 0,67 (3H, s, H-18); 0,08 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ).

**EM:** m/z 532 ( $\text{M}^+$ , 0,8), 281 (45), 173 (38), 75 (40), 43 (100).



• 3 $\beta$ ,20-Diacetoxi-11 $\alpha$ -hidroxi-4-pregнено (20)



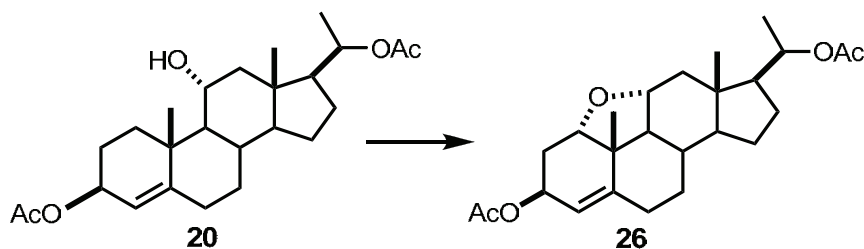
A una solución del compuesto **22** (680 mg, 1,27 mmol) en THF anhidro (22 ml) se le agregó Bu<sub>4</sub>NF (942 mg, 3,6 mmol) y se agitó durante 4 hs a 60°C. Luego de la evaporación del solvente el sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 2:8→3:7) para obtener el compuesto **20** (478 mg, 90%)

RMN <sup>1</sup>H (200,13 MHz): 5,28 (1H, s, H-4); 5,23 (1H, m, H-3); 4,83 (1H, m, H-20); 3,93 (1H, m, H-11); 2,05 (6H, s, acetato); 1,20 (3H, s, H-19); 1,14 (3H, d, J = 6,8 Hz, H-21); 0,67 (3H, s, H-18).

EM: m/z 400 ((M-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 2), 358 (9), 166 (18), 124 (23), 43 (100).

EMAR m/z [M- H<sub>2</sub>O<sup>+</sup>] 400,2616 (calculado 400,2614).

• 3 $\beta$ ,20-Diacetoxi-1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxi-4-pregнено (26)



A una solución del compuesto **20** (25 mg, 0,06 mmol) en diclorometano recientemente destilado (5 ml) se le agregó DAIB (22,8 mg, 0,072 mmol) e yodo (15,1 mg, 0,06 mmol). La mezcla de reacción se sometió a irradiación con microondas (300W, 120 °C, 250 psi) durante 15 minutos. La solución se lavó con solución de tiosulfato de sodio, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (Florisil, acetato de etilo/hexano 1:9→2:8) obteniéndose el compuesto **26** (15 mg, 60 %).

**Punto de fusión:** 159-160 °C (acetato de etilo).

**RMN <sup>1</sup>H** (500,13 MHz): 5,64 (1H, dd, J = 6.0 y 1,5 Hz, H-4); 5,09 (1H, m, H-3); 4,81 (1H, m, H-20); 4,24 (1H, dd, J = 10,8 y 6,8 Hz, H-1); 3,97 (1H, dt, J = 4.8 y 11.0 Hz, H-11); 2,38 (1H, m, H-6β); 2,32 (1H, m, H-2α); 2,31 (1H, m, H-12β); 2,13 (1H, m, H-6α); 2,01 (3H, s, acetato); 1,98 (1H, s, H-7α); 1,85 (1H, m, H-16α); 1,71 (1H, m, H-9); 1,69 (1H, m, H-17); 1,67 (1H, m, H-15α); 1,65 (1H, m, H-8); 1,59 (1H, m, H-2β); 1,35 (1H, m, H-16β); 1,19 (1H, s, H-19); 1,18 (2H, m, H-14 y H-15β); 1,16 (1H, m, H-12α); 1,14 (3H, d, J = 6.0 z, H-21); 1,08 (1H, m, H-17); 1,00 (1H, m, H-7β); 0,69 (3H, s, H-18).

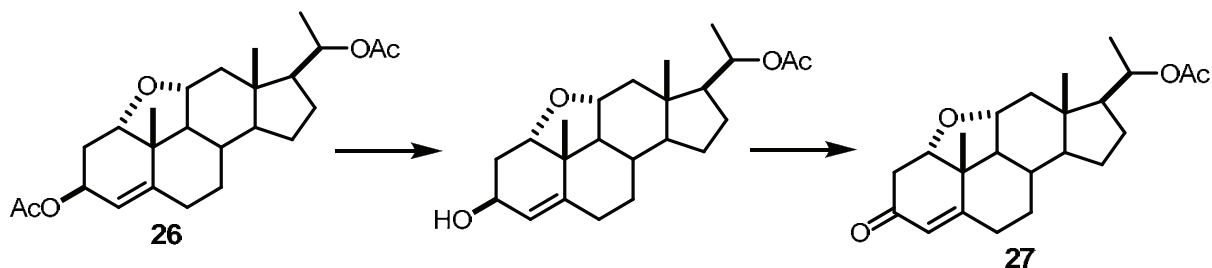
**RMN <sup>13</sup>C** (125,77 MHz): ver Capítulo 2, pág. 33.

**EM:** m/z 416 (M<sup>+</sup>, 0,6), 374 (6), 296 (7), 199 (12), 122 (22), 43 (100).

**EMAR** m/z [M<sup>+</sup>] 417,2641 (calculado 416,2563).

*Síntesis del análogo 3 a partir del intermediario 26*

• 20-Acetoxy-1α,11α-epoxi-4-pregnen-3-ona (27)



A una solución de **26** (150 mg, 0,361 mmol) en THF (9,0 ml) y metanol (9,0 ml) se le agregaron 1,5 ml de una solución acuosa de KOH 5%. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 hs, se neutralizó con HCl 2N y se concentró en vacío al décimo de su volumen original. Luego de agregar agua, el residuo se extrajo con diclorometano y el sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 7:3) obteniéndose el 3-hidroxi esteroide (93 mg, 69%).

**RMN <sup>1</sup>H** (500.13 MHz): 5,64 (1H, dd, J = 6,3 y 1,6 Hz, H-4); 4,81 (1H, m, H-20); 4,35 (1H, dd, J = 10,9 y 6,9 Hz, H-1); 4,20 (1H, m, H-3); 3,95 (1H, td, J = 11,0 y 4,8 Hz, H-11); 2,37 (1H, m, H-6α); 2,34 (1H, m, H-2α); 2,31 (1H, m, H-12α); 2,11 (1H, m, H-6β); 2,01 (3H, s, acetato); 1,99 (1H, m, H-7α); 1,82 (1H, m, H-16α); 1,69 (1H, m, H-17); 1,65 (2H, m, H-8 y H-15α), 1,50 (1H, m, H-2β); 1,33 (1H, m, H-16β); 1,21 (1H, s, H-19); 1,14 (3H, d, J = 6,0 z, H-21); 1,14 (1H, m, H-12β); 1,17 (1H, m, H-14); 1,06 (1H, m, H-9); 0,99 (1H, s, H-7β); 0,69 (3H, s, H-18).

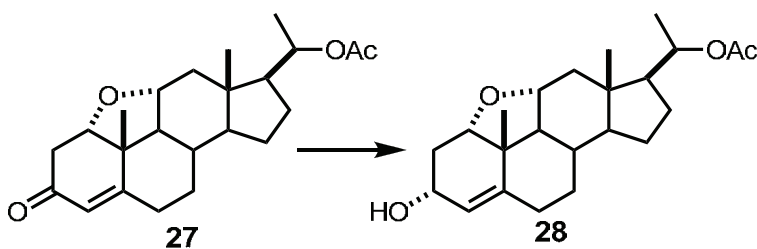
RMN  $^{13}\text{C}$  (125.77 MHz): 170,5 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 150,1 (C-5); 118,1 (C-4); 82,3 (C-1); 75,8 (C-11); 72,3 (C-20); 64,9 (C-3); 59,7 (C-9); 57,4 (C-14); 53,3 (C-17); 46,8 (C-13); 44,4 (C-12); 41,8 (C-10); 36,8 (C-2); 34,2 (C-7); 30,1 (C-6); 31,1 (C-8); 26,5 (C-16); 22,5 (C-15); 21,5 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 20,2 (C-19); 19,8 (C-21); 13,9 (C-18).

El compuesto anterior (90 mg, 0,241 mmol) se oxidó utilizando la técnica descrita para el compuesto **13**: PCC (233 mg, 0,14 mmol), carbonato de bario (100 mg, 0,71 mmol) y tamiz molecular de 3 Å (188 mg), en diclorometano seco (10,0 ml) durante 40 min. La mezcla de reacción fue diluída con éter etílico y filtrada por un lecho de florisil con éter etílico y acetato de etilo/hexano 8:2. Por evaporación del solvente se obtuvo el compuesto **27** (65 mg, 72%)

RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz): 5,77 (1H, s, H-4); 4,81 (1H, m, H-20); 4,31 (1H, dd,  $J = 9,5$  y  $8,5$ , H-1); 4,14 (1H, m, H-11); 2,02 (3H, s, acetato); 1,27 (3H, s, H-19); 1,14 (3H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-21); 0,71 (3H, s, H-18).

RMN  $^{13}\text{C}$  (125.77 MHz): 198,0 (C-3); 170,5 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 167,0 (C-5); 120,9 (C-4); 82,8 (C-1); 76,3 (C-11); 72,2 (C-20); 60,5 (C-9); 57,1 (C-14); 53,2 (C-17); 47,0 (C-13); 45,0 (C-2); 44,2 (C-12); 42,7 (C-10); 34,3 (C-6); 31,3 (C-7); 31,1 (C-8); 26,5 (C-16); 22,4 (C-15); 21,5 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 20,5 (C-19); 19,8 (C-21); 14,0 (C-18).

• 20-Acetoxi-3 $\alpha$ -hidroxi-1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxi-4-pregнено (**28**)

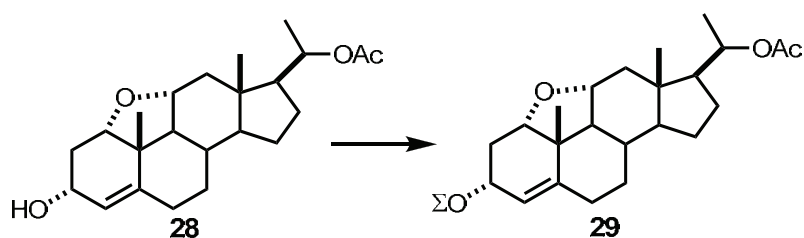


A una solución del compuesto **27** (61 mg, 0,164 mmol) en THF anhidro (3 ml) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno se le agregaron 0,33 ml de una solución 1M de tri(t-butoxi)hidruro de aluminio y litio en THF. La mezcla de reacción se agitó durante 3 hs a temperatura ambiente, se trató sucesivamente con acetona y HCl 10%, y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 7:3) obteniéndose el compuesto **28** (45 mg, 73%).

**RMN <sup>1</sup>H** (500,13 MHz): 5,33 (1H, s, H-4); 4,81 (1H, m, H-20); 4,33 (1H, dd, *J* = 11,2 y 2,9 Hz, H-3); 4,10 (1H, dd, *J* = 11,2 y 6,4 Hz, H-1); 3,96 (1H, td, *J* = 11,2 y 4,9 Hz, H-11); 2,30 (1H, m, H-6 $\alpha$ ); 2,29 (1H, m, H-12 $\beta$ ); 2,28 (1H, m, H-2 $\alpha$ ); 2,11 (1H, m, H-6 $\beta$ ); 2,01 (3H, s, acetato); 1,95 (1H, m, H-7 $\alpha$ ); 1,83 (1H, m, H-16 $\alpha$ ); 1,70 (1H, m, H-9); 1,66 (1H, m, H-15 $\alpha$ ); 1,60 (1H, m, H-8); 1,53 (1H, m, H-2 $\beta$ ); 1,33 (1H, m, H-16 $\beta$ ); 1,19 (1H, m, H-17); 1,17 (2H, m, H-14 y H-15 $\beta$ ); 1,15 (1H, m, H-12 $\alpha$ ); 1,14 (3H, d, *J* = 6,1 Hz, H-21); 1,11 (1H, s, H-19); 1,00 (1H, m, H-7 $\beta$ ); 0,67 (3H, s, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C** (125,77 MHz): 170,5 (CH<sub>3</sub>COO); 144,2 (C-5); 123,3 (C-4); 83,7 (C-1); 76,6 (C-11); 72,3 (C-20); 66,7 (C-3); 59,6 (C-9); 57,4 (C-14); 53,3 (C-17); 46,8 (C-13); 44,4 (C-12); 41,8 (C-10); 40,5 (C-2); 33,7 (C-7); 31,1 (C-8); 29,5 (C-6); 26,5 (C-16); 22,4 (C-15); 21,5 (CH<sub>3</sub>COO); 19,8 (C-21); 19,5 (C-19); 13,9 (C-18).

• **20-Acetoxi-3 $\alpha$ -*t*-butilisililoxi-1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxi-4-pregнено (29)**

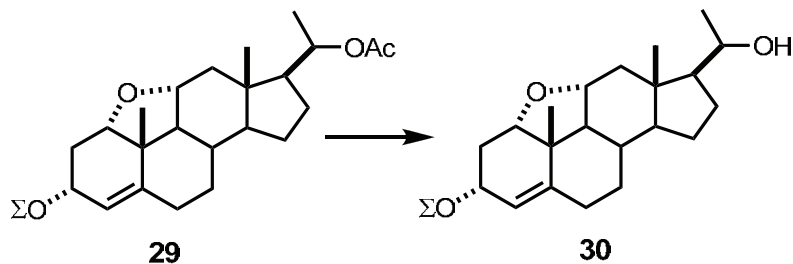


El compuesto **29** se preparó utilizando el procedimiento empleado para la obtención del compuesto **14**: esteroide **27** (41 mg, 0,11 mmol), DMF anhidra (2,6 ml), imidazol (22 mg, 0,33 mmol) y TBDMSCl (33 mg, 0,22 mmol), temperatura ambiente durante 45 min. El residuo resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 1:1) obteniéndose el compuesto **29** (45 mg, 85%).

**RMN <sup>1</sup>H** (500,13 MHz): 5,27 (1H, s, H-4); 4,80 (1H, m, H-20); 4,31 (1H, dt, *J* = 14,0 y 4,0 Hz, H-3); 4,07 (1H, dd, *J* = 10,0 y 6,0 Hz, H-1); 3,93 (1H, m, H-11); 2,01 (3H, s, acetato); 1,13 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, H-21); 1,10 (s, 3H, H-19); 0,90 (s, 9H, *t*-butil-Si); 0,66 (s, 3H, H-18); 0,10 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-Si).

**RMN <sup>13</sup>C** (125,77 MHz): 170,5 (CH<sub>3</sub>COO); 143,2 (C-5); 124,8 (C-4); 83,8 (C-1); 76,5 (C-11); 72,3 (C-20); 67,2 (C-3); 59,3 (C-9); 57,4 (C-14); 53,2 (C-17); 46,7 (C-13); 44,4 (C-12); 40,5 (C-2); 41,7 (C-10); 33,5 (C-7); 31,0 (C-8); 29,5 (C-6); 26,5 (C-16); 25,9-25,6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si); 22,4 (C-15); 21,5 (CH<sub>3</sub>COO); 19,8 (C-21); 19,4 (C-19); 18,3 (CH<sub>3</sub>-C-Si); 13,9 (C-18); -3,60 y -4,61 (C-Si).

• 3 $\alpha$ -*t*-Butilisililoxi-20-hidroxi-1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxi-4-pregнено (29)

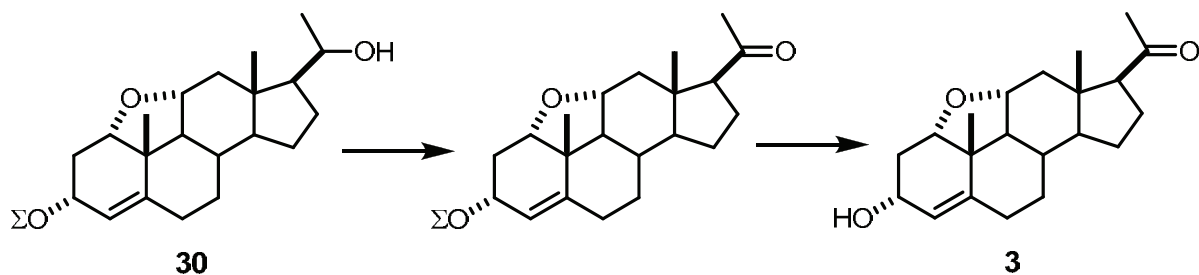


A una solución del compuesto **29** (43 mg, 0,088 mmol) en THF anhidro (2,5 ml) se le agregó hidruro de aluminio y litio (40 mg, 1,0 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 hs bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se trató sucesivamente con acetato de etilo y HCl 10%. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 1:1) obteniéndose el compuesto **30** (29 mg, 73%).

**RMN <sup>1</sup>H** (500,13 MHz): <sup>1</sup>H NMR: 5,27 (1H, s, H-4); 4,30 (1H, dt, J = 12,0 y 2,0 Hz, H-3); 4,09 (1H, dd, J = 12,0 y 8,0 Hz, H-1); 4,00 (1H, m, H-11); 3,65 (1H, m, H-20); 1,12 (3H, d, J = 7,0 Hz, H-21); 1,10 (3H, s, H-19); 0,89 (9H, s, *t*-butil-Si); 0,77 (3H, s, H-18); 0,075 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si).

**RMN <sup>13</sup>C** (125,77MHz): 143,5 (C-5); 124,6 (C-4); 83,8 (C-1); 76,6 (C-11); 70,1 (C-20); 67,3 (C-3); 59,4 (C-9); 57,5 (C-14); 57,0 (C-17); 46,9 (C-13); 44,9 (C-12); 41,7 (C-10); 40,5 (C-2); 33,5 (C-7); 31,0 (C-8); 29,5 (C-6); 26,6 (C-16); 25,7-25,6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si); 23,8 (C-21); 22,7 (C-15); 19,5 (C-19); 18,2 (CH<sub>3</sub>-C-Si); 13,8 (C-18); -3,60 y -4,60 (C-Si).

• 3 $\alpha$ -Hidroxi-1 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxi-4-pregnen-20-ona (3)



El compuesto **30** (28 mg, 0,063 mmol) se oxidó utilizando la técnica descrita para la obtención del compuesto **13**: PCC (60 mg, 0,32 mmol), carbonato de bario (25 mg, 0,18 mmol)

y tamiz molecular de 3 Å (48 mg), en diclorometano seco (2,4 ml) durante 40 min. El sólido resultante fue purificado por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 1:1) obteniéndose el 20-ceto esteroide (20 mg, 71 %).

**RMN <sup>1</sup>H** (500,13 MHz): 5,29 (1H, s, H-4); 4,31 (1H, dt, *J* = 14,0 y 4,0 Hz, H-3); 4,09 (1H, m, H-1); 3,98 (1H, m, H-20); 2,14 (3H, s, H-21); 1,10 (3H, s, H-19); 0,89 (9H, s, *t*-butil-Si); 0,66 (3H, s, H-18); 0,08 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si).

A una solución del compuesto anterior (18 mg, 0,041 mmol) en THF anhidro (2 ml) se le agregó Bu<sub>4</sub>NF 1M (10 μL, 0,095 mmol) en THF y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Luego de evaporar el solvente, el residuo se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 7:3) obteniéndose el análogo **3** como un sólido amorfo (11 mg, 79 %).

**IR** (KBr): 3410, 2926, 1723, 1380, 1035 cm<sup>-1</sup>.

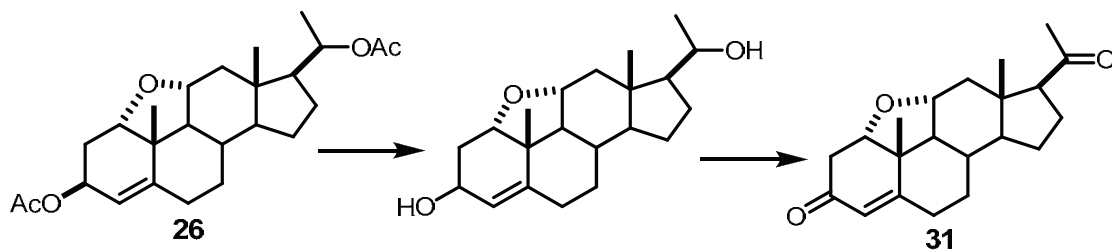
**RMN <sup>1</sup>H** (500,13 MHz): 5,33 (1H, s, H-4); 4,34 (1H, dt, *J* = 11,3 y 3,3 Hz, H-3); 4,12 (1H, dd, *J* = 11,2 y 6,3 Hz, H-1); 3,98 (1H, dt, *J* = 4,9 y 11,1 Hz, H-11); 2,63 (1H, t, *J* = 9,2 Hz, H-17); 2,43 (1H, dd, *J* = 11,0 y 4,6, H-12β); 2,31 (1H, m, H-6α); 2,29 (1H, m, H-2α); 2,25 (1H, m, H-16α); 2,12 (3H, s, H-21); 1,97 (1H, m, H-7α); 1,74 (1H, m, H-16β); 1,70 (1H, m, H-15α); 1,64 (1H, m, H-8); 1,53 (1H, m, H-2β); 1,35 (1H, m, H-12α); 1,26 (2H, m, H-15β); 1,25 (2H, m, H-9 y H-6β); 1,24 (1H, m, H-14); 1,11 (1H, s, H-19); 1,01 (1H, m, H-7β); 0,66 (3H, s, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C**: ver Capítulo 2, pág. 35.

**EM**: *m/z* 330 (M<sup>+</sup>, 1), 312 (14), 271 (5), 43 (100).

**EMAR** *m/z* [M<sup>+</sup>] 330,2190 (calculado 330,2195).

### Síntesis de 1α,11α-epoxiprogesteroa (**31**)



Una solución del compuesto **26** (48mg, 0,12 mmol) en THF (3 ml) se trató con  $\text{LiAlH}_4$  (30 mg, 0,8 mmol) durante 25 min a temperatura 0 °C. Por evaporación del solvente se obtuvo el 3,20-diol (35 mg, 90%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (200,13 MHz): 5,64 (1H, d,  $J = 6,8$  Hz, H-4); 4,34 (1H, m H-1); 4,18 (1H, m, H-3); 3,99 (1H, m, H-11); 3,67 (m, 1H, H-20); 1,21 (s, 3H, H-19); 1,12 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-21); 0,79 (3H, s, H-18).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (50,32 MHz): 150,1 (C-5); 118,0 (C-4); 82,2 (C-1); 75,9 (C-11); 69,9 (C-20); 64,7 (C-3); 59,6 (C-17); 57,1 (C-14); 56,83 (C-9); 46,9 (C-13); 44,9 (C-12); 41,7 (C-10); 36,7 (C-2 o C-6); 34,23 (C-2 o C-6); 31,09 (C-8); 30,1 (C-7); 26,6 (C-16); 23,7 (C-21); 22,6 (C-15); 20,1 (C-19); 13,8 (C-18).

El 3,20 diol (30 mg, 0,09 mmol) se oxidó con PCC (78 mg), siguiendo el procedimiento descrito para la obtención del compuesto **13**. El crudo de reacción se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 2:8) obteniéndose la 1,11-óxidoprogesterona (**31**) (19 mg, 57%).

**Punto de fusión:** 113-114 °C (acetato de etilo).

**IR** (KBr): 2945, 1715, 1668, 1035  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$** : (500,13 MHz): 5,78 (1H, s, H-4); 4,34 (1H, dd,  $J = 9,2$  y 8,0 Hz, H-1); 4,03 (1H, td,  $J = 11,1$  y 4,9 Hz, H-11); 2,91 (1H, dd,  $J = 15,8$  y 8,0, H-2 $\alpha$ ); 2,65 (1H, t,  $J = 9,2$  Hz, H-17); 2,59 (1H, m, H-7 $\alpha$ ); 2,54 (1H, m, H-2 $\beta$ ); 2,50 (1H, dd,  $J = 15,8$  y 9,2, H-12 $\beta$ ); 2,34 (1H, m, H-7 $\beta$ ); 2,28 (1H, m, H-16 $\alpha$ ); 2,16 (2H, m, H-8 y H-6 $\alpha$ ); 2,14 (3H, s, H-21); 1,83 (1H, m, H-16 $\beta$ ); 1,74 (1H, m, H-15 $\alpha$ ); 1,43 (1H, m, H-12 $\alpha$ ); 1,42 (1H, m, H-14); 1,32 (2H, m, H-9 y H-15 $\beta$ ); 1,20 (1H, m, H-6 $\beta$ ); 1,27 (1H, s, H-19); 0,73 (3H, s, H-18).

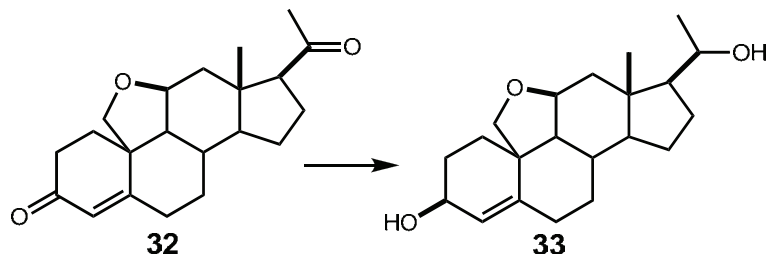
**RMN  $^{13}\text{C}$** : ver Capítulo 2, pág. 37.

**EM:** m/z 328 ( $\text{M}^+$ , 4), 298 (25), 255 (14), 213 (9); 43 (100).

**EMAR:** m/z [ $\text{M}^+$ ] 328,2070 (calculado 328,2038).

*Síntesis del análogo 4*

· 3 $\beta$ -Hidroxi-11,19-epoxi-4-pregnen-20-ol (**33**)



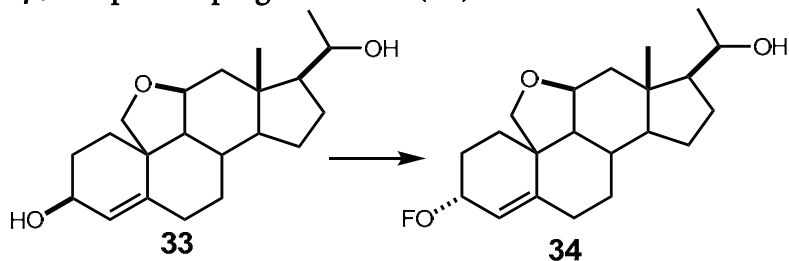
La 11,19-epoxiprogesterona (**32**) (2,65 g, 0,81 mmol) disuelta en una mezcla de diclorometano (5,5 ml) y metanol (5,5 ml) fue reducida con NaBH<sub>4</sub> (53 mg, 1,39 mmol) a temperatura ambiente durante 90 min siguiendo la metodología utilizada para la obtención del compuesto **11**. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 7:3) obteniéndose el 3,20-diol **33** (216 mg, 80%).

**RMN <sup>1</sup>H** (500,13 MHz): 5,54 (1H, s, H-4); 4,27 (1H, sa, H-11); 4,22 (1H, m, H-3); 3,87 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-19b); 3,75 (1H, m, H-20); 3,68 (1H, dd, J = 8.4 y 1.5 Hz, H-19a); 1,13 (3H, d, J = 6,2 Hz H-21), 0,94 (3H, s, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C** (125,77 MHz): 140,0 (C-5); 129,0 (C-4); 78,5 (C-11); 70,2 (C-20); 69,5 (C-19); 67,3 (C-3); 59,2 (C-17); 57,4 (C-9); 52,2 (C-14); 47,4 (C-10); 43,0 (C-13); 42,3 (C-12); 42,8 (C-2); 34,7 (C-8); 34,6 (C-1); 32,7 (C-6); 28,2 (C-7); 25,6 (C-16); 23,6 (C-15); 23,5 (C-21); 14,7 (C-18).

**EM:** m/z 332 (M<sup>+</sup>, 13), 302 (100), 284 (6), 269 (4), 255 (8), 239 (5).

· 3 $\alpha$ -Formiloxi-11 $\beta$ ,19-epoxi-4-pregenn-20-ol (**34**)



A una solución del compuesto **33** (216 mg, 0,65 mmol), trifenilfosfina (340 mg, 1,29 mmol) y ácido fórmico (59 mg, 1,29 mmol) en THF anhidro (7,8 ml) se le agregó gota a gota



una solución de DEAD (225 mg, 1,29 mmol) en THF anhidro (1,2 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 hs y luego se evaporó el solvente. El sólido resultante se purificó por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 1:1) obteniéndose el compuesto **34** (140 mg, 60%) como sólido blanco.

**Punto de fusión:** 160–161 °C (metanol).

**IR** (KBr): 3420, 2865, 1725, 1428, 1210  $\text{cm}^{-1}$ ;

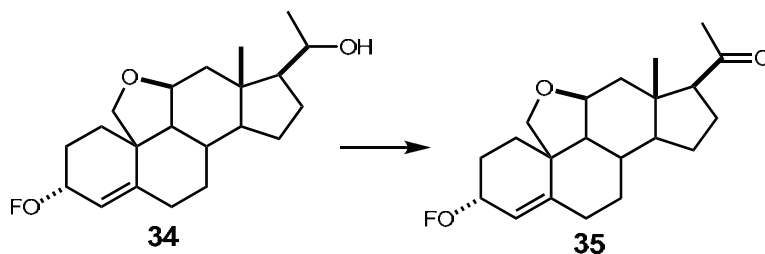
**RMN  $^1\text{H}$**  (500,13 MHz): 8,06 (1H, s, H-formiato); 5,64 (1H, dd,  $J = 4,3$  y  $1,9$  Hz, H-4); 5,27 (1H, sa,  $W_{1/2}$  15,0 Hz, H-3); 4,33 (1H, sa, H-11); 3,80 (1H, dd,  $J = 8,4$  y  $1,8$  Hz, H-19a); 3,75 (1H, m, H-20); 3,70 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, H-19 $\beta$ ); 2,42 (1H, m, H-12 $\beta$ ); 2,32 (2H, m, H-6 $\alpha$ ); 1,87 (1H, m, H-1 $\beta$ ); 1,87 (2H, m, H-2); 1,68 (1H, m, H-16 $\alpha$ ); 1,67 (1H, m, H-7 $\alpha$ ), 1,61 (2H, m, H-15), 1,55 (1H, m, H-8); 1,51 (1H, m, H-12 $\alpha$ ); 1,49 (1H, m, H-1 $\alpha$ ); 1,36 (1H, m, H-17); 1,29 (1H, m, H-9); 1,19 (1H, m, H-16 $\beta$ ), 1,18 (1H, m, H-14); 1,14 (3H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-21), 1,08 (1H, m, H-7 $\beta$ ); 0,94 (3H, s, H-18).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (125,77 MHz): 160,0 (formiato); 145,4 (C-5); 121,8 (C-4); 78,3 (C-11); 70,8 (C-19); 70,3 (C-20); 66,8 (C-3); 59,3 (C-17); 52,2 (C-14); 57,6 (C-9); 46,6 (C-10); 43,0 (C-13); 42,4 (C-12); 34,7 (C-8 y C-6); 28,7 (C-7 y C-1); 25,6 (C-16); 24,8 (C-2); 23,6 (C-15); 23,6 (C-21); 14,7 (C-18).

**EM:**  $m/z$  360 ( $M^+$ , 1), 330 (2), 314 (5), 284 (59); 266 (4); 253 (4); 91 (100).

**EMAR:**  $m/z$  [ $M^+$ ] 360,2304 (calculado 360,2301).

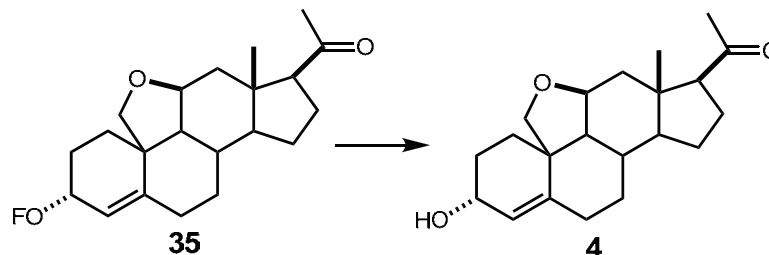
• **3 $\alpha$ -Formiloxi-11 $\beta$ ,19-epoxi-4-pregnen-20-ona (35)**



El compuesto **34** (47 mg, 0,13 mmol) se oxidó utilizando la técnica descrita para la obtención del compuesto **13**: PCC (114 mg, 0,61 mmol), carbonato de bario (48 mg, 0,34 mmol) y tamiz molecular de 3 Å (92 mg), en diclorometano seco (4,6 ml) durante 30 min. El sólido resultante fue purificado por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 8:2) obteniéndose el compuesto **36** (39 mg, 84 %).

RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz): 8,10 (1H, s, H-formiato); 5,66 (1H, d,  $J = 4,4$  Hz, H-4); 5,28 (1H, sa, H-3); 4,40 (1H, sa, H-11); 3,79 (1H, dd,  $J = 8,4$  y  $1,8$  Hz, H-19a); 3,70 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, H-19b); 2,13 (3H, s, H-21); 0,80 (3H, s, H-18).

· **3 $\alpha$ -hidroxi-11 $\beta$ ,19-epoxi-4-pregnen-20-ona (4)**



Una solución de la mezcla anterior (24 mg, 0,068 mmol) en metanol (1,9 ml) se trató con una solución de  $\text{KHCO}_3$  (70,7 mg) en metanol (1,0 ml) a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar durante 15 minutos y luego se neutralizó con  $\text{HCl}$  1M, concentró y extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El sólido resultante fue purificado por cromatografía flash (sílicagel, acetato de etilo/hexano 7:3) obteniéndose el compuesto **4** (16,8 mg, 75 %).

**Punto de fusión:** 175-176 °C (de metanol)

**IR** (KBr): 3428, 2879, 1720, 1425, 1024  $\text{cm}^{-1}$

RMN  $^1\text{H}$  (500,13 MHz): 5,68 (1H, d,  $J = 4,4$  Hz, H-4); 4,41 (1H, sa, H-11); 4,10 (1H, sa,  $W_{1/2}$  12,5 Hz, H-3); 3,76 (1H, dd,  $J = 8,2$  y  $1,8$  Hz, H-19a); 3,68 (1H, d,  $J = 8,2$  Hz, H-19b); 2,52 (1H, m, H-17); 2,41 (1H, m, H-12 $\beta$ ); 2,29 (2H, m, H-6); 2,13 (3H, s, H-21); 2,07 (2H, m, H-16); 1,82 (2H, m, H-7); 1,72 (1H, m, 12 $\alpha$ ); 1,67 (1H, H-2 $\alpha$ ); 1,66 (1H, m, H-15 $\alpha$ ); 1,51 (2H, m, H-1); 1,50 (1H, m, H-8); 1,32 (1H, m, H-15 $\beta$ ); 1,08 (1H, m, H-2 $\beta$ ); 0,80 (3H, s, H-18).

RMN  $^{13}\text{C}$ : ver Capítulo 2, pág. 37

EM:  $m/z$  330 ( $\text{M}^+$ , 8), 312 (7), 300 (60), 282 (8), 257 (7), 239 (6), 110 (100)

EMAR:  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ] 330,2204 (calculado 330,2195)

### *Modelado Molecular*

Las estructuras de los esteroides fueron construidas utilizando el programa Hyperchem 8.0 y optimizadas con el método semiempírico AM1. Posteriormente, estas estructuras se

optimizaron con el programa Gaussian 03 [106] utilizando el método *ab initio* HF con las funciones base 6-31G\*\*. En el caso de los radicales se utilizó el método UHF/6-31G\*\*. Las figuras fueron realizadas con Hyperchem 8.0.

## 6.2 Capítulo 3

### *Esteroides*

La dexametasona (dex) y mifepristona (RU486) se adquirieron de Sigma Co. (St. Louis, MO). 21-hidroxi-6,19-epoxiprogesterona (21OH-6,19OP) y 21-hemisuccinoiloxi-6,19-epoxiprogesterona (21HS-6,19OP) fueron sintetizados previamente en nuestro grupo de investigación mediante el método descrito en [23].

### *Inducción de MMTV-LUC en células L929*

Las células L929 se hicieron crecer a 37°C bajo atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de caballo (FCS) conteniendo penicilina (100 IU/mL), streptomicina (100 mg/mL) y glutamina (2 mM) en placas p100. Para las transfecciones transientes, se plaquearon 5×10<sup>5</sup> células en placas de 60 mm y se transfectaron, utilizando el método lipofectina de acuerdo al protocolo estándar (Lipofectine Plus, Gibco, Inc.): 3 µg de pMMTV-Luc [107] y 3 µg de pRSV-LacZ (Clontech Inc., Palo Alto, CA). Veinte horas después de la transfección, el medio fue reemplazado por medio fresco conteniendo 10% de suero deslipilizado y antibióticos. Las células fueron entonces incubadas durante 20 hs con los esteroides a las concentraciones indicadas. La incubación se detuvo aspirando el medio y lavando las células dos veces con buffer fosfato salino (PBS). Las células fueron entonces lisadas y la actividad luciferasa medida de acuerdo con el protocolo estándar (Promega Inc.). La actividad galactosidasa se midió como se describió previamente [19].

### *Inhibición de la actividad de NFκB en células BHK*

Las células BHK se hicieron crecer a 37°C bajo atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de caballo (FCS) conteniendo penicilina (100 IU/mL) y streptomicina (100 mg/mL) en placas p100. Para las transfecciones transientes, se

plaquearon  $5 \times 10^5$  células en placas de 24 wells y se transfectaron, utilizando el método lipofectina de acuerdo al protocolo estándar (Lipofectine Plus, Gibco, Inc.): 0,3  $\mu\text{g}$  p $\kappa\text{B}$ -Luc, 0,1  $\mu\text{g}$  pRelA y 3  $\mu\text{g}$  de pRSV-LacZ (Clontech Inc., Palo Alto, CA). Veinte horas después de la transfección, el medio fue reemplazado por medio fresco conteniendo antibióticos. Las células fueron entonces incubadas durante 20 hs con los esteroides a las concentraciones indicadas. La incubación se detuvo aspirando el medio y lavando las células dos veces con buffer fosfato salino (PBS). Las células fueron entonces lisadas y la actividad luciferasa medida de acuerdo con el protocolo estándar (Promega Inc.). La actividad galactosidasa se midió como se describió previamente [19].

### *Inducción de MMTV-LUC en células BHK con agregado de coactivador TIF2*

Las células BHK se hicieron crecer a 37°C bajo atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de caballo (FCS) conteniendo penicilina (100 IU/mL) y streptomicina (100 mg/mL) en placas p100. Para las transfecciones transientes, se plaquearon  $5 \times 10^5$  células en placas de 24 wells y se transfectaron, utilizando el método lipofectina de acuerdo al protocolo estándar (Lipofectine Plus, Gibco, Inc.): 0,3  $\mu\text{g}$  de pMMTV-Luc [107], 0,3  $\mu\text{g}$  de pRSV-LacZ1 (Clontech Inc., Palo Alto, CA) y 0,3  $\mu\text{g}$  de pTIF2 o iguales cantidades de vector no codificante. Veinte horas después de la transfección, el medio fue reemplazado por medio fresco conteniendo antibióticos. Las células fueron entonces incubadas durante 20 hs con los esteroides a las concentraciones indicadas. La incubación se detuvo aspirando el medio y lavando las células dos veces con buffer fosfato salino (PBS). Las células fueron entonces lisadas y la actividad luciferasa medida de acuerdo con el protocolo estándar (Promega Inc.). La actividad galactosidasa se midió como se describió previamente [19].

### *Apoptosis de células L929.*

La viabilidad celular de las células L929 fue evaluada utilizando el método de tinción con cristal violeta [108]. Se plaquearon  $3 \times 10^5$  células por well en una placa de 96-wells, crecidas durante 24 h y luego tratadas como se indica con TNF- $\alpha$  de Sigma Co. (St.Louis, MO) con o sin los esteroides. Luego de 24 h las células fueron fijadas con 100  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído frío (1,1% en PBS) durante 15 min at 0°C. Las células fueron lavadas tres veces con agua destilada, secadas al aire, y teñidas durante 20 min con 100  $\mu\text{L}$  de 0,1% solución de cristal violeta (disuelto en buffer de ácido fosfórico 200 mM a pH 6). Luego de una cuidadosa aspiración del cristal violeta, se eliminó el exceso de colorante con tres lavados de agua destilada. La placa fue secada al aire y

luego el colorante fue solubilizado con 100  $\mu$ L de solución de ácido acético durante 30 min. La densidad óptica del colorante disuelto fue medida a 590nm con un espectrofotómetro multiplaca (Benchmark, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

## 6.3 Capítulo 4

### *Cálculos de Mecánica Cuántica.*

Las geometrías de dexametasona, 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP fueron optimizadas usando el programa Gaussian 03 [106] con el método HF/6-31G\*\*. Además se calcularon para cada uno de los ligandos las cargas atómicas RESP (restraint electrostatic potential) con las funciones base HF/6-31G\*\*.

### *Simulación por Dinámica molecular*

La simulación por dinámica molecular fue realizada utilizando el paquete de programas de AMBER 9 [109]. La estructura inicial para la simulación fue tomada de la estructura cristalina del complejo GR LBD-dex (pdb:1M2Z) [78]. Debido a que esta estructura cristalina está formada por un homodímero de GR LBD y a que nuestro propósito fue estudiar el comportamiento del un monómero, solamente la cadena A de pdb:1M2Z fue utilizada. Los parámetros de los ligandos (dexametasona, 21OH-6,19OP y 21HS-6,19OP) fueron asignados con el campo general de AMBER (General Amber Force Field, GAFF) y las cargas correspondientes utilizando el modulo Antechamber de AMBER. Los complejos GR LBD-21OH-6,19OP y GR LBD-21HS-6,19OP fueron construidos *in silico* superponiendo los átomos de carbono del anillo C de estos ligandos con los correspondientes átomos de la molécula de dex en el complejo GR LBD-dex utilizando el programa VMD (Visual Molecular Dynamics, <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). Para construir el sistema libre de ligando simplemente se eliminó la molécula de dex del complejo GR LBD-dex.

Los complejos fueron inmersos en una caja octaédrica de moléculas de agua TIP3P usando el módulo Leap, resultando sistemas de alrededor de 27000 átomos. Los sistemas fueron inicialmente optimizados y luego gradualmente calentados hasta 300 K. A partir de estas estructuras equilibradas se simularon 6 ns a 1 atm y 300 K, condiciones mantenidas con el barostato y termostato de Berendsen [110], usando condiciones de contorno periódicas y el

método de malla de Ewald (espaciado de la grilla de 1 Å) para tratar las interacciones electroestáticas de largo alcance. El algoritmo SHAKE fue utilizado para mantener las uniones que involucran átomos de H en su distancia de equilibrio, permitiendo emplear un tiempo de etapa para la integración de las ecuaciones de Newton de 2 fs. Los parámetros del campo Amber99 fueron usados para todos los residuos de la proteína. La frecuencia de puentes de hidrógeno fue calculada como el porcentaje de snapshots donde el puente de hidrógeno está formado. Un puente de hidrógeno está formado cuando la distancia entre los dos átomos pesado involucrados en la interacción es menor a 3.5 Å.

Las figuras fueron realizadas con el programa VMD.



---

## REFERENCIAS





1. Bailly, A., Dictionnaire Grec-Français. Paris, Hachette, 2000.
2. Cuvie, F., *Dictionnaire des sciences naturelles*, 1817.
3. Simoncini, T. y Genazzani, A.R., Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol*, 2003. 148(3): p. 281.
4. Losel, R. y Wehling, M., Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(1): p. 46.
5. Haller, J., Mikics, E. y Makara, G.B., The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front Neuroendocrinol*, 2008. 29(2): p. 273.
6. Bai, C., Schmidt, A. y Freedman, L.P., Steroid hormone receptors and drug discovery: therapeutic opportunities and assay designs. *Assay Drug Dev Technol*, 2003. 1(6): p. 843.
7. Dubrovsky, B.O., Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2005. 29(2): p. 169.
8. Mellon, S.H., Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. 78(5): p. 1003.
9. Mellon, S.H. y Griffin, L.D., Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab*, 2002. 13(1): p. 35.
10. Gasior, M., Carter, R.B. y Witkin, J.M., Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. 20(3): p. 107.
11. Brachet-Cota, A.L. y Burton, G., An improved preparation of 11,19-oxidopregn-4-ene-3,20-dione and 6,19-oxidopregn-4-ene-3,11,20-trione. *Z.Naturforsch. Teil [B]*, 1990. 45: p. 711.
12. Veleiro, A.S., Nevado, M.V., Monteserin, M.C. y Burton, G., Syntheses of 21-hydroxy-11,19-oxidopregn-4-ene-3,20-dione and 21-hydroxy-6,19-oxidopregn-4-ene-3,20-dione. *Steroids*, 1995. 60(3): p. 268.
13. Benedetti Doctorovich, M.O.V., Ghini, A.A. y Burton, G., Synthesis of oxido-bridged analogs of 18-hydroxyprogesterone. *Steroids*, 1996. 61(6): p. 345.
14. Vicent, G.P., Monteserin, M.C., Veleiro, A.S., Burton, G., Lantos, C.P. y Galigniana, M.D., 21-Hydroxy-6,19-oxidoprogesterone: a novel synthetic steroid with specific antiglucocorticoid properties in the rat. *Mol Pharmacol*, 1997. 52(4): p. 749.
15. Eduardo, S.L., Ghini, A.A. y Burton, G., Oxido-bridged neurosteroid analogues. Synthesis of 2,19-oxido-allopregnanolone. *Arkivoc*, 2003. 2003(10): p. 468.
16. Joselevich, M., Ghini, A.A. y Burton, G., 6,19-carbon-bridged steroids. Synthesis of 6,19-methano-progesterone. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2003. 1(6): p. 939.
17. Veleiro, A.S., Rosenstein, R.E., Jaliffa, C.O., Grilli, M.L., Speroni, F. y Burton, G., Synthesis y GABA(A) receptor activity of a 6,19-oxido analogue of pregnanolone. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003. 13(3): p. 343.

18. Duran, F.J., Ghini, A.A., Dauban, P., Dodd, R.H. y Burton, G., Synthesis of 6,19-sulfamidate bridged pregnanes. *Journal of Organic Chemistry*, **2005**. 70(21): p. 8613.
19. Veleiro, A.S., Pecci, A., Baggio, R., Garland, M.T., Lantos, C.P. y Burton, G., 6,19-Sulfur-bridged progesterone analogues with antiimmunosuppressive activity. *J Med Chem*, **2005**. 48(18): p. 5675.
20. Veleiro, A.S., Taich, P.J., Alvarez, L.D., Di Chenna, P.H. y Burton, G., Synthesis of C(1)-C(11) oxygen-bridged pregnanes. *Tetrahedron Letters*, **2005**. 46(24): p. 4235.
21. Di Chenna, P.H., Veleiro, A.S., Sonogo, J.M., Ceballos, N.R., Garland, M.T., Baggio, R.F. y Burton, G., Synthesis of 6,19-cyclopregnanes. Constrained analogues of steroid hormones. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2007**. 5(15): p. 2453.
22. Galigniana, M.D., Vicent, G.P., Piwien-Pilipuk, G., Burton, G. y Lantos, C.P., Mechanism of action of the potent sodium-retaining steroid 11, 19-oxidoprogesterone. *Mol Pharmacol*, **2000**. 58(1): p. 58.
23. Burton, G., Lantos, C.P. y Veleiro, A.S., Method for the preparation of 21-hydroxy-6,19-oxidoprogesterone (21OH-6,19OP). *U.S. Patent 7,071,328*, 2006., **2006**.
24. Hosie, A.M., Wilkins, M.E., da Silva, H.M. y Smart, T.G., Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, **2006**. 444(7118): p. 486.
25. Veleiro, A.S. y Burton, G., Structure-activity relationships of neuroactive steroids acting on the GABAA receptor. *Current medicinal chemistry*, **2009**. 16(4): p. 455.
26. Majetich, G. y Wheless, K., Remote intramolecular free radical functionalizations: An update. *Tetrahedron*, **1995**. 51(26): p. 7095.
27. De Armas, P., Concepcion, J.I., Francisco, C.G., Hernandez, R., Salazar, J.A. y Suarez, E., Intramolecular hydrogen abstraction. Hypervalent organoiodine compounds, convenient reagents for alkoxy radical generation. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1989**(3): p. 405.
28. But, T.Y.S. y Toy, P.H., The Mitsunobu reaction: Origin, mechanism, improvements, and applications. *Chemistry - An Asian Journal*, **2007**. 2(11): p. 1340.
29. van der Laan, S. y Meijer, O.C., Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *Eur J Pharmacol*, **2008**. 585(2-3): p. 483.
30. Katz, M. y Gans, E.H., Topical Corticosteroids, Structure-Activity and the Glucocorticoid Receptor: Discovery and Development—A Process of “Planned Serendipity”. *Journal of pharmaceutical sciences*, **2007**. 97(8): p. 2936.
31. McMaster, A. y Ray, D.W., Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. *Exp Physiol*, **2007**. 92(2): p. 299.
32. Kleiman, A. y Tuckermann, J.P., Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice. *Mol Cell Endocrinol*, **2007**. 275(1-2): p. 98.

33. Westphal, U., Steroid–protein interactions II. Monogr. *Endocrinology*, **1986**. 27: p. 1.
34. Cole, T.J., Glucocorticoid action and the development of selective glucocorticoid receptor ligands. *Biotechnol Annu Rev*, **2006**. 12: p. 269.
35. Chen, T., Nuclear receptor drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, **2008**. 12(4): p. 418.
36. Amsterdam, A. y Sasson, R., The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol*, **2002**. 189(1-2): p. 1.
37. Stewart, P.M., The Adrenal Cortex. *Williams Textbook of Endocrinology*, **2003**. 10th ed: p. 491.
38. Overington, J.P., Al-Lazikani, B. y Hopkins, A.L., How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, **2006**. 5(12): p. 993.
39. Bodor, N. y Buchwald, P., Corticosteroid design for the treatment of asthma: structural insights and the therapeutic potential of soft corticosteroids. *Curr Pharm Des*, **2006**. 12(25): p. 3241.
40. Spitz, I.M. y Bardin, C.W., Mifepristone (RU 486)--a modulator of progestin and glucocorticoid action. *N Engl J Med*, **1993**. 329(6): p. 404.
41. Cadepond, F., Ulmann, A. y Baulieu, E.E., RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annu Rev Med*, **1997**. 48: p. 129.
42. Teutsch, G., Gaillard-Moguilewsky, M., Lemoine, G., Nique, F. y Philibert, D., Design of ligands for the glucocorticoid and progestin receptors. *Biochem Soc Trans*, **1991**. 19(4): p. 901.
43. Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A. y Laudet, V., Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov*, **2004**. 3(11): p. 950.
44. Moore, J.T., Collins, J.L. y Pearce, K.H., The nuclear receptor superfamily and drug discovery. *ChemMedChem*, **2006**. 1(5): p. 504.
45. Thornton, J.W., Need, E. y Crews, D., Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science*, **2003**. 301(5640): p. 1714.
46. Ortlund, E.A., Bridgham, J.T., Redinbo, M.R. y Thornton, J.W., Crystal structure of an ancient protein: evolution by conformational epistasis. *Science*, **2007**. 317(5844): p. 1544.
47. Beato, M.H., P. y Schütz, G., Steroid hormone receptors: Many Actors in search of a plot. *Cell*, **1995**. 83: p. 851.
48. Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R. y Sigler, P.B., Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, **1991**. 352(6335): p. 497.
49. Baumann, H., Paulsen, K., Kovacs, H., Berglund, H., Wright, A.P., Gustafsson, J.A. y Hard, T., Refined solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Biochemistry*, **1993**. 32(49): p. 13463.

50. van Tilborg, M.A., Bonvin, A.M., Hard, K., Davis, A.L., Maler, B., Boelens, R., Yamamoto, K.R. y Kaptein, R., Structure refinement of the glucocorticoid receptor-DNA binding domain from NMR data by relaxation matrix calculations. *J Mol Biol*, **1995**. 247(4): p. 689.
51. Gross, K.L. y Cidlowski, J.A., Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab*, **2008**. 19(9): p. 331.
52. Smith, C.L. y O'Malley, B.W., Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev*, **2004**. 25(1): p. 45.
53. Lonard, D.M. y O'Malley, B.W., Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci*, **2005**. 30(3): p. 126.
54. Jenkins, B.D., Pullen, C.B. y Darimont, B.D., Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*, **2001**. 12(3): p. 122.
55. Clark, A.R., Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol*, **2007**. 275(1-2): p. 79.
56. Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. y Schutz, G., DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*, **1998**. 93(4): p. 531.
57. Tuckermann, J.P., Reichardt, H.M., Arribas, R., Richter, K.H., Schutz, G. y Angel, P., The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J Cell Biol*, **1999**. 147(7): p. 1365.
58. Reichardt, H.M., Tuckermann, J.P., Gottlicher, M., Vujic, M., Weih, F., Angel, P., Herrlich, P. y Schutz, G., Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J*, **2001**. 20(24): p. 7168.
59. Newton, R. y Holden, N.S., Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor? *Mol Pharmacol*, **2007**. 72(4): p. 799.
60. De Bosscher, K., Van Craenenbroeck, K., Meijer, O.C. y Haegeman, G., Selective transrepression versus transactivation mechanisms by glucocorticoid receptor modulators in stress and immune systems. *Eur J Pharmacol*, **2008**. 583(2-3): p. 290.
61. Chen, L., Finnerty, C., Gustafson, W.C., Bush, C.R., Chi, P., Guo, H., Luxon, B., Fields, A.P. y Thompson, E.A., Genomic analysis of glucocorticoid-regulated promoters in murine T-lymphoma cells. *Recent Prog Horm Res*, **2003**. 58: p. 155.
62. Kauppi, B., Jakob, C., Farnegardh, M., Yang, J., Ahola, H., Alarcon, M., Calles, K., Engstrom, O., Harlan, J., Muchmore, S., Ramqvist, A.K., Thorell, S., Ohman, L., Greer, J., Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, J. y Carlquist, M., The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. *J Biol Chem*, **2003**. 278(25): p. 22748.
63. Patel, F.A., Funder, J.W. y Challis, J.R., Mechanism of cortisol/progesterone antagonism in the regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase activity and

- messenger ribonucleic acid levels in human chorion and placental trophoblast cells at term. *J Clin Endocrinol Metab*, **2003**. 88(6): p. 2922.
64. Xiao, D., Huang, X., Yang, S. y Zhang, L., Direct chronic effect of steroid hormones in attenuating uterine arterial myogenic tone: role of protein kinase c/extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Hypertension*, **2009**. 54(2): p. 352.
65. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. y Haegeman, G., The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*, **2003**. 24(4): p. 488.
66. Olivier Kassel, P.H. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: Molecular aspects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2007**. 275: p. 13.
67. Humphreys, D.T. y Wilson, M.R., Modes of L929 cell death induced by TNF-alpha and other cytotoxic agents. *Cytokine*, **1999**. 11(10): p. 773.
68. Pagliacci, M.C., Migliorati, G., Smacchia, M., Grignani, F., Riccardi, C. y Nicoletti, I., Cellular stress and glucocorticoid hormones protect L929 mouse fibroblasts from tumor necrosis factor alpha cytotoxicity. *J Endocrinol Invest*, **1993**. 16(8): p. 591.
69. Mendoza-Milla, C., Machuca Rodriguez, C., Cordova Alarcon, E., Estrada Bernal, A., Toledo-Cuevas, E.M., Martinez Martinez, E. y Zentella Dehesa, A., NF-kappaB activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF-alpha cytotoxicity in L929 cells. *FEBS Lett*, **2005**. 579(18): p. 3947.
70. Costas, M.A., Muller Igaz, L., Holsboer, F. y Arzt, E., Transrepression of NF-kappaB is not required for glucocorticoid-mediated protection of TNF-alpha-induced apoptosis on fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, **2000**. 1499(1-2): p. 122.
71. Scheinman, R.I., Gualberto, A., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A. y Baldwin, A.S., Jr., Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol*, **1995**. 15(2): p. 943.
72. Wu, J., Li, Y., Dietz, J. y Lala, D.S., Repression of p65 transcriptional activation by the glucocorticoid receptor in the absence of receptor-coactivator interactions. *Mol Endocrinol*, **2004**. 18(1): p. 53.
73. Garside, H., Stevens, A., Farrow, S., Normand, C., Houle, B., Berry, A., Maschera, B. y Ray, D., Glucocorticoid ligands specify different interactions with NF-kappaB by allosteric effects on the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *J Biol Chem*, **2004**. 279(48): p. 50050.
74. Lepine, S., Sulpice, J.C. y Giraud, F., Signaling pathways involved in glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes. *Crit Rev Immunol*, **2005**. 25(4): p. 263.
75. Viegas, L.R., Hoijman, E., Beato, M. y Pecci, A., Mechanisms involved in tissue-specific apoptosis regulated by glucocorticoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2008**. 109(3-5): p. 273.

76. Herold M. J., Glucocorticoids in T cell apoptosis y function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2006**. 63: p. 60.
77. Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G. y Evans, R.M., Primary structure y expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, **1985**. 318(6047): p. 635.
78. Bledsoe, R.K., Montana, V.G., Stanley, T.B., Delves, C.J., Apolito, C.J., McKee, D.D., Consler, T.G., Parks, D.J., Stewart, E.L., Willson, T.M., Lambert, M.H., Moore, J.T., Pearce, K.H. y Xu, H.E., Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell*, **2002**. 110(1): p. 93.
79. Biggadike, K., Bledsoe, R.K., Hassell, A.M., Kirk, B.E., McLay, I.M., Shewchuk, L.M. y Stewart, E.L., X-ray crystal structure of the novel enhanced-affinity glucocorticoid agonist fluticasone furoate in the glucocorticoid receptor-ligand binding domain. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**. 51(12): p. 3349.
80. Madauss, K.P., Bledsoe, R.K., McLay, I., Stewart, E.L., Uings, I.J., Weingarten, G. y Williams, S.P., The first X-ray crystal structure of the glucocorticoid receptor bound to a non-steroidal agonist. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2008**. 18(23): p. 6097.
81. Suino-Powell, K., Xu, Y., Zhang, C., Tao, Y.G., Tolbert, W.D., Simons, S.S., Jr. y Xu, H.E., Doubling the size of the glucocorticoid receptor ligand binding pocket by deacylcortivazol. *Mol Cell Biol*, **2008**. 28(6): p. 1915.
82. Biggadike, K., Bledsoe, R.K., Hassell, A.M., Kirk, B.E., McLay, I.M., Shewchuk, L.M. y Stewart, E.L., X-ray crystal structure of the novel enhanced-affinity glucocorticoid agonist fluticasone furoate in the glucocorticoid receptor-ligand binding domain. *J Med Chem*, **2008**. 51(12): p. 3349.
83. Necela, B.M. y Cidrowski, J.A., Crystallization of the human glucocorticoid receptor ligand binding domain: a step towards selective glucocorticoids. *Trends Pharmacol Sci*, **2003**. 24(2): p. 58.
84. Madauss, K.P., Grygielko, E.T., Deng, S.J., Sulpizio, A.C., Stanley, T.B., Wu, C., Short, S.A., Thompson, S.K., Stewart, E.L., Laping, N.J., Williams, S.P. y Bray, J.D., A structural and in vitro characterization of asoprisnil: a selective progesterone receptor modulator. *Mol Endocrinol*, **2007**. 21(5): p. 1066.
85. Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A. y Carlquist, M., Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, **1997**. 389(6652): p. 753.
86. Xu, H.E., Stanley, T.B., Montana, V.G., Lambert, M.H., Shearer, B.G., Cobb, J.E., McKee, D.D., Galardi, C.M., Plunket, K.D., Nolte, R.T., Parks, D.J., Moore, J.T., Kliewer, S.A., Willson, T.M. y Stimmel, J.B., Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature*, **2002**. 415(6873): p. 813.

87. Singh, S.M., Gauthier, S. y Labrie, F., Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships. *Curr Med Chem*, **2000**. 7(2): p. 211.
88. Shiau, A.K., Barstad, D., Radek, J.T., Meyers, M.J., Nettles, K.W., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., Agard, D.A. y Greene, G.L., Structural characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism. *Nat Struct Biol*, **2002**. 9(5): p. 359.
89. Souque, A., Fagart, J., Couette, B., Davioud, E., Sobrio, F., Marquet, A. y Rafestin-Oblin, M.E., The mineralocorticoid activity of progesterone derivatives depends on the nature of the C18 substituent. *Endocrinology*, **1995**. 136(12): p. 5651.
90. Frego, L. y Davidson, W., Conformational changes of the glucocorticoid receptor ligand binding domain induced by ligand and cofactor binding, and the location of cofactor binding sites determined by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Protein Sci*, **2006**. 15(4): p. 722.
91. Stoney Simons, S. Jr., The importance of being varied in steroid receptor transactivation. *Trends Pharmacol Sci*, **2003**. 24(5): p. 253.
92. Wrangé, O., Eriksson, P. y Perlmann, T., The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer. *J Biol Chem*, **1989**. 264(9): p. 5253.
93. Eriksson, P. y Wrangé, O., Protein-protein contacts in the glucocorticoid receptor homodimer influence its DNA binding properties. *J Biol Chem*, **1990**. 265(6): p. 3535.
94. Dahlman-Wright, K., Siltala-Roos, H., Carlstedt-Duke, J. y Gustafsson, J.A., Protein-protein interactions facilitate DNA binding by the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *J Biol Chem*, **1990**. 265(23): p. 14030.
95. Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J.A. y Carlstedt-Duke, J., Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J Biol Chem*, **1991**. 266(5): p. 3107.
96. Drouin, J., Sun, Y.L., Tremblay, S., Lavender, P., Schmidt, T.J., de Lean, A. y Nemer, M., Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*, **1992**. 6(8): p. 1299.
97. Segard-Maurel, I., Rajkowski, K., Jibard, N., Schweizer-Groyer, G., Baulieu, E.E. y Cadepond, F., Glucocorticosteroid receptor dimerization investigated by analysis of receptor binding to glucocorticosteroid responsive elements using a monomer-dimer equilibrium model. *Biochemistry*, **1996**. 35(5): p. 1634.
98. Savory, J.G., Prefontaine, G.G., Lamprecht, C., Liao, M., Walther, R.F., Lefebvre, Y.A. y Hache, R.J., Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol Cell Biol*, **2001**. 21(3): p. 781.
99. Mikuni, S., Tamura, M. y Kinjo, M., Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy. *FEBS Lett*, **2007**. 581(3): p. 389.



100. Mikuni, S., Pack, C., Tamura, M. y Kinjo, M., Diffusion analysis of glucocorticoid receptor and antagonist effect in living cell nucleus. *Exp Mol Pathol*, **2007**. 82(2): p. 163.
101. Cozzini, P., Kellogg, G.E., Spyraakis, F., Abraham, D.J., Costantino, G., Emerson, A., Fanelli, F., Gohlke, H., Kuhn, L.A., Morris, G.M., Orozco, M., Pertinhez, T.A., Rizzi, M. y Sottriffer, C.A., Target flexibility: an emerging consideration in drug discovery and design. *J Med Chem*, **2008**. 51(20): p. 6237.
102. Henzler-Wildman, K. y Kern, D., Dynamic personalities of proteins. *Nature*, **2007**. 450(7172): p. 964.
103. Hillisch, A., von Langen, J., Menzenbach, B., Droscher, P., Kaufmann, G., Schneider, B., y Elger, W. The significance of the 20-carbonyl group of progesterone in steroid receptor binding: a molecular dynamics and structure-based ligand design study. *Steroids*, **2003**. 68(10-13): p. 869.
104. von Langen, J., Fritzeimer, K.H., Diekmann, S. y Hillisch, A., Molecular basis of the interaction specificity between the human glucocorticoid receptor and its endogenous steroid ligand cortisol. *Chembiochem*, **2005**. 6(6): p. 1110.
105. Ray, D.W., Suen, C.S., Brass, A., Soden, J. y White, A., Structure/function of the human glucocorticoid receptor: tyrosine 735 is important for transactivation. *Mol Endocrinol*, **1999**. 13(11): p. 1855.
106. Gaussian 03, R.C., M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez y J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
107. Godowski, P.J., Rusconi, S., Miesfeld, R. y Yamamoto, K.R., Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. **1987**. 325: p. 365.
108. Kueng, W., Silber, E. y Eppenberger, U., Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*, **1989**. 182(1): p. 16.

109. Pearlman, D.A., Case, D. A., Caldwell, J. W., Ross, W. S., Cheatham Iii, T. E., DeBolt, S., Ferguson, D., Seibel, G. y Kollman, P., AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. . *Comput. Phys. Commun*, **1995**. 91: p. 1.
110. Berendsen, H.J.C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., DiNola, A. y Haak, J. R., Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, **1984**. 81: p. 3684.



**Este trabajo de Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:**

- “New lead compounds in the search for pure antigluocorticoids and the dissociation of antigluocorticoid effects.” Adali Pecci; Lautaro D. Alvarez, Adriana S. Veleiro, Nora R. Ceballos, Carlos P. Lantos, Gerardo Burton. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2009**, 133, 155.
- “Hemisuccinate of 21-hidroxi-6,19-epoxyprogesterona: a novel tissue-specific modulator of glucocorticoide receptor.” Lautaro D. Alvarez, Marcelo A. Martí, Adriana S. Veleiro, Rosana I. Misico, Darío A. Estrin, Adalí Pecci, Gerardo Burton. *ChemMedChem*, **2008**, 3, 1869.
- “Synthesis and GABA<sub>A</sub> receptor activity of oxygen-bridged neurosteroid analogs.” Lautaro D. Alvarez, Adriana S. Veleiro, Ricardo F. Baggio, Maria T. Garland, Valeria C. Edelsztein, Hector Coirini, Gerardo Burton. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **2008**, 16, 3831.
- “Exploring the Molecular Basis of Action of the Passive Antigluocorticoid 21-Hydroxy-6,19-epoxyprogesterone.” Lautaro D. Álvarez, Marcelo A. Martí, Adriana S. Veleiro, Diego M. Presman, Darío A. Estrin, Adalí Pecci, Gerardo Burton. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 51, 1352.



---

# AGRADECIMIENTOS



Debido a las características de esta tesis, durante su transcurso tuve oportunidad de trabajar con investigadores de distintos grupos y distintos departamentos. Felizmente, en todos los casos encontré una muy buena predisposición para llevar a cabo un trabajo interdisciplinario y agradezco a todos ellos por su dedicación, apoyo, interés y aliento constante. Complacido de haber trabajado junto a ellos, espero que podamos seguir haciéndolo en el futuro.

A Adriana Veleiro le quiero agradecer por muchísimos motivos, empezando por haberme invitado a trabajar en el laboratorio allá por el año 2001 y por tratarme con tanto afecto desde entonces. Por enseñarme tantas cosas, en particular a trabajar en la mesada y la forma en que conviene hacer síntesis orgánica. Sin su aporte esta parte de la tesis no habría sido posible en el modo en que lo fue. Le agradezco también por ayudarme a pasar concursos, seminarios, informes, etc, y por desear siempre lo mejor para mí. Siento admiración por su vocación y capacidad para estudiar y comprender nuevos temas. Por haber analizado tantos espectros y por haber leído y ayudado a escribir esta tesis. Gracias Adri, siempre voy a recordar todo lo que hiciste por mí.

Agradezco a Gerardo Burton por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis y por la forma en que la dirigió. La libertad con la que he podido trabajar todo este tiempo me ha permitido desarrollar esta investigación totalmente a gusto y sin presiones. Sus clases, consejos, sugerencias, comentarios y correcciones forman parte invaluable de mi formación científica. Sus amplios conocimientos sobre temas tan diversos, su enorme capacidad de trabajo, y su ejemplar rigor científico no dejarán nunca de asombrarme. Agradezco también su enorme esfuerzo por mantener en condiciones el departamento, particularmente el RMN. Gerardo, me siento halagado de haber sido dirigido por vos. Muchas gracias por el tiempo dedicado.

A Adalí Pecci, porque a pesar de haberme mandado despachar en una de las primeras visitas a su laboratorio, resultó ser la mejor directora de la parte biológica que –imagino– pude tener. Para empezar, le agradezco haberme sugerido cursar Biología Molecular, lo cual considero parte fundamental de esta tesis. Gracias también por enseñarme a pipetear y trabajar en cultivo, y por mostrarme cómo diseñar e interpretar los ensayos biológicos, compartiendo siempre satisfacciones y decepciones. Su alegría diaria y optimismo sobre el próximo experimento sin duda ayudaron que haya persistido, en el muchas veces ingrato mundo de la biología molecular. También quiero agradecerle el contacto con el grupo de Modelado Molecular y las numerosas conversaciones sobre el mecanismo de acción del GR que mantuvimos, fuente de inspiración para el desarrollo de esta tesis. Gracias Ada, por todo esto y por la amistad de estos años.

A Darío Estrín y Marcelo Martí, por haber aceptado colaborar con este trabajo y brindado los recursos necesarios para su realización. Siempre estaré agradecido por su recomendación de utilizar la simulación por dinámica molecular en aquella primera reunión; el tiempo me mostró lo adecuado de esa decisión. A Darío por haberme permitido ingresar a su grupo, por ayudarme a interpretar los primeros resultados y por las continuas palabras de aliento durante el aprendizaje. Sin lugar a dudas, mi pasión por el modelado molecular fue iniciada por sus excelentes clases en FQ y Química Cuántica. A Marcelo, porque a pesar de su vertiginosa forma inicial de explicar



cómo usar los programas, finalmente resultó ser exactamente quien precisaba para resolver los inconvenientes y explicar cómo y para qué usar la simulación. Su buena predisposición y sus claras y concisas instrucciones me ahorraron mucho tiempo de trabajo, mientras que sus sugerencias resultaron muy valiosas.

A mis compañeros del laboratorio de química orgánica les quiero agradecer por haber compartido estos ocho años. En todo momento encontré un grupo dispuesto a trabajar en un clima relajado, solidario y constantemente divertido. Para empezar, le quiero agradecer a Pablo Di Chenna por haberme mostrado cómo funcionaba el laboratorio en aquellos tiempos en que éramos tan pocos, cuando solo a él podía molestar. A Alberto Ghini por su calidez, por las amenas charlas y por haberme ayudado con el seminario de síntesis. A Rosana Misico, por compartir tantas horas tan cerca y ayudarme generosamente con la burocracia del sistema. A Fernando Durán, por los consejos sobre algunas reacciones y por su buen humor permanente. A las *chamas* y amigas del laboratorio, María Victoria Mañalich, María Virginia Dansey y Mayra Yosy Machado, por la buena onda, las risas, la ayuda –pero por favor cambien esa música...–. Lamento un poco, bastante, no haber compartido más años de mesada todos juntos. Gracias, Vicky, por la amistad durante este tiempo. A Silvina Eduardo por confiar en mis ideas y por la paciencia que ha tenido mientras escribía la tesis. A Juan Manuel Sonogo, por la compañía nocturna llena de chistes, algunos muy buenos, otros muy malos, y por los no pocos favores hechos. A Evelín Bonifazzi y Valeria Edelzstein. A los más jóvenes Mario Martínez y Miguel Morrone. A Paula Taich y Alejandro Pato. Por último, quiero volver agradecer a todos aquellos que me hayan hecho espectros de RMN.

A mis compañeros *peccis*, Diego Presman, Leonardo Romorini y Esteban Hoiyman, les estaré por siempre agradecido por tantas cosas que resulta imposible escribirlas. Gracias por integrarme sin prejuicios desde el primer momento, haciéndome sentir uno más del grupo. Por la forma de trabajar, compartiendo ideas y resultados, aprendiendo así sobre apoptosis, glucocorticoides y mamas. El interés de todos por el trabajo de cada uno me parece una parte fundamental del unido grupo que fuimos. Por el divertido y relajado ambiente que había en el laboratorio, el cual ayudó a superar el primer tiempo de decepciones y hacer que volviera cada día. Por la solidaridad en compartir el material, reactivos, soluciones, etc. Por las charlas cuando solo bajaba a visitar, en las cuales solíamos coincidir en temas tanto científicos como no científicos. Por último, quiero que sepan que la pasé muy bien en los congresos, y aun mejor en los paseos.

En relación con la tesis, a Diego le agradezco su ayuda en cuestiones estadísticas, por facilitarme algunos plásmidos y por hacer el ensayo para ver la translocación del GR. Le agradezco mucho por haberme hecho partícipe de su trabajo y haber confiado en mis ideas. Fue un placer haber pensado, realizado y discutido juntos tantos experimentos, y estoy muy satisfecho con el resultado alcanzado. A Leo le quiero agradecer por su amable disposición para mostrarme cómo funcionaba el laboratorio, por compartir tantas charlas y por su actitud hacia los

experimentos fallidos que me enseñó a entender cómo asimilarlos. Y también por aquel partido de tejo en la playa, aunque me hayas ganado. A Quito, por su alegría y humor que siempre me hicieron reír. Por su actitud científica, y por señalar los detalles, e injusticias, del sistema del cual formamos parte. Con esa envidiable tendencia a pasarla bien fuiste una gran compañía durante estos años.

Agradezco al resto de los integrantes del laboratorio de Adalí, Andrés, Dieguito, Luciana, Julieta e incluso a Paola. Les agradezco también por lo bien que me trataron siempre a Edith, Ana, Popi, Nati R. y Nati F., Vicky y Esteban. A los *canepas* con los cuales compartí los congresos. Al Dr. Carlos Lantos por interesarse en mi trabajo y transmitirme la pasión por los aspectos evolutivos de los esteroides y los receptores. A todos los integrantes del grupo de Modelado Molecular de química inorgánica, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme a solucionar los problemas técnicos, como Luciana, Pablo, Matías, Santiago, Ariel y muchos más de los que no recuerdo –o nunca supe– su nombre. A mis compañeros de docencia durante estos años de los cuales tanto aprendí y que hicieron agradables las horas de clases en el laboratorio: Diego Navarro, Amelia Salinas (Pimpi), Pau Arroyo, Lara Cagnaz, Gustavo Vasen, Adriana Cirigliano, Gastón Siless, Leandro Monsalve, Pablo Barrios y Álvaro Vázquez. Agradezco a los profesores de la facultad que de alguna manera u otra me ayudaron: Marta Maier, Carlos Stortz, Eduardo Cánepa, Jorge Palermo, Rosa Erra Balsells, Silvia Moreno, María Cristina Matulewicz y Eli Jares.

Agradezco al Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, por haberme brindado la oportunidad y el lugar de trabajo para realizar esta tesis y al CONICET por la beca otorgada. A Ana Burton por su paciencia y su amable y desinteresada colaboración. A María del Carmen por la incalculable ayuda con el papelerío, que me salvó en unas cuantas ocasiones. A Sergio Jacobo por su alegre contribución, y los saludos constantes.

Esta tesis está dedicada a mis padres, Clara y Oscar, a quienes agradezco por su amor y comprensión, y por darme la oportunidad de elegir y estudiar esta carrera. A mi hermana Moira por transmitirme la pasión por las ciencias exactas y por el apoyo a la distancia; a Dave, por la clave mágica. A mi hermano Camilo, por tantas horas de diversión dentro y fuera de la cancha. A Amalia y Lidia Carrara, por su calidez. A mis amigos de siempre: Bachi, Uli, Caba, Ciuli, Loys, Tinzi, Pedro, Tomás, Galle y Nesti.

Finalmente, quiero agradecerle a mi mujer Sara porque sin ella nada de esto hubiese sido posible. Por la felicidad de compartir cada día de estos hermosos 11 años. Por bancar mis horarios nocturnos. Por todo, gracias Sari.

Con absoluta sinceridad, mi agradecimiento a todos de los que hice mención y a los que haya olvidado, ya que con su aporte hicieron posible esta tesis.

