

## LA BIOGENESIS DE BUFADIENOLIDOS

por *Eduardo G. Gros* \*

El haber sido designado miembro titular de esta prestigiosa Corporación es para mí un extraordinario honor que recibí con inmensa alegría pero también con una gran sensación de temor porque tener que ocupar el sitio dejado vacante por el Dr. Venancio Deulofeu significaba una distinción que consideraba más allá de mis merecimientos dadas las singulares cualidades de mi predecesor en el puesto.

Sin pretender ser exhaustivo acerca de la labor del Dr. Deulofeu en la Química Orgánica basta sólo considerar lo realizado en dos grandes campos para valorar su inigualable obra. Estos son: el estudio de la química de los hidratos de carbono y sus derivados en el que formó una gran cantidad de discípulos, que aún hoy, los discípulos de sus discípulos siguen cultivando, por lo que fundó una escuela que todavía al presente es la única existente en Latinoamérica, y por la línea de trabajos en el tema de los productos naturales de vegetales que se extendió no sólo en el ámbito de nuestra Universidad sino también a diferentes centros nacionales y del extranjero, fundamentalmente a países del área latinoamericana, donde siempre reconocieron al Dr. Venancio Deulofeu como uno de los iniciadores, si no el primero, de este tipo de investigaciones. Su desempeño como docente universitario y como investigador trajo aparejada la formación de destacados químicos orgánicos que llevaron sus enseñanzas a los ámbitos académicos e industriales tanto del país como del exterior en los que lucieron y lucen por sus dotes personales pero también por lo aprendido del maestro Deulofeu que fundamentalmente transmitió su amor por la ciencia y por el trabajo sin desmayos ni claudicaciones.

Uno de los temas en los que incursionó el Dr. Venancio Deulofeu fue el estudio químico de los componentes del llamado "veneno" de sapos, por lo que, vinculado con ese tema, para esta ocasión he elegido presentar los trabajos que hemos realizado con algunos de los compuestos que forman parte de ese "veneno", los bufadienólidos, pero considerando no su química sino su biogénesis.

Los bufadienólidos son productos de tipo esterooidal que se caracterizan, estructuralmente, por poseer un anillo  $\alpha$ -pirona (lactona de seis

\* Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pabellón 2, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires.

miembros doblemente insaturada) como cadena lateral del sistema tetracíclico esteroidal y biológicamente, por poseer acción cardiotónica, es decir, con actividad fisiológica sobre el músculo cardíaco.

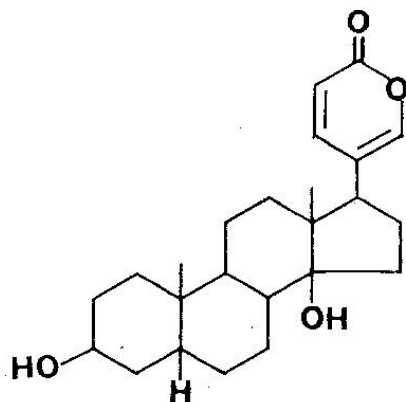


FIG. 1. — Estructura de un bufadienólido.

Un aspecto destacable de los bufadienólidos es que se presentan en la naturaleza en ciertos animales y en ciertos vegetales, hecho no común en el campo de los metabolitos secundarios al que pertenecen los compuestos mencionados.

Los animales, como ya se indicó, son los sapos que poseen en la piel glándulas productoras de una compleja mezcla de sustancias (denominada en forma genérica "veneno" dadas las propiedades fisiológicas que tiene) entre las que se encuentran los bufadienólidos. Por otra parte, las plantas productoras de bufadienólidos pertenecen a las familias Liliaceae (géneros *Scilla*, *Urginea* y *Bowiea*), Ranunculaceae (género *Helleborus*) y Crassulaceae (género *Kalanchoe*).<sup>1, 2</sup>

Para llevar a cabo un estudio de biogénesis en un organismo vivo uno de los métodos más comunes que utilizan los químicos orgánicos consiste de los siguientes pasos (presentados en forma esquemática en la figura 2):

- 1) preparar en forma sintética un compuesto que se sospeche, por conocimientos previos sobre metabolismo general, pueda actuar como precursor del compuesto que se estudia e introducir durante ese proceso sintético una marcación isotópica (simbolizada por la letra U) comúnmente de carbono-14 o de tritio (ambos isótopos radiactivos);
- 2) inocular el compuesto marcado en el organismo (vegetal o animal) productor del compuesto cuyo mecanismo de biosíntesis se desea establecer;
- 3) luego de períodos variables se debe extraer el producto deseado (en algunos casos, plantas, sacrificando al organismo) o como

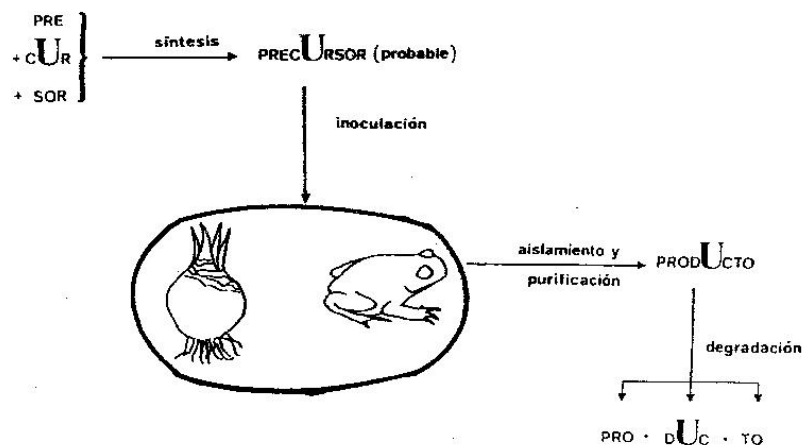


FIG. 2. — Secuencia de pasos para el estudio de un proceso biogénico.

en el caso de los sapos extrayéndole el “veneno” sin sacrificar al animal;

- 4) determinar si el compuesto en estudio resultó marcado;
- 5) si éste fue el caso, estudiar al compuesto mediante métodos físicos y/o químicos para determinar la posición de la marcación, por ejemplo, si se utilizó carbono-14 se debe determinar qué carbono o carbonos resultaron marcados luego de la experiencia.

Dado el origen isoprenoide de los bufadienólidos nuestro primer ensayo consistió en inyectar ácido mevalónico-2-<sup>14</sup>C a sapos *Bufo paracnemis*. Al cabo de 18 días se obtuvo el “veneno” de los animales inyectados, el que resultó radiactivo por lo que se procedió a aislar y purificar los esteroides (en ese momento conocido como  $\gamma$ -sitosterol) y los bufadienólidos resinobufagina, bufalina, marinobufagina y telocinobufagina.

Para nuestro desencanto, los bufadienólidos no tenían radiactividad, la que estaba localizada en el llamado  $\gamma$ -sitosterol.<sup>3, 4</sup> Paralelamente uno de los sapos fue sacrificado y de su hígado y vesícula biliar se aisló colesterol el que efectivamente, y como era de esperar, había resultado marcado en una magnitud un poco mayor que la encontrada para el  $\gamma$ -sitosterol.

Es de indicar que posteriormente, cuando hicimos análisis por cromatografía gaseosa, se estableció que el  $\gamma$ -sitosterol no tiene identidad como tal sino que es una mezcla de colesterol, campesterol, estigmasterol y sitosterol con predominio del primero. Como dato adicional deseo comentar que tiempo después los componentes del  $\gamma$ -sitosterol radiactivo fueron separados por cromatografía líquida de alta resolución y se determinaron las radiactividades individuales confirmándose un resultado previsible: que el único producto marcado era el colesterol mientras que los esteroides restantes (propios de vegetales) no tenían radiactividad.<sup>5</sup>

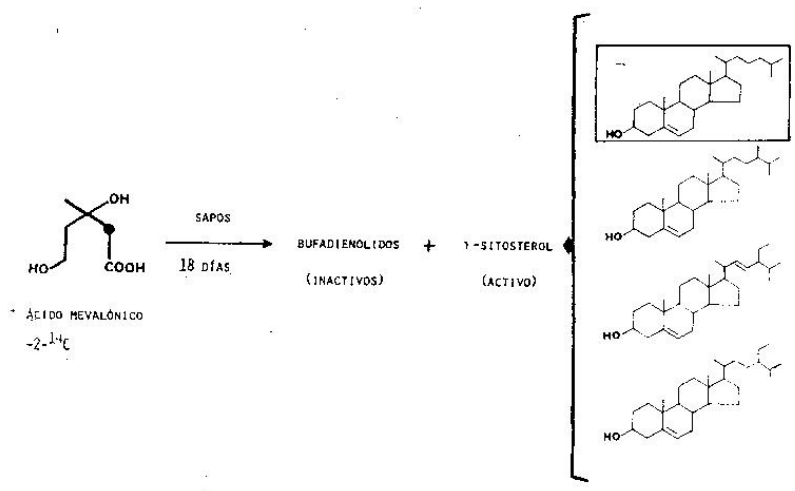


FIG. 3. — Resultados de la inoculación de ácido mevalónico-2<sup>14</sup>C a sapos *Bufo paracnemis*.

La falla de incorporación de ácido mevalónico en los bufadienólidos abrió un interrogante que fue aclarado varios años después pero que en ese momento no pudo ser explicado.

Dado que los cardenólidos están estructuralmente relacionados a los bufadienólidos (ver figura 4) y que en nuestro trabajo con cardenólidos se había encontrado que el camino de la biogénesis pasaba por

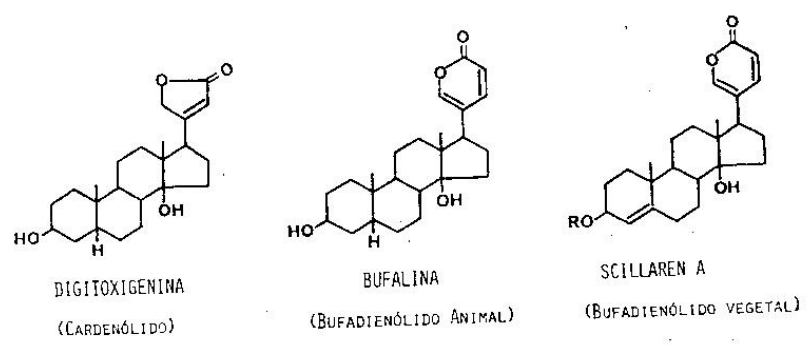


FIG. 4. — Relación estructural entre cardenólidos y bufadienólidos.

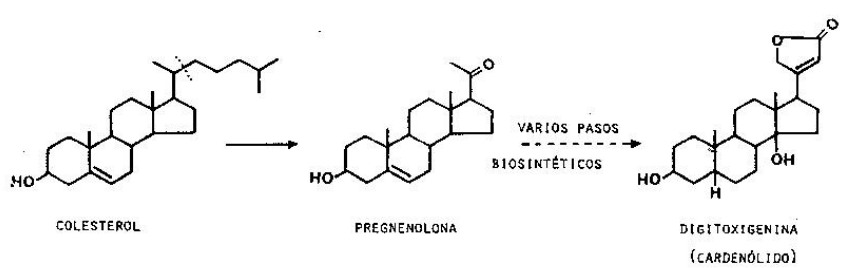


FIG. 5. — Mecanismo de la biogénesis de cardenólidos en plantas del género *Digitalis*.

un intermediario de tipo 20-ceto-pregnano, tal como se muestra en la figura 5, <sup>6,7</sup> sintetizamos <sup>3</sup>pregnenolona-20-<sup>14</sup>C la que fue inoculada en ensayos paralelos a sapos *B. paracnemis* y a ejemplares de la planta *Scilla maritima* aguardando en esa oportunidad tiempos distintos para cada caso. Los resultados indicaron que mientras la pregnenolona era incorporada en el bufadienólido vegetal (scilirósido) no lo era en los bufadienólidos del sapo, <sup>9</sup> tal como se indica en figura 6.

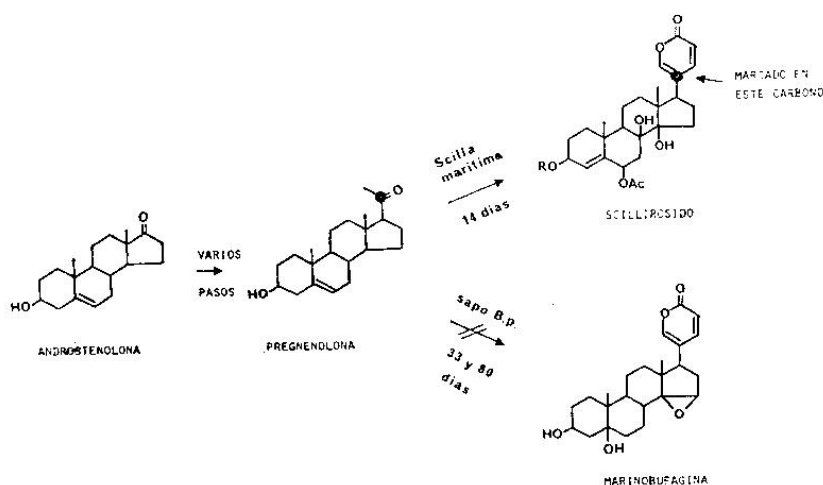


FIG. 6. — Síntesis de pregnenolona-20-<sup>14</sup>C y resultados de su administración a plantas *Scilla maritima* y a sapos *Bufo paracnemis* (la posición de la marcación isotópica con carbono-14 está indicada con el punto grueso).

Estos resultados bifurcaron las investigaciones, ya que mientras en el caso de vegetales el proceso podría ser similar al encontrado para los cardenólidos (también productos vegetales), en el caso de los animales todavía no habíamos logrado resultados orientadores.

Para completar el estudio de la biogénesis de bufadienólidos vegetales y llegar a establecer el origen de los 3 carbonos necesarios para formar el anillo  $\alpha$ -pirona se efectuaron numerosos ensayos con diversos compuestos de 3 ó 4 carbonos específicamente marcados. <sup>10</sup> Los resultados (fig. 7) apuntaron a que muy probablemente el oxalacetato o un metabolito vinculado al mismo es el que condensa con el intermediario 20-ceto-pregnano para producir el bufadienólido luego de completar una serie de pasos no muy dificultosos de predecir y de llevar a cabo por el vegetal. <sup>11, 12</sup>

Con estos resultados el proceso de biogénesis de bufadienólidos vegetales quedó aclarado en cuanto a las etapas fundamentales restando estudiar detalles referentes a las etapas de hidroxilaciones y deshidrataciones; en el caso de los bufadienólidos de sapo aún no teníamos ideas sobre qué proceso actuaría.

El siguiente ensayo consistió en sintetizar <sup>13</sup> colesterol-20-<sup>14</sup>C e in-

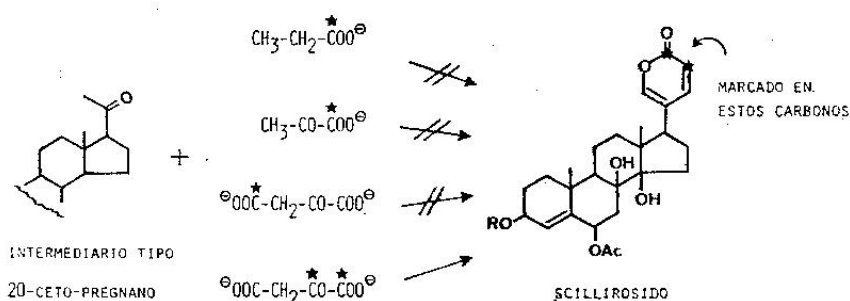


FIG. 7. — Origen biogénico de los 3 carbonos necesarios para completar el anillo lactónico de un bufadienólido vegetal en la planta *Scilla maritima* (las posiciones con marcaciones isotópicas con carbono-14 están indicadas por los asteriscos).

yectarlo en ejemplares del *B. paracnemis*. En esta experiencia se abrió una pista ya que el ensayo, tal como se muestra en figura 8, rindió resultados positivos.<sup>14, 15</sup>

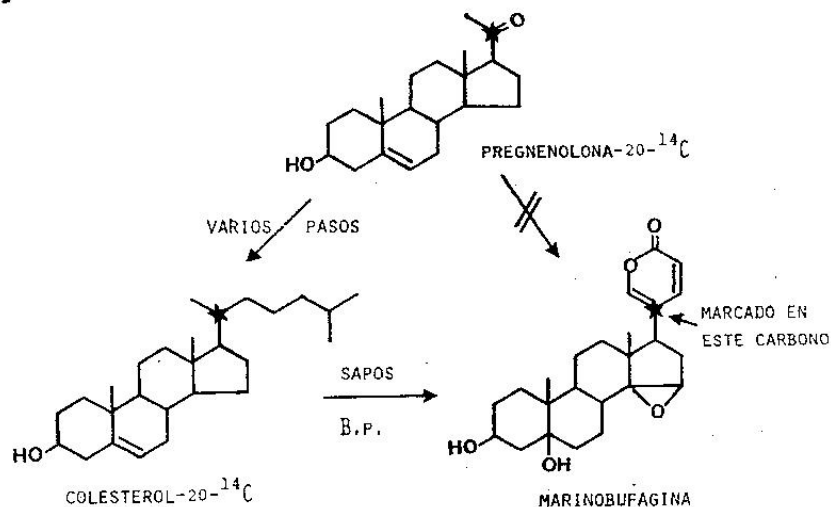


FIG. 8. — Síntesis de colesterol-20-<sup>14</sup>C y resultado de su inoculación a sapos *Bufo paracnemis* (la posición con la marcación isotópica está indicada por el asterisco).

Considerando los dos últimos resultados con animales, la no incorporación del 20-ceto-pregnano marcado en C-20 y el resultado positivo obtenido con el colesterol marcado en C-20, resultó tentador postular que el intermediario precursor de los bufadienólidos de sapo sería un compuesto con cadena lateral de tipo ácido biliar (fig. 9). Un intermediario como tal tendría todos los carbonos necesarios para formar el anillo  $\alpha$ -pirona no necesitando unidades adicionales.

Para probar esta hipótesis se sintetizaron <sup>16-18</sup> colesterol-24-<sup>14</sup>C y ácido 3 $\beta$ -hidroxi-col-5-enoico-24-<sup>14</sup>C, los que fueron utilizados en experiencias separadas con ejemplares de *B. paracnemis*. Como se puede

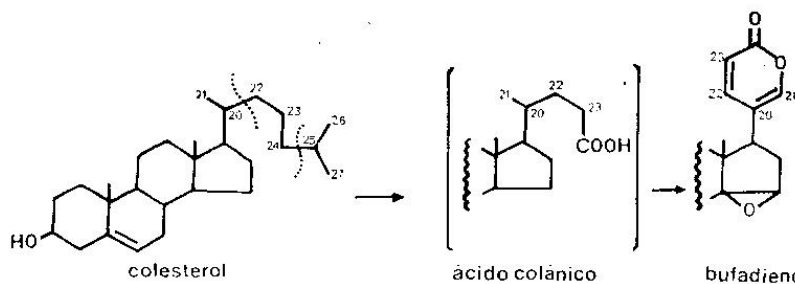


FIG. 9. — Probable camino biogénico a un bufadienólido animal a través de un intermediario tipo "ácido biliar".

apreciar en figura 10, se lograron resultados negativos por lo que la hipótesis del intermediario tipo ácido biliar debió ser descartada.<sup>19</sup>

Estos resultados negativos nos hicieron pensar que otros factores eran los que estaban impidiendo la llegada de los precursores al sitio de biosíntesis, es decir a la glándula, y que probablemente deberíamos retornar a la primera hipótesis de trabajo que era la intervención de un intermediario tipo pregnano.

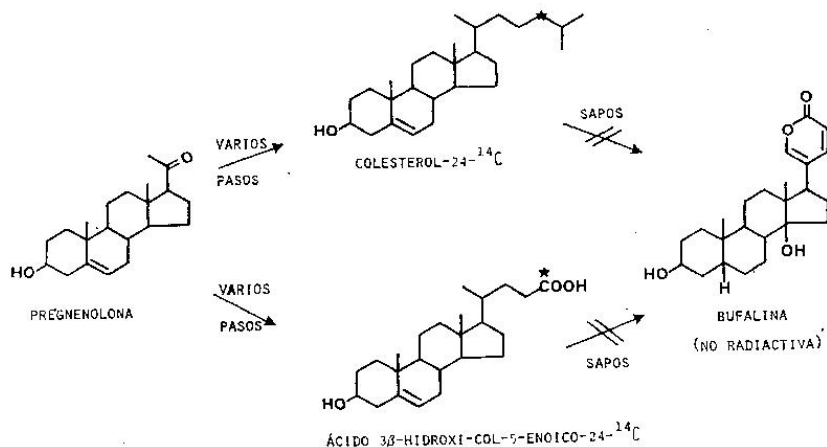


FIG. 10. — Síntesis de colesterol-24-<sup>14</sup>C y de ácido 3β-hidroxi-col-5-enoico-24-<sup>14</sup>C y resultados de las respectivas inoculaciones a sapos *Bufo paracnemis* (las posiciones isotópicamente marcadas con carbono-14 están indicadas con asteriscos).

Para ello realizamos una nueva síntesis de un producto de tipo 20-ceto-pregnano,<sup>20</sup> pero modificando la configuración entre los anillos A y B construyendo el sistema A/B *cis* que es la configuración de los bufadienólidos de sapo.

La experiencia de inoculación de esta 5β-pregnanolona-20-<sup>14</sup>C a sapos *B. paracnemis* (fig. 11) volvió a proporcionar resultados negativos<sup>19</sup> corroborando el resultado anterior en el sentido que los compuestos de tipo 20-ceto-pregnanos con sistema Δ<sup>5</sup> o aun con sistema A/B *cis* o *no*

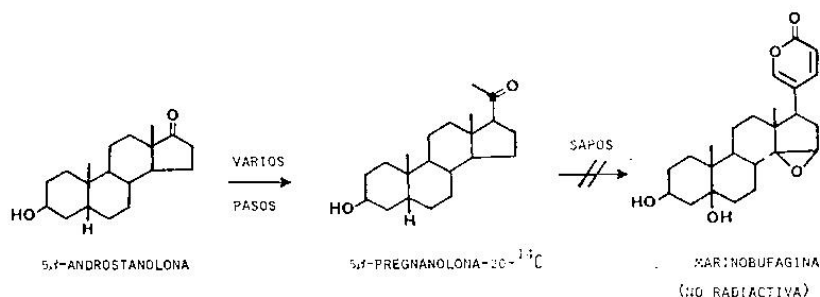


FIG. 11. — Síntesis de 5 $\beta$ -pregnanolona-20-<sup>14</sup>C y resultado de su inoculación a sapos *Bufo paracnemis* (la posición isotópicamente marcada está indicada con el asterisco).

son intermediarios en el proceso biogénético o no pueden acceder al lugar de biosíntesis.

Para probar estas alternativas se llevaron a cabo dos tipos de experiencias: por una parte se usaron como antes sapos intactos mientras que por otro lado se realizaron ensayos utilizando cultivos de tejido glandular de sapo; para ambos propósitos se utilizó el sapo *Bufo arenarum*.

Realizando estudios de incorporación de conocidos precursores del colesterol (como el ácido mevalónico) en cultivos de tejido de glándula parótida y comparando con ensayos similares efectuados con tejido hepático del mismo animal, se estableció (ver fig. 12) que el tejido hepático biosintetizaba colesterol mientras que el tejido glandular no lo hacía.<sup>21</sup>

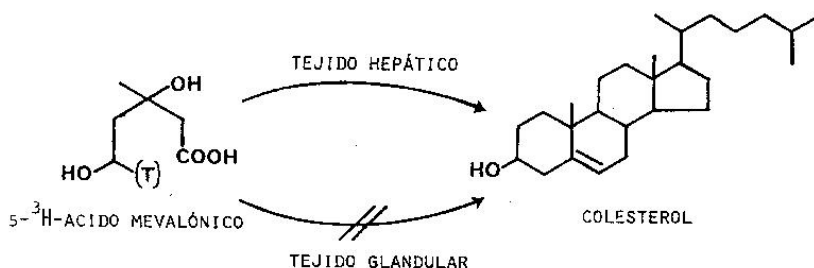


FIG. 12. — Experiencias de biosíntesis de colesterol en tejido hepático y en tejido de glándula parótida de sapo *Bufo arenarum*.

Conjuntamente, mediante una serie de experiencias con las lipoproteínas aisladas de plasma de sapos, ensayos de unión de esas lipoproteínas a tejido de glándula parótida mediante análisis de Scatchard utilizando lipoproteínas marcadas con <sup>125</sup>I, y mediante pruebas de incorporación en tejido glandular de linoteado de colesterilo-<sup>3</sup>H ligado a las lipoproteínas, se llegó a postular que: a) el colesterol, fuente primaria para la biogénesis de bufadienólidos, no es biosintetizado *de novo* por la propia glándula sino que es biosintetizado en otros órga-



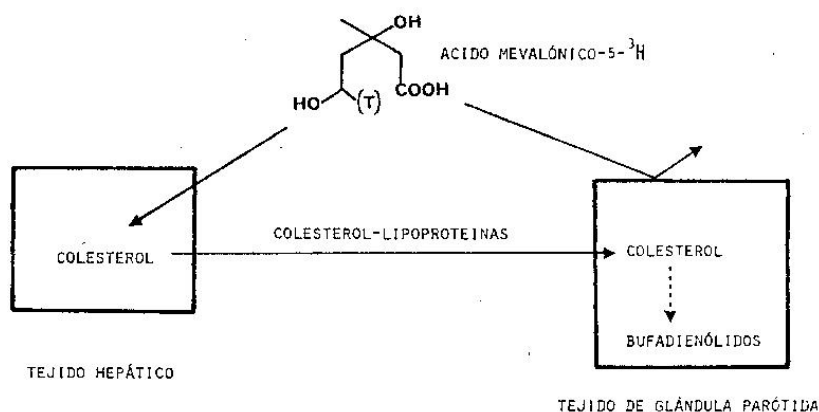


FIG. 13. — Biosíntesis de colesterol en tejido hepático, su transporte por lipoproteínas y su penetración en la glándula productora de bufadienólidos.

nos (hígado) o absorbido por el intestino; b) es transportado por las lipoproteínas circulantes en el torrente sanguíneo y c) es incorporado en la glándula por un mecanismo mediado por receptores (fig. 13) <sup>21</sup>.

En cuanto a los ensayos con sapos intactos, preparamos sintéticamente <sup>22,23</sup>  $5\beta$ -pregnanolona-21-<sup>14</sup>C y coprostanol-21-<sup>14</sup>C los que fueron inoculados en sapos *B. arenarum*. Los resultados logrados (fig. 14) se-

ñalaron nuevamente la falla del compuesto tipo 20-ceto-pregnano para actuar como precursor de los bufadienólidos mientras que el coprostanol resultó incorporado en los mismos luego de un lapso de tiempo considerable desde la inoculación <sup>24</sup>.

Estos resultados unidos a los anteriores logrados con cultivos de tejidos (glándula e hígado) pueden racionalizarse como se esquemati-

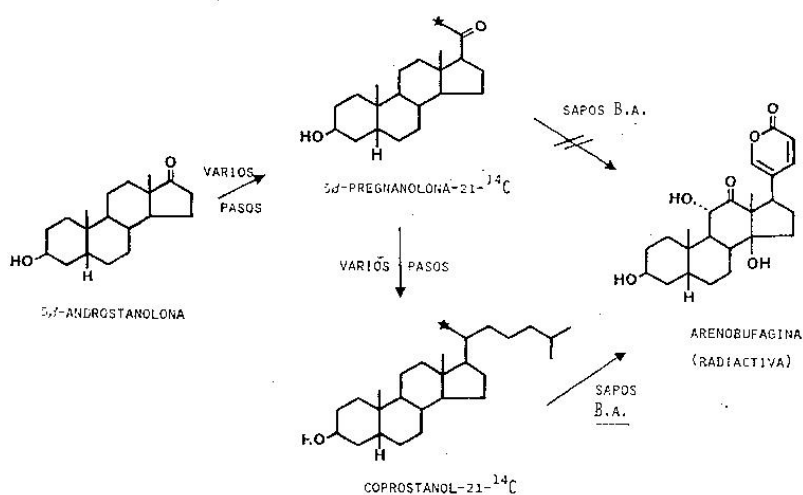


FIG. 14. — Síntesis de  $5\beta$ -pregnanolona-21-<sup>14</sup>C y de coprostanol-21-<sup>14</sup>C y resultados de las respectivas inoculaciones a sapos *Bufo arenarum* intactos (las posiciones isotópicamente marcadas están indicadas con asteriscos).

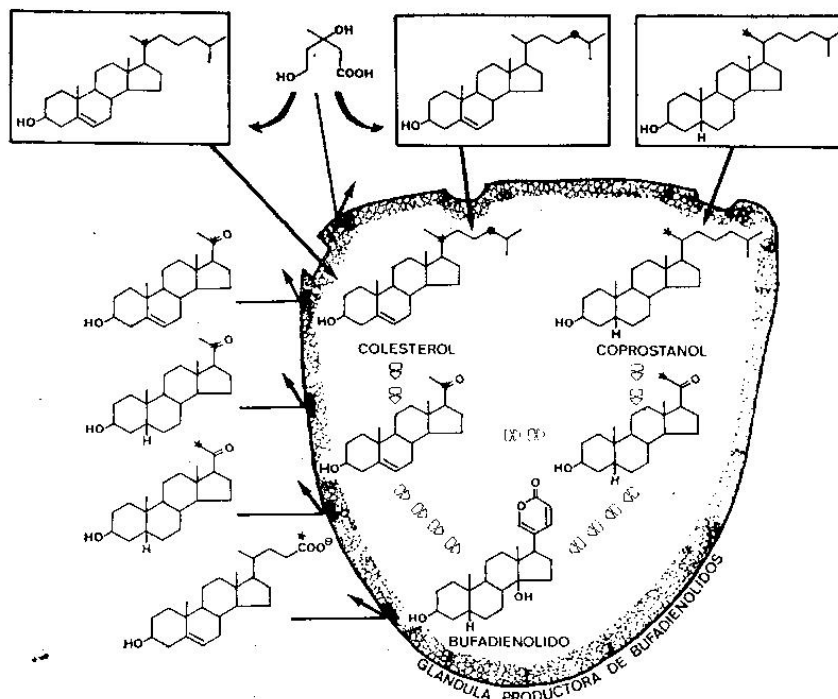


Fig. 15. — Mecanismo de la biogénesis de bufadienólidos en sapos. Los pasos postulados en el interior de la glándula no han sido aún demostrados.

za en la figura 15 aceptado que la glándula *per se* no biosintetiza colesterol sino que lo toma de otras fuentes y que para acceder al sitio de biosíntesis de bufadienólidos existe un requerimiento estructural, formalmente una cadena lateral de tipo colesterol. Este esterol o un compuesto muy relacionado ya en el interior de la glándula puede ser transformado en bufadienólidos por una vía aun no aclarada pero muy probablemente a través de un 20-ceto-pregnano, dados los resultados positivo con colesterol-20- $^{14}\text{C}$  y negativo con colesterol-24- $^{14}\text{C}$ .

Este proyecto iniciado hace muchos años nos ha llevado luego de numerosas experiencias, algunas de las cuales han sido comentadas en esta disertación mientras que otras han sido omitidas en beneficio de una más clara descripción de los resultados, al logro de datos concretos por una parte y por otra a la proposición de interesantes hipótesis que abren nuevas posibilidades de investigación que intentaremos llevar a cabo en el futuro.

Ortega y Gasset describió a la ciencia experimental como un ideal y que los conocimientos de hoy desmienten a los del pasado mientras que los del futuro desmentirán a los del presente; confío en que su apreciación no sea aplicable en forma absoluta al tema comentado.

Todos los trabajos a los que me he referido así como muchos otros realizados en otros temas han podido llevarse a cabo por la participación de muchos colaboradores a quienes agradezco sus aportes personales así como su dedicación, empeño y esfuerzo.

También agradezco a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Secretaría de Ciencia y Técnica y a la Organización de los Estados Americanos por el apoyo brindado a nuestros trabajos.

#### REFERENCIAS

1. L. F. FIESER & M. FIESER, 1959. *Steroids*, Reinhold Publish. Corp., New York.
2. E. HEFTMANN, 1970. *Steroid Biochemistry*, Academic Press, New York.
3. E. G. GROS & A. M. PORTO, 1967. *An. Asoc. Quím. Argent.*, 55, 177.
4. E. G. GROS & V. DEULOFEU, 1967. *Chem. Commun.* 711.
5. H. M. GARRAFO, & E. G. GROS. Resultados no publicados.
6. E. LEETE, H. GREGORY & E. G. GROS, 1965. *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 3475.
7. E. G. GROS & E. LEETE, 1965. *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 3479.
8. A. M. PORTO & E. G. GROS, 1968. *J. Lab. Compds.*, 4, 276.
9. A. M. PORTO & G. GROS, 1970, *Experiencia*, 26, 11.
10. L. R. GALAGOVSKY, A. M. PORTO & E. G. GROS, 1981. *J. Lab Compds. Radiopharm.*, 18, 1235.
11. L. R. GALAGOVSKY, A. M. PORTO, G. BURTON, M. S. MAIER, A. M. SELDES & E. G. GROS, 1982. *An. Soc. Quím. Argent.*, 70, 327.
12. L. R. GALAGOVSKY, A. M. PORTO, G. BURTON & E. G. GROS, 1984. *Z. Naturforsch.*, 39c, 38.
13. A. M. PORTO & E. G. GROS, 1970. *J. Lab. Compds.*, 6, 369.
14. A. M. PORTO & E. G. GROS, 1971. *Experiencia*, 27, 506.
15. A. M. PORTO, F. E. BARALLE & E. G. GROS, 1972, *J. Steroid Biochem.*, 3, 11.
16. A. O. COLONNA & E. G. GROS, 1973. *J. Steroid Biochem.*, 4, 171.
17. G. BURTON & E. G. GROS, 1977. *J. Steroid Biochem.*, 8, 69.
18. G. BURTON & E. G. GROS, 1977. *J. Lab. Compds.*, 13, 627.
19. H. M. GARRAFO, G. BURTON, A. M. PORTO & E. G. GROS, 1982. *An. Asoc. Quím. Argent.*, 70, 743.
20. H. M. GARRAFO & E. G. GROS, 1982. *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, 19, 149.
21. T. A. SANTA COLOMA, H. M. GARRAFO, O. P. PIGNATARO, E. H. CHABRÉAU & E. G. GROS, 1984. *Steroids*, 44, 11.
22. M. E. DELUCA, A. M. SELDES, H. M. GARRAFO & E. G. GROS, 1984. *Z. Naturforsch.*, 39b, 1617.
23. H. M. GARRAFO, M. E. DELUCA, A. M. SELDES & E. G. GROS, 1985. *J. Lab. Compds. Radiopharm.*, 22, 673.
24. H. M. GARRAFO & E. G. GROS. *Steroids*, en prensa.