

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO TESTOSTERONA-6-ACA-DEXTRANO USANDO MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE LIGANDOS

L. FIGUEROA VALVERDE¹, H. CONTLA LUNA², ABELARDO CAMACHO-LUIS³, G. CEBALLOS REYES⁴, R. YÁNEZ AVILA⁴ y C. CASTILLO HENKEL⁴

¹) Departamento de Farmacología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Avda. Mendez # 2838, Villahermosa Tabasco, México. Correo electrónico: **lauro_1999@yahoo.com**

²) Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

³) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

⁴) Escuela Superior de Medicina del I.P.N.

RESUMEN

El polímero *testosterona-6-ACA-dextrano*, fue preparado por métodos de inmovilización de ligandos. Este complejo macromolecular fue sintetizado en diversas etapas; a) enlace covalente del brazo espaciador *ácido amino caproico* (ACA) al dextran, b) enlazando el *TBDMSO-testosterona-6-hidroxi* al *dextrano-ACA* y c) remoción del grupo protector (*TBDMSO*) en el conjugado *TBDMSO-testosterona-6-ACA-dextran* con *ácido fluorhídrico*. Los resultados obtenidos por técnicas espectroscópicas mostraron que el número de residuos de testosterona en el complejo macromolecular *testosterona-6-ACA-dextrano* fueron 3×10^{-5} mmol. Además, la estimación basada sobre espectroscopia de ultravioleta (UV) sugiere que el *dextrano* no modifica la curva de absorción del esteroide.

Palabras claves: Macromolécula, inmovilización, espectroscopia, dextrano, testosterona-6-ACA-dextrano, ácido amino caproico.

ABSTRACT

The testosterone-6-ACA-dextran polymer was prepared by immobilization-methods of ligands. This macromolecular complex was synthesized in diverse stages; a) covalent binding of spacer arm 6 aminocaproic acid (ACA) to dextran, b) binding TBDMSO-testosterone-6-hydroxy to ACA-dextran, and c) removal of the protective group (TBDMSO) in the TBDMSO-testosterone-6-ACA-dextran conjugate with fluoridric acid. The results obtained by spectroscopy techniques showed that the number of rests of testosterone in the macromolecular testosterone-6-ACA-dextran complex was 3×10^{-5} mmol. In addition, the estimates based upon ultraviolet spectroscopy suggest that the dextran does not modify the absorption curve of the steroid.

INTRODUCCIÓN

En la literatura existen pocos reportes de transformaciones sintéticas de esteroides enlazados a polímeros (1), esto puede ser debido a el uso de tecnologías corrientes ó porque los esteroides contienen grupos funcionales que no fácilmente reaccionan con otras sustancias. Los métodos de inmovilización pueden ser una alternativa para el acoplamiento de esteroides a macromoléculas (2). Es importante mencionar, que desde la década pasada las técnicas de inmovilización de ligandos se han incrementado considerablemente, por lo tanto se han convertido en una herramienta de investigación en diversos campos como son las áreas de biomédica y química orgánica. Esta metodología de afinidad de inmovilización de ligandos es usada generalmente cuando los objetivos consideran dispositivos de purificación de soluciones, modificación ó catálisis para efectuar transformaciones específicas y herramientas de separación para producir determinaciones analíticas (3).

Las técnicas de inmovilización química, son basadas sobre el acoplamiento de ligandos a macromoléculas (soporte), esas macromoléculas pueden ser cualquier soporte sintético, por ejemplo; derivados de acrilamida y metacrilato ó soportes naturales dentro de los que se encuentran agarosa, celulosa y dextranos. En este sentido, es importante mencionar que los dextranos tienen en su estructura abundantes grupos hidroxilo (4), que pueden ser activados y biotransformados por diversas sustancias, ejemplo de ello es el peryodato de sodio NaIO_4 . Es así, que dichos grupos funcionales después de su activación están listos para acoplarse a ligandos específicos (5).

En este último contexto, con respecto a la selección del ligando para métodos de inmovilización, este es influenciado por dos factores; 1) el ligando puede tener especificidad y afinidad hacia el soporte; 2) debe tener grupos químicamente modificables que permitan que sea unido al soporte sin destruir su actividad (6). Por lo tanto, es importante considerar la estructura química del ligando teniendo en cuenta los grupos funcionales que son viables para el acoplamiento con el soporte y además la longitud de la cadena química del ligando que servirá como un brazo espaciador entre el soporte y otra molécula que se quiera acoplar. Los brazos espaciadores pueden ser moléculas de bajo peso molecular y generalmente cadenas hidrocarbonadas lineares con grupos funcionales en ambos extremos para facilitar el acoplamiento del ligando al soporte (7) es así, que la selección que este espaciador permitirá la funcionalidad conveniente del complejo ligando-soporte. Además, el propósito de este brazo espaciador es evitar algún impedimento estérico que el soporte pudiera tener cuando interactúe con el ligando. Es importante mencionar, que se ha postulado que la longitud del brazo espaciador para el acoplamiento con polímeros (soporte) debe fluctuar entre 6 y 10 átomos para que este tenga bastante flexibilidad y no limite su libre movimiento para la interacción con otras moléculas (8).

En este sentido, en este estudio, que envuelve el enlace del derivado de testosterona hacia el dextrano, fue necesario que el brazo espaciador tuviera 7 átomos de identidad química. En este contexto, el espaciador seleccionado fue el ácido amino caproico

que provee un grupo amino primario en uno de sus extremos y un grupo carboxilo en el otro. Este espaciador fue usado para crear un grupo carboxilo terminal sobre el dextrano (soporte) que fue indispensable para el acoplamiento con el esteroide.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales. Las curvas de espectroscopia de ultravioleta (UV) fueron medidas en metanol sobre un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 552. El 17- β -terbutildimetilsililoxi-testosterona-6-hidroxi fue sintetizado en base a varios reportes (9-10) y los otros reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Co.

MÉTODOS

Preparación del dextrano-ACA. La técnica de Schemer et. Al., fue realizada en esta etapa. Se disolvieron 100 mg [5×10^{-7} mol] de dextran (2×10^6 g/mol) en 50 mL de agua y se agregaron 114 mg ($5,32 \times 10^{-4}$ mol) de NaIO₄ a la mezcla con agitación constante por 2 horas, a temperatura ambiente. Después se añadieron 100 mg (0,86 mmol) de ácido amino caproico a la reacción resultante se continuó por 12 horas bajo las mismas condiciones. El producto de reacción fue dializado con agua destilada (3 veces) y el producto de diálisis fue evaporado a sequedad a presión reducida. Para determinar la concentración de grupos carboxilos libres contenidos en el polímero dextrano-ácido aminocaproico (dextrano-ACA) se usó la técnica reportada por Levin (11).

Acoplamiento del 17- β -terbutildimetilsililoxi-testosterona-6-hidroxi al polímero dextrano-ACA. Para esta reacción fue usada una modificación del método reportado por Mosbach (12). Una solución compuesta por 30 mg (0,0657 mmol) de

TBDMSO-testosterona-6-hidroxi, 50 mg dextrano-ACA (equivalente a 0,05 mmol de grupos carboxilos) y 200 mg de 1,3-diciclohexilcarbodimida en 10 mL de 1,4-dioxano (Figura 4). La reacción fue agitada por 24 horas a temperatura ambiente. El producto fue extraído con agua y la fase acuosa fue evaporada a sequedad a presión reducida.

Eliminación del grupo protector del oxidrilo en el polímero OTBDS-testosterona-6-ACA-dextrano. La técnica reportada por Cerny (10) fue realizada en esta etapa. Una solución de 50 mg (0,05 mmol) del complejo OTBDS-testosterona-6-ACA-dextrano, 0,1 mL de ácido fluorhídrico (40%) y 5 mL de acetonitrilo fueron hechos reaccionar a temperatura ambiente, durante 24 horas, con agitación constante.

Caracterización del polímero testosterona-6-ACA-dextrano. Para este proceso, se usó la técnica propuesta por Westphal (13), Yatsimirskaya (14) y Figuroa (15) para calcular los residuos de esteroide en el conjugado por medio de espectroscopia de ultravioleta (UV).

RESULTADOS

En la reacción del ácido aminocaproico con el polímero (dextrano) en presencia de NaIO_4 y NaCNBH_3 se obtuvo un rendimiento del 100% del complejo dextrano-ACA (Figura 1) y su punto de fusión fue de 220 °C. Es importante mencionar que el polímero dextrano-ACA fue analizado para estimar la cantidad de grupos carboxilos libres por medio de la técnica reportada por Levyn et.al., que usa como reactivo una base (NaOH). Los resultados mostraron que existían 1×10^{-3} mmol de grupos carboxilos libres por miligramo del complejo dextrano-ACA.

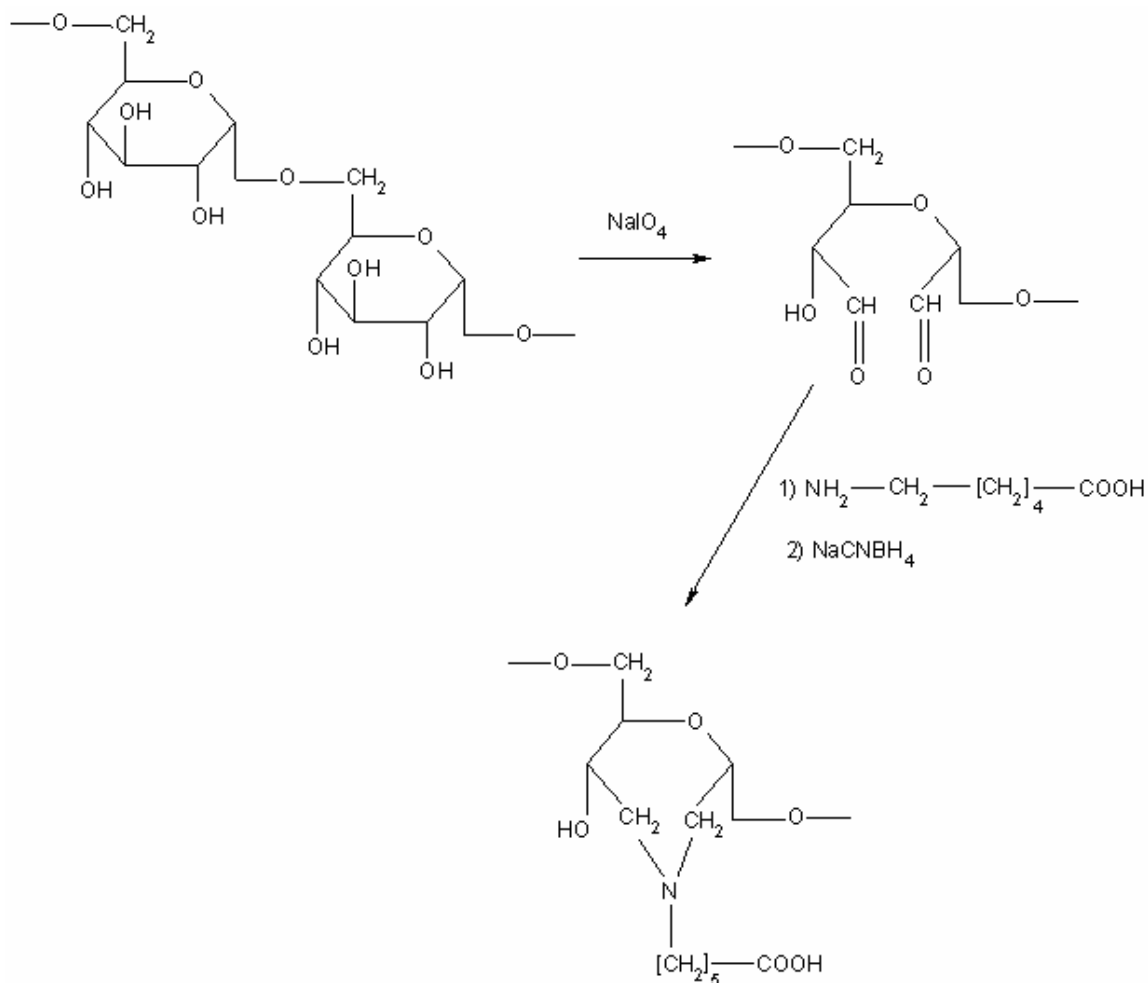


Figura 1. Síntesis del polímero dextrano-ACA.

Por otra parte, el acoplamiento del TBDMSO-testosterona-6-hidroxi al polímero dextrano-ACA fue realizado por una modificación del método reportado por Mosbach et al., usando 1,3-diciclohexilcarbodimida como catalizador (véase la Figura 2). Los resultados obtenidos por técnicas de espectroscopia para estimar el número de residuos del esteroide en el polímero TBDMSO-testosterona-6-ACA-dextrano indicaron que existían 2×10^{-4} mmol del esteroide por miligramo del polímero ($\text{UV}_{\text{metanol}}$; $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 240 \text{ nm}$).

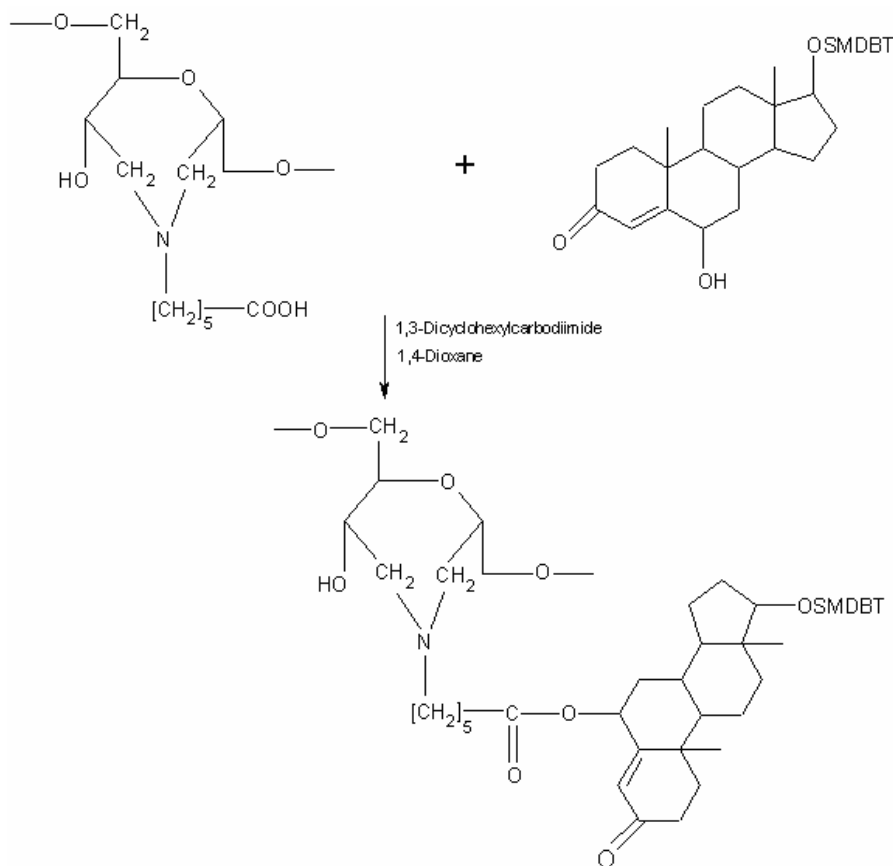


Figura 2. Acoplamiento del TBDMSO-testosterona-6-hidroxi al polímero dextrano-ACA.

En una segunda etapa el grupo protector del hidroxilo del esteroide fue removido con ácido fluorhídrico, obteniendo el polímero testosterona-6-ACA-dextrano (véase la Figura 3). Sin embargo es importante mencionar, que el rendimiento fue muy bajo (30%) con respecto al complejo TBDMSO-testosterona-6-ACA-dextrano, quizás porque los tiempos de reacción no fueron suficientes para producir una cantidad alta del producto esperado.

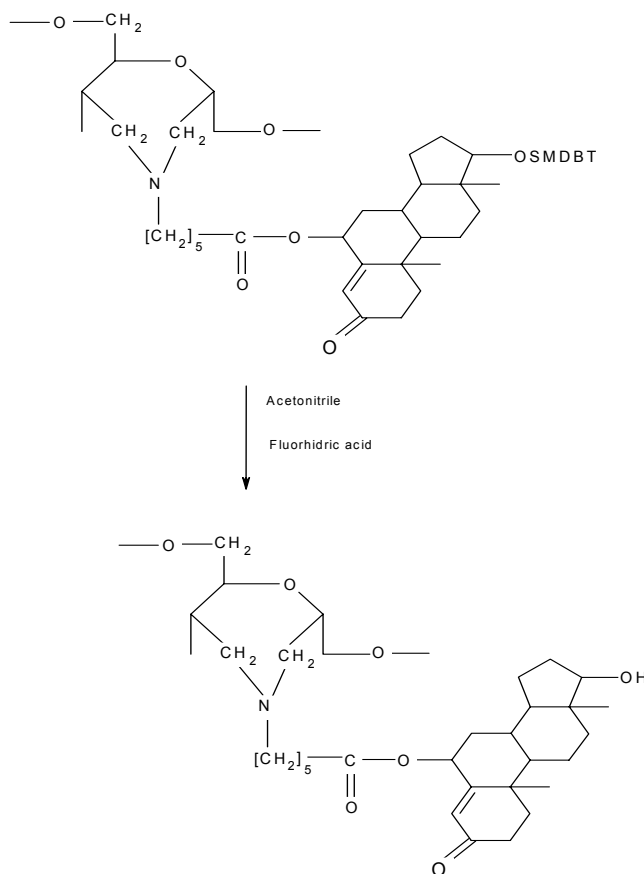


Figura 3. Preparación del polímero testosterona-6-ACA-dextrano.

Finalmente los resultados obtenidos por técnicas de espectroscopia para estimar el número de residuos del esteroide en el polímero testosterona-6-ACA-dextrano (véase la Figura 4) indicaron que existían 3×10^{-5} mmol por miligramo del complejo macromolecular (UV (metanol): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 242$ nm).

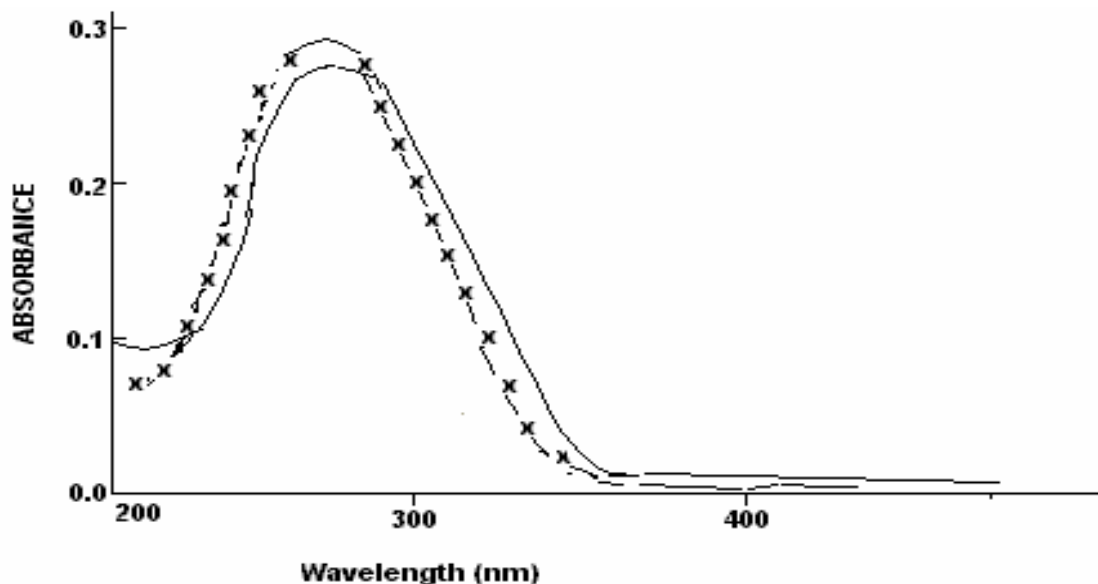


Figura 4. Espectro visible del esteroide libre (x) y el polímero testosterona-6-ACA-dextrano (-).

DISCUSIÓN

Usamos el procedimiento reportado por Schemer et al., para el acoplamiento del ácido aminocaproico al dextrano. Primero por la generación de grupos aldehído sobre el soporte (dextrano). Los grupos aldehído pueden ser creados por medio de una oxidación suave de grupos hidroxilos adyacentes contenidos en la estructura del dextrano con periodato de sodio (NaIO_4). Esto se lleva a cabo, cuando el periodato rompe los enlaces carbono-carbono entre los residuos de hidroxilos, creando dos aldehídos alifáticos. Por lo tanto, este método de activación da como resultado una alta densidad de grupos formilo sobre el dextrano, los cuales fueron hechos reaccionar con un brazo espaciador denominado ácido amino caproico (ACA) que contiene una amina primaria para formar una base de Schiff, la cual fue reducida y estabilizada usando cianoborohidruro de sodio como agente reductor,

trayendo como consecuencia que se formaran enlaces alquilamina los cuales son altamente estables (3). Es importante mencionar que después de obtener el producto de reacción dextrano-ACA tiene como características principal un brazo espaciador que contiene un grupo carboxilo libre que fue usado para el acoplamiento con el esteroide. Por lo tanto, fue necesario determinar la concentración de grupos carboxilos para tener una idea de la eficiencia del proceso de acoplamiento y para conocer cuantos sitios podrían ser viables en el polímero dextrano-ACA para acoplarse con el derivado de testosterona.

Por otro lado, el acoplamiento del TBDMSO-testosterona-6-hidroxi al polímero dextrano-ACA fue realizado por una modificación del método reportado por Mosbach et. al., usando como catalizador a la 1,3-diciclohexilcarbodimida, obteniéndose el complejo TBDMSO-testosterona-6-ACA-dextrano. Además, en una segunda etapa el grupo protector de hidroxilo del esteroide (TBDMSO) fue removido con ácido fluorhídrico, obteniendo el polímero testosterona-6-ACA-dextran. Sin embargo, cabe mencionar que el rendimiento fue muy bajo (30%) con respecto al TBDMSO-testosterona-6-ACA-dextrano, quizás porque los tiempos de reacción no fueron suficientes para producir una alta cantidad del polímero. Finalmente, los resultados obtenidos por técnicas de espectroscopia para estimar el número de residuos del esteroide en el polímero testosterona-6-ACA-dextrano mostraron una absorbancia de 242 nm y una concentración de 3×10^{-5} mmol del esteroide por miligramo del complejo macromolecular. Estos resultados indican que la estimación basada sobre técnicas de UV, sugieren que el dextrano no modifica la curva de absorción del esteroide libre (testosterona). Es importante señalar que tanto la testosterona como el polímero testosterona-6-ACA-dextrano muestran un espectro de $\lambda = 242$ nm. Esto puede ser debido a que el grupo cromóforo α,β -insaturado del esteroide no está ligado covalentemente al dextrano y por lo tanto no interfiere en el espectro de ultravioleta.

Es importante señalar la determinación del número de residuos del esteroide por procedimientos hidrolíticos fue juzgada impracticable, porque experimentos control demostraron que más del 50 % de residuos del esteroide no pueden ser recuperados.

Descripción simplificada del método y su aplicación.

La técnica de inmovilización de ligandos puede ser una alternativa para el acoplamiento de esteroides a macromoléculas. En este caso, el enlace entre el derivado de testosterona al dextrano y la producción del polímero testosterona-6-ACA-dextrano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leach K.L., Dahmer M.K., Pratt W.B., "Unexpected effects of molybdate on glucocorticoid receptors", *J. Steroid Biochem.*, **18**, 105 (1983).
2. Ravel R.M., Blachere T., Delolme F., Dessalces G., Coulon S, Baty B., Grenot C., Mappus E., Cuilleron C., "Specific Photoaffinity-Labeling of Tyr-50 on the Heavy Chain and of Tyr-32 on the Light Chain in the Steroid Combining Site of a Mouse Monoclonal Anti-Estradiol Antibody Using C3-, C6-, and C7-Linked 5-Azido-2-nitrobenzoyl-amidoestradiol", *Photoreagents. Biochemistry*, **40**, 14907 (1980).
3. Hermanson G., Mllia K., Smith K. "Immobilized affinity ligand techniques". Academic Press., 1992, 1st ed.
4. Demers N., Agostinelli E., Guy Fortier. "Immobilization of native and poly(ethylene glycol)-treated (PEGylated) bovine serum amine oxidase into a biocompatible hydrogel", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **33**, 201 (2001).
5. Rebizak R., Schaefer M., Dellacherie E. "Polymeric Conjugates of Gd³⁺-Diethylenetriaminepentaacetic Acid and Dextran. 2. Influence of Spacer Arm Length and Conjugate Molecular Mass on the Paramagnetic Properties and Some Biological Parameters", *Bioconjugate Chem.*, **9**, 94 (1998).
6. Koot Wim-Jan. "Synthesis and Use of a 2-(Trimethylsilyl)ethoxymethyl-Based Linker in Solid-Phase Organic Chemistry", *J. Comb. Chem.*, **1**, 467 (1999).
7. Matsusaki M., Serizawa T., Kishida A., Endo T., Akashi M. "Novel Functional Biodegradable Polymer: Synthesis and Anticoagulant Activity of Poly(α -Glutamic Acid)sulfonate (α -PGA-sulfonate)", *Bioconjugate Chem.*, **13**, 23 (2002).

8. Schmer G. "Techniques-Immobilization", Hoppe-Seylers Z. *Physiol. Chem.*, **353**, 810 (1972).
9. Nussbaum A.L., Yuan E., Dincer D., Oliveto P.E. "Enol Ethers of Steroidal Δ^4 -3-Ketones", J. Org. Chem., **26**, 3925 (1961).
10. Cerny P.B. and Kraan K. T., Van W. "Synthesis and characterization of the 6 α - and 6 β -hydroxylated derivatives of corticosterone, 11-dehydrocorticosterone, and 11-deoxycortisol", Steroids., **58**, 495 (1993).
11. Levin Y., Goldstein P.M., Katchalski E. "A water-insoluble Polyanionic Derivates of tyrosin", Biochemistry, **3**, 1905 (1964).
12. Mosbach K. "Methods in Enzimology, Immobilized Enz.", Academic Press, New York, 1976, 3^{ra} ed.
13. Westphal U. "Steroid-Protein Interactions; Spectrophotometric Demostration of interaction between Proteins and progesterone, Deoxycorticosterone and cortisol.", Arch. Biochem. Biophys., **66**, 71 (1957).
14. Yatsimisrskaya A.E., Gavrilova M.E., Egrov M.A., Levashov V.A. "Preparation of conjugates of progesterone with bovine serum albumin in the reversed micellar medium", Steroids, **58**, 547 (1993).
15. Figueroa V.L., Luna C.H., Henkel C.C., Muñoz G.O., Ceballos R.G. "Synthesis and evaluation of the cardiovascular effects of two, membrane impermeant, macromolecular complexes of dextran-testosterone", Steroids, **67**, 611 (2002)