

BIOTECNOLOGIA DE ESTEROIDES

Alicia Cea Bonilla*

Panorama general de esteroides

Los esteroides, compuestos con una estructura básica de ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 1), constituyen uno de los grupos más estudiados por su diversa actividad fisiológica, ya que incluyen una gran variedad de compuestos naturales como los esteroides, los ácidos biliares, la vitamina D, las hormonas sexuales y adrenocorticales, los glucósidos cardiotónicos, las sapogeninas y algunos alcaloides (1).

Los esteroides son 3 monohidroxiesteroides que poseen de 27 a 29 átomos de carbono. Todos los de origen natural presentan un grupo 3β hidroxilo y uno o más dobles enlaces en las posiciones 5, 7 y 22. Pertenecen a este grupo algunos miembros interesantes como el colesterol, el sitosterol y estigmasterol (usados en la industria farmacéutica para la síntesis de hormonas esteroidales), el ergosterol (del que se obtiene vitamina D_2

por irradiación con luz solar o luz ultravioleta) y el lanosterol.

Los ácidos biliares son esteroides de 24 átomos de carbono, derivados del colesterol y que se vierten en el intestino delgado donde ayudan a la emulsificación y la absorción de los lípidos.

Se conoce como vitamina D a un grupo de sustancias liposolubles que se dividen en dos subgrupos: la vitamina D_2 o ergocalciferol y la vitamina D_3 o colecalciferol. Son compuestos de 27 o 28 átomos de carbono, con el anillo B del núcleo esteroide abierto y que se obtienen por la irradiación con luz solar de ergosterol o del 7 dehidrocolesterol. Su función es regular la absorción, transporte y fijación del Ca^{+2} en los huesos.

Los andrógenos son compuestos de 19 átomos de carbono con sustituyentes oxigenados en C-3 y C-17. Los principales andrógenos naturales son la androstenediona, la dehidroepiandrosterona y la testosterona, que es la más activa de las

tres. Su función es originar el desarrollo de los órganos sexuales masculinos o caracteres secundarios además de regular indirectamente la espermatogénesis.

Los estrógenos son las hormonas sexuales femeninas que, junto con la progesterona, regulan el ciclo sexual de los mamíferos hembras. Fueron los primeros esteroides aislados y se caracterizan químicamente por tener el anillo A del núcleo esteroide aromático y 18 átomos de carbono. Los más importantes son la estrona, el estradiol y el estriol.

La corteza de las cápsulas suprarrenales produce tres tipos de hormonas esteroidales involucradas en el metabolismo del agua y electrolitos (mineralocorticoides), en el de los carbohidratos y proteínas (glucocorticoides) y con acción androgénica. En general, los corticosteroides son compuestos de 21 átomos de carbono, con cadenas laterales muy oxidadas, un grupo Δ^4 3 cetona y un grupo 20-21 cetónico ó 17, 20, 21 dehidroacetónico, además de una función oxigenada en C-11.

Los glucósidos cardiotónicos incluyen dos grupos: las cardenólidas, esteroides de 23 átomos de carbono que se encuentran como glucósidos en una serie de plantas como el *digitalis*, el lirio y el ranúnculo. Muchos de ellos presentan una poderosa actividad cardiotónica. El otro grupo es el de las bufadienólidas que son esteroides de 21 átomos de carbono con una cadena lateral doblemente insaturada, que se encuentran en plantas de la familia de la escila y en las glándulas venenosas de los sapos.

Las sapogeninas son esteroides de 27 átomos de carbono con una cadena lateral de tipo espirocetal y que ocurren naturalmente en forma de glucósidos en plantas. Los glucósidos (saponinas) son hidrolizados por ácidos o enzimáticamente.

* Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

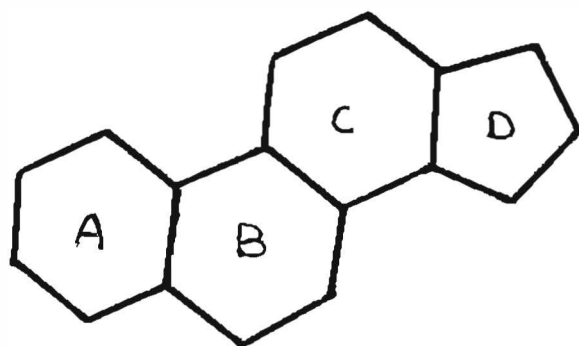


FIGURA 1: ESTRUCTURA DEL CICLOPENTANOPERHIDROFENANTRENO

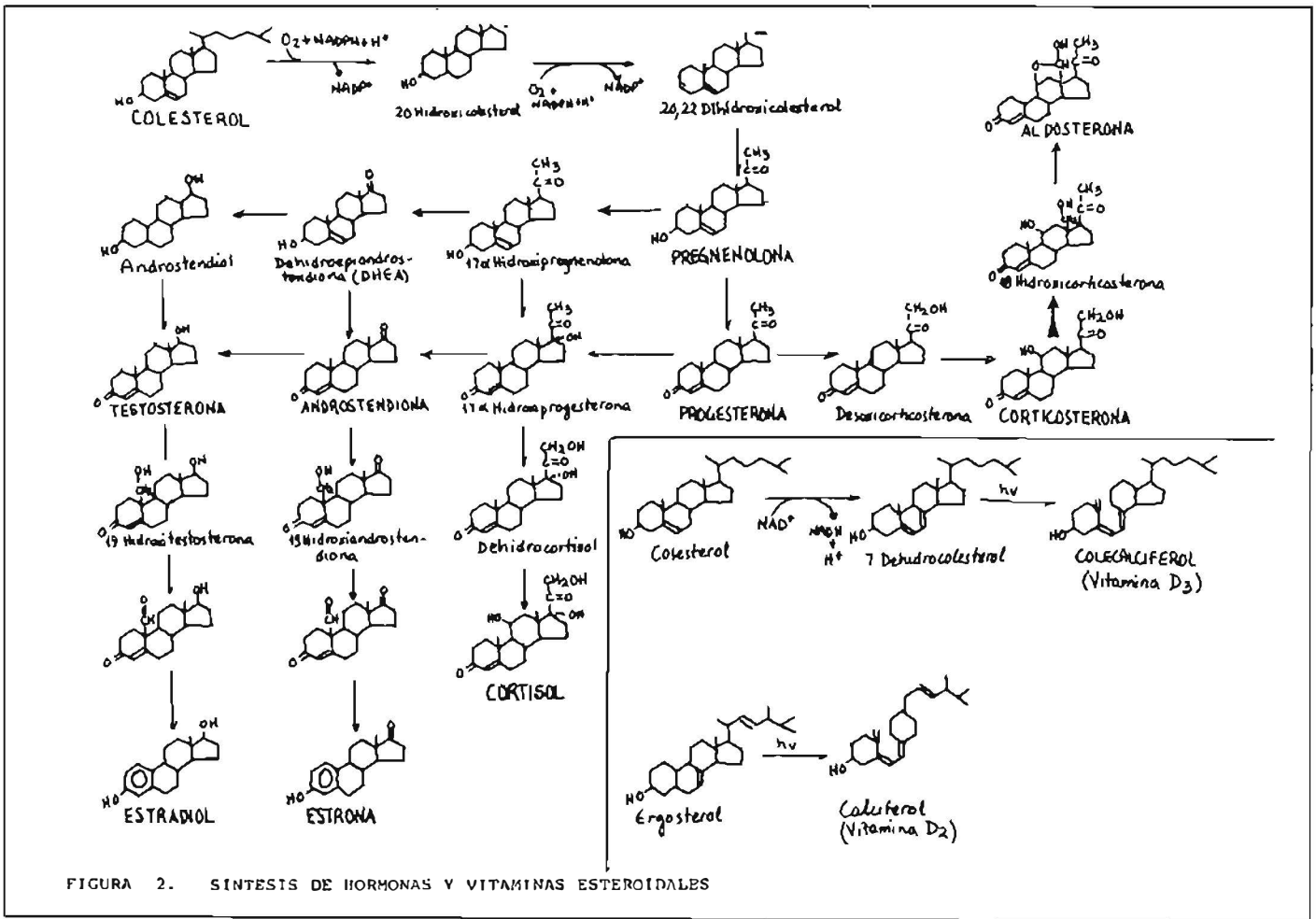


FIGURA 2. SÍNTESIS DE HORMONAS Y VITAMINAS ESTEROIDAS

mente para originar las sapogeninas libres y el azúcar. Dentro de las sapogeninas más importantes se encuentra la diosgenina (que es una de las más usadas materias primas para la síntesis química y/o microbiológica de hormonas esteroideas), la hecogenina y la sarsapogenina.

Dentro de los alcaloides esteroideos más conocidos se encuentran los presentes en las plantas del género *solanum*. Contienen 27 carbonos y son análogos nitrogenados de las sapogeninas.

Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas

En general, se sabe que las hormonas esteroideas afectan el metabolismo de las células blanco. Para poder ejercer su efecto, penetran a la célula y se asocian en el citoplasma con un receptor específico, formando un complejo hormona-receptor que migra al núcleo celular donde interacciona con el DNA de una manera específica e induce la transcripción de ciertos genes involucrados direc-

tamente en su acción en la célula blanco. De esta manera, el complejo hormona-receptor actúa como un inductor que se une a un represor de ciertos genes o a una región específica en el cromosoma adecuado, que tiene funciones similares al operador de los procariontes. Con respecto al mecanismo a nivel genético de la acción de estas hormonas, no hay nada definitivo, sin embargo, se sabe que afectan el metabolismo de las células blanco, como es el caso de los corticosteroides.

Los glucocorticoides no solo están involucrados en la adaptación al *stress* sino que son inductores de las enzimas gluconeogénicas como la fosfoenolpiruvato-carboxilasa, la tirosinaminotransferasa y la triptofanpirrolasa, entre otras. Regulan la degradación de proteínas y de lípidos y disminuyen la síntesis *denovo* del DNA y el RNA. Sus miembros más importantes son el cortisol y su análogo sintético, la dexametasona, las que además se han utilizado como antiinflamatorios (pues reducen la reac-

ción inflamatoria inicial, inhiben los mecanismos fagocitarios y defensivos así como la reacción inflamatoria tardía) en enfermedades reumáticas o alérgicas como la artritis reumatoide.

Los mineralocorticoides (aldosterona y desoxicorticosterona) tienen su efecto en la reabsorción del agua, del Na^+ , Cl^- y HCO_3^- en los túbulos renales y regulan de esta manera el metabolismo del agua, el equilibrio electrolítico e indirectamente la presión sanguínea.

Síntesis de las hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas se sintetizan en las células animales a partir de colesterol, el cual requiere ser degradado para convertirse en hormona esteroidea activa. En esta conversión son de especial interés las reacciones de hidroxilación llevadas a cabo por oxidasas de función mixta, que requieren O_2 y NADPH.

La primera etapa de la síntesis es la α -hidroxilación en el carbono 20 y después en el carbono 22, lo que prepara a

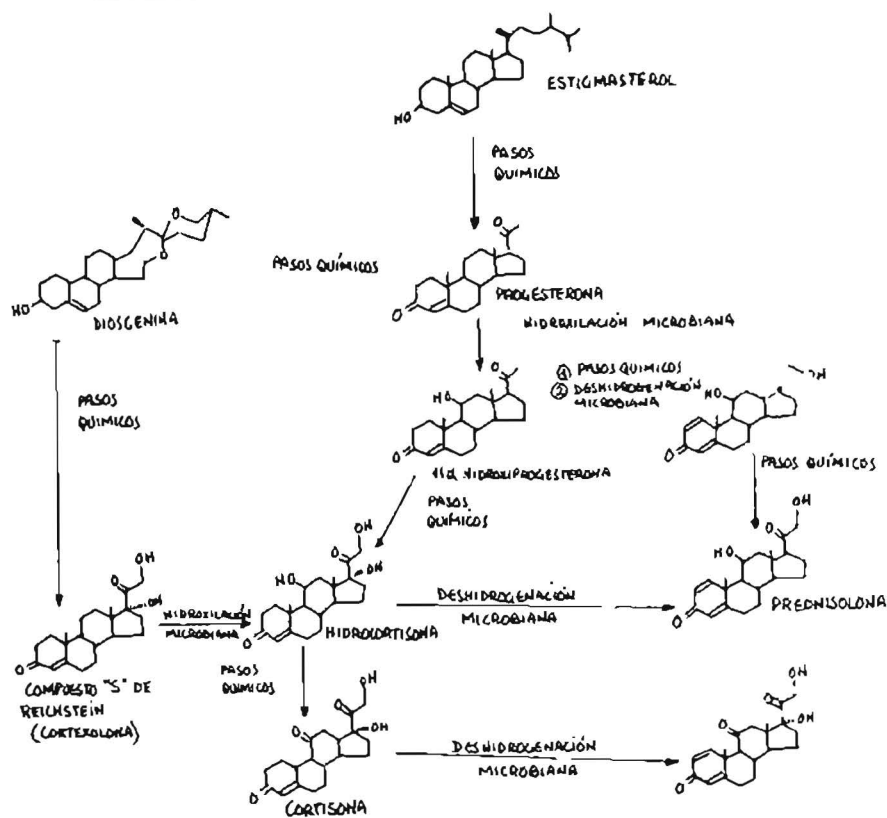


FIGURA 1. VIAS DE OBTENCIÓN DE ADRENOCORTICOIDES A PARTIR DE DIOSGENINA Y ESTIGMASTEROL

la molécula para la acción de la desmolasa (una liasa) que elimina seis carbonos de la cadena lateral del colesterol y produce la pregnenolona (2). Esta conversión se ve estimulada por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), un polipéptido de 39 aminoácidos sintetizado por la hipófisis anterior, que estimula principalmente la formación de glucocorticoides y presenta una influencia básica en la síntesis de todas las hormonas esteroides. Su efecto básico en la corteza suprarrenal está mediado por el AMI¹ cíclico, que estimula la síntesis de la desmolasa y provoca la transformación del colesterol en pregnenolona, el precursor de todas las hormonas esteroidales.

En los diferentes tejidos donde se sintetizan hormonas esteroides, la pregnenolona sufre una serie de transformaciones que la lleva a las hormonas activas.

En la corteza suprarrenal puede convertirse en glucocorticoides o mineralocorticoides por dos vías conocidas como de los derivados Δ^4 y Δ^5 .

Para la síntesis de cortisol, la Δ^5 -pregnenolona se hidroxila en la posición 17 α y luego por la acción de la 3 β -ol deshidrogenasa y de la $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ isomerasa, se convierte en 17 α -hidroxiprogesterona. Este compuesto sufre dos hidroxilaciones sucesivas en los carbonos 21 y 11 para producir la hidrocortisona (figura 2).

En la misma figura es posible ver la vía de síntesis de los mineralocorticoides, la que se inicia con la conversión de la Δ^5 pregnenolona en progesterona, la que sufre tres hidroxilaciones subsecuentes en los carbonos 21, 11 y 18 y una deshidrogenación que da origen a la aldosterona (el mineralocorticoide más potente), la que toma la forma de acetal.

Los andrógenos se sintetizan por dos vías diferentes: a partir de la 17 α -hidroxipregnenolona (vía de los derivados Δ^5) o de la 17 α -hidroxiprogesterona (vía de los derivados Δ^4). Ambos precursores pierden dos átomos de carbono por acción de la 17-20 liasa y se convierten en la dehidroepiandrosterona (DHEA) y en

Δ^4 androstendiona, respectivamente. Este último compuesto se reduce por un sistema de 17-óxidorreductasa y se convierte en testosterona. Hay otra vía de síntesis de testosterona a partir de DHEA, la que se reduce por la 17-óxidorreductasa a androstendiol, el cual se oxida por la 3 β -ol deshidrogenasa y se isomeriza por la $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ isomerasa produciendo testosterona.

Los estrógenos se sintetizan a partir de androstendiona y testosterona en el ovario, por la acción de la 19 hidroxilasa, por una deshidrogenación no catalizada enzimáticamente y por una aromataza, produciendo estrona y estradiol, respectivamente.

Bioconversiones

De lo expresado anteriormente se puede deducir que los esteroides juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis y su deficiencia repercute seriamente en las funciones del

organismo. Por este motivo es necesario, desde el punto de vista farmacológico, buscar formas de obtener estas hormonas y utilizarlas en el tratamiento de sus deficiencias. Además, algunas de ellas presentan otros efectos interesantes desde el punto de vista terapéutico, como es el caso de la cortisona en el tratamiento de enfermedades reumáticas y alérgicas.

Una de las formas de obtención en la industria farmacéutica es la síntesis total de las hormonas, en la que algunos de los pasos son muy críticos, pues los compuestos biológicamente activos son estereoespecíficos y en las reacciones de síntesis química se obtienen mezclas, que bajan los rendimientos de hormona activa, y aumentan sus costos.

Es por este motivo que se han buscado alternativas a este proceso, siendo una de las más interesantes la bioconversión de las moléculas esteroidales de las plantas.

Las bioconversiones o transformaciones biológicas consisten en la conversión de un compuesto en otro estructuralmente relacionado por medio de las enzimas de una célula. Estos procesos presentan una serie de ventajas sobre las reacciones químicas, entre las que cabe destacar:

- a) Transcurren a temperatura ambiente y en condiciones más suaves.
- b) Emplean agua como disolvente.
- c) Son altamente específicas.

Entre las bioconversiones más exitosas se encuentra la síntesis de hormonas esteroidales.

Desde el principio de los años treinta, E. C. Kendall y T. Reichstein aislaron la cortisona y una década después, P. S. Hench y E. C. Vendal demostraron que la administración de cortisona aliviaba el dolor de pacientes con artritis reumatoide, lo que motivó su gran demanda. Se desarrollaron métodos químicos que requerían hasta 37 pasos y algunos de ellos en condiciones extremas; sobre todo era especialmente crítica la introducción del oxígeno en la posición 11, del que depende la actividad fisiológica de la cortisona.

Este problema pudo resolverse cuando en 1952, D. H. Peterson y H. C. Murray descubrieron que una cepa de *rhizopus arrhizus* introducía un grupo hidroxilo en la posición 11 de la progesterona, que es un intermediario temprano de la cortisona. El uso de microorganismos redujo los pasos de la síntesis de 37 a 11 y

esto se tradujo en una disminución de los costos de producción (de 200 a 6 dólares por gramo.)

Desde entonces se han desarrollado una serie de procesos que utilizan los microorganismos en la síntesis industrial de esteroides, entre los que incluyen la cortisona, la hidrocortisona, la prednisona, la dexametasona, la testosterona, el estradiol, el metabolito activo de la vitamina D₃ (1 α ,25 dihidroxicolecalciferol) y el antiurético espironolactona.

Las materias primas de todos ellos son los esteroides, cuyas fuentes más comunes son los desechos de la producción del aceite de soya (ricos en estigmasterol y sitosterol), y las raíces del barbasco mexicano (*dioscorea composita*) que contiene diosgenina.

El primer paso en la producción de esteroides a partir de esteroides vegetales es la degradación de la cadena lateral del esterol, la cual es llevada a cabo por algunas microbacterias que usan los esteroides como fuente de carbono y energía (figura 3).

La identificación de nuevos usos de los esteroides (como anticonceptivos, en el tratamiento de insuficiencias hormonales, de enfermedades de la piel, en inflamación y alergias) han aumentado su demanda y el desarrollo de procesos biotecnológicos (en los que se usa la maquinaria bioquímica de los microorganismos) que puedan satisfacer esa demanda (3).

En esta línea se desarrollan en México procesos dirigidos a la obtención biotecnológica de diosgenina por la fermentación del barbasco.

La diosgenina (20 α ,22 α ,25-D)-espiro-5en-3 β -ol) es un compuesto muy importante en la industria farmacéutica, ya que es la materia prima predilecta para la síntesis química y/o microbiológica de hormonas y vitaminas esteroidales.

Químicamente pertenece al grupo de las sapogeninas, esteroides de 27 carbonos con una cadena lateral de tipo espirostano, la que no se encuentra en ninguna otra clase de productos naturales. Consiste en un anillo de cinco miembros (E) y otro de seis (F) ambos heterocíclicos. Los compuestos que presentan el anillo F abierto se conocen como furustanos.

Fue aislada por primera vez en 1936, a partir de *Dioscorea tokoro* y R.E. Marker degradó su cadena lateral en 1940 para obtener progesterona y testosterona. Debido a su gran utilidad en la síntesis

de compuestos farmacológicamente activos, se le ha buscado desde entonces en diferentes tipos de vegetales.

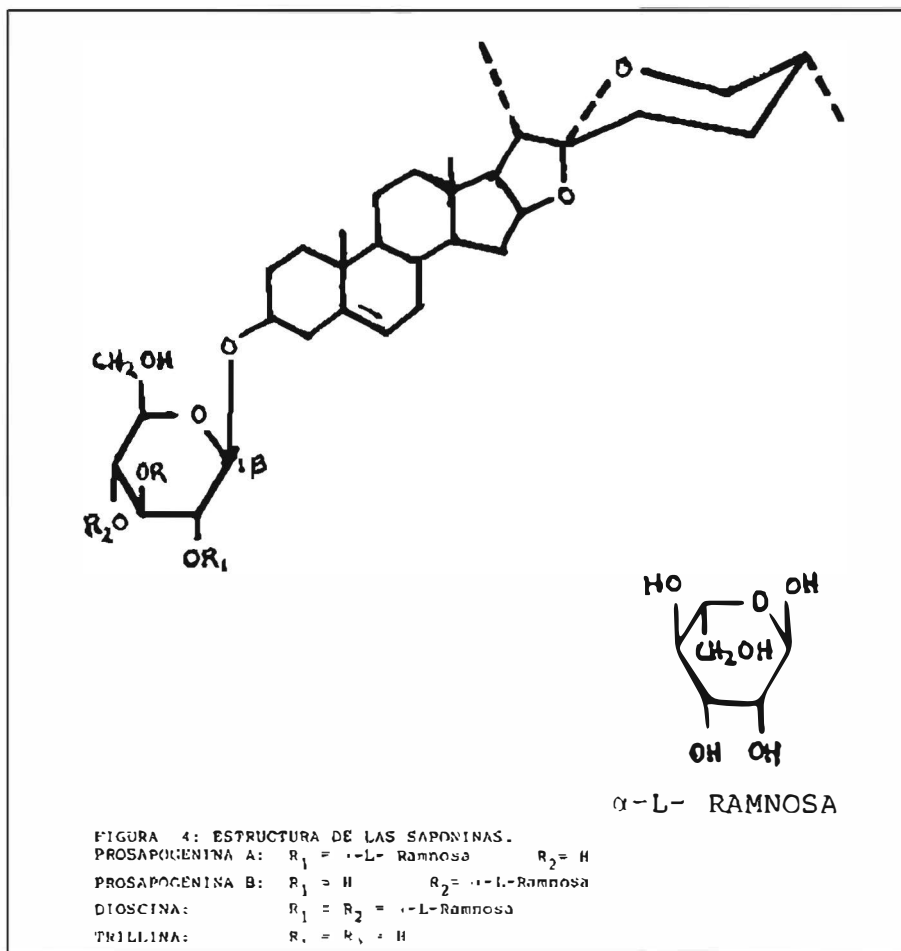
Se encuentra en forma natural en una gran variedad de plantas, entre las que pueden mencionarse magueyes (género *agave*), izotes (género *yuca*) y samuiloca (*samuelke carnerosana*). Sin embargo, su principal fuente de obtención, desde hace 35 años, es el barbasco mexicano (*dioscorea composita hemsl*) ya que la diosgenina constituye del 3.5 al 5% del peso seco de la planta, y su cultivo es fácil y económico.

El barbasco es una planta que pertenece a la familia de las *dioscoreas*, arbustos trepadores que parten de grandes raíces tuberosas. Estos rizomas desecados constituyen la parte que se usa para la extracción de las saponinas, ya que las demás partes de la planta (tallo, hojas, flores y semillas) las contienen en pequeñas cantidades (4). En general se sabe que la planta está compuesta de resinas, almidón, celulosa, oxalato de calcio y saponinas.

La diosgenina no se encuentra libre en la planta sino en forma de heterosídeos, compuestos derivados de las formas cíclicas de los azúcares, en las que el hidrógeno del oxhidrilo hemiacetalico es reemplazado por un grupo arilo o alquilo, formando un nuevo enlace acetal. Estos compuestos reciben el nombre genérico de glucósidos y están formados por dos clases de moléculas diferentes: un azúcar o radical "heterosídico" y una fracción de diversa naturaleza llamada "aglucón", que va desde ácidos grasos hasta compuestos aromáticos.

Gracias a los estudios de Marker, Kawasaki y Espejo (5, 6, 7, 8 y 9) se ha determinado la naturaleza y características de las saponinas del barbasco y se ha determinado que contiene una mezcla compleja de las mismas, siendo las más abundantes la Dioscina (Diosgenina-(2,4-bis- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranosido) Trillina (Diosgenina-3- β -D-glucopiranosido), Prosapogenina A (Diosgenina-3-O-(α -L-ramnopiranosil 1-2)- β -D-glucopiranosido) y la Prosapogenina B (Diosgenina-3-O-(α -L-ramnopiranosil 1-1)- β -D-glucopiranosido (figura 4).

Como se observa en todas las estructuras, el azúcar está unido al núcleo esteroide por un enlace β glucosídico, el cual se rompe tradicionalmente por medio de una hidrólisis ácida (5) empleando ácidos minerales concentrados y altas temperaturas. Una alternativa a este pro-



ceso es el uso de microorganismos o sus enzimas para llevar a cabo la hidrólisis en condiciones suaves.

Ya en 1954, Krider y colaboradores (10) reportaron que era posible la hidrólisis de los glucósidos de $5\alpha,22\alpha$ espirostanos usando extractos acuosos de las plantas que los contenían. El mismo año, el mismo grupo de trabajo reportó que había hidrólisis de las saponinas extraídas del *agave cerulata* cuando se ponían a incubar 96 horas a 25°C con un cultivo activo de algunas cepas de *aspergillus* y *penicillium*, y mencionan que las enzimas que presentan actividad saponinolítica son inducibles e insensibles a represión por azúcares (11). En 1955, Rothrock y colaboradores (12) probaron que algunos hongos de los géneros *aspergillus*, *penicillium* y *fusarium* liberaban entre el 90 y el 100% de la diosgenina esperada por la hidrólisis ácida de *dioscorea barbasco amarillo*. En 1975, Hermann y Repke (13) reportaron la ruptura selectiva de glucósidos de cardiotónicos usando la β glucosidasa A_3 de *aspergillus wentii* y en 1977, Rumyantseva (14) reportó que la β glucosidasa de *aspergillus*

niger juega un papel importante en la hidrólisis de glucósidos esteroideos. Además hay un reporte de Mellor y Layne, en 1974, sobre la purificación de una β glucosidasa esteroideal de hígado de conejo (15) que actúa específicamente sobre los $3\beta\text{-D}$ -glucósidos de estrona, 17α y 17β estradiol.

Debido a que hasta 1974, México había sido el principal productor de diosgenina a nivel mundial y que a partir de entonces, debido a la falta de control sobre el barbasco, las compañías farmacéuticas buscaron otras fuentes de esteroideos, se hizo necesario buscar procesos que permitieran a la diosgenina recuperar en parte su lugar en la industria de los esteroideos, se ha desarrollado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas un proyecto que mira a la obtención fermentativa de la diosgenina del barbasco. El proyecto se inició desde el aislamiento de microorganismos a partir de barbasco, los cuales liberaran la diosgenina de manera competitiva con la hidrólisis ácida y cuyas enzimas extracelulares sean utilizadas para liberar la diosgenina residual en el barbasco fermentado.

De los microorganismos aislados de barbasco, se seleccionó un hongo filamentoso que libera en un medio sencillo (agua, barbasco, sulfato de amonio y Tween 80) un 2.35% de diosgenina y que hidroliza todas las saponinas del barbasco. Actualmente se hacen estudios con el fin de optimizar las condiciones de hidrólisis, así como la utilización racional de las enzimas extracelulares para recuperar la diosgenina total presente en el barbasco y poder, de esta manera, competir con las fuentes alternas de esteroideos y recuperar el mercado de la diosgenina (16, 17, 18).

Bibliografía

1. Klyne, W., *Química de los esteroideos*, Compañía Editorial Continental, Nueva York (1970).
2. Malacara, J. M., M. García Viveros, C. Valverde, *Fundamentos de endocrinología clínica*, La Prensa Médica Mexicana, 3a. Edición (1980), México.
3. Aharonowitz, Y. & G. Cohen, *Investigación y ciencia*, Versión en español de Sci. Am. 62, Nov. 1981.
4. *El barbasco mexicano, condiciones y perspectivas para su aprovechamiento*, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales (1981).
5. Marker, R. E., D. L. Turner, R. B. Warner & P. R. Ulshafer, *J. Am. Chem. Soc.* 63, 772 (1940).
6. Marker, R. E., D. L. Turner, R. B. Warner & P. R. Ulshafer, *J. Am. Chem. Soc.* 63, 774 (1940).
7. Marker, R. E., D. L. Turner & P. R. Ulshafer, *J. Am. Chem. Soc.* 64, 1655 (1942).
8. Kawasaki, T., T. Yamauchi, *Chem. Pharm. Bull.*, Japan 16, 1070 (1968).
9. Espejo, O., J. Campos-Ilavot, H. Jung, F. Giral, *Phytochem.* 21, 413 (1982).
10. Krider, M. M., M. E. Wall, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1938 (1954).
11. Krider, M. M., T. C. Cordon & M. E. Wall, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3515 (1954).
12. Rothrock, J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* 57, 151 (1955).
13. Hermann, I., K. R. H. Repke, *Acta microbiol., Acad. Sic.* 22, 481 (1975).
14. Rumyantseva, G.N., K. A. Kalugants, D.A. Volosheva, M. A. Radionova, S. S. Shain, *Prikl. Biokhem. Mikrobiol.* 13, 235 (1977).
15. Mellor, J. D. & S. Layne, *J. Biol. Chem.* 249, 361 (1974).
16. García Correa, O., Tesis para obtener el título de Q.F.B., FES Cuautitlán, UNAM, México, D.F. (1985).
17. González, P., A. Cea, A. Gilbón, J. E. Herz & C. Huitrón, *Bioteología de enzimas*, Ed. C. Huitrón, p. 309, México, D.F. (1984).
18. Cea Bonilla, A., Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas, (Bioquímica), Fac. Química, UNAM, México (1985).