



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
EXEMESTANO, UNA ALTERNATIVA
BIOCATALÍTICA POSIBLE.

Autor: Ana Montoya Alarcón
Tutor: Andrés R. Alcántara León
Convocatoria: Junio

Resumen

El cáncer es uno de los principales problemas de la sociedad actual. Concretamente, el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre las mujeres. Abarca a un conjunto de neoplasias originadas en la glándula mamaria que pueden ser molecularmente distintas. Por ello, además del desarrollo de nuevas líneas de tratamiento contra este tipo de tumores, es importante, la mejora de los tratamientos existentes.

En este trabajo está centrado en la búsqueda de biocatalizadores candidatos a ser utilizados como alternativa a la ruta sintética establecida actualmente para la síntesis del exemestano, un fármaco inhibidor de la aromatasa, con indicación en el cáncer de mama. Para ello se analizan diversos trabajos publicados con el fin de encontrar posibles biotransformaciones aplicables en etapas como la oxidación del grupo hidroxilo del carbono 17, o la formación de un doble enlace entre los carbonos 1 y 2 del esteroide y así, proponer alternativas para optimizar su producción a nivel industrial. La importancia de la biocatálisis reside en encontrar una alternativa que presente ventajas tanto a nivel económico como a nivel medioambiental.

Si bien el descubrimiento de aplicación de la biocatálisis en esteroides ha supuesto un gran adelanto, aún existen ciertas limitaciones permiten, en un futuro, nuevos desafíos en el campo de la investigación, ya que optimizar una biotransformación requiere mucho tiempo y trabajo, puesto que es necesario aislar los candidatos más adecuados para llevar a cabo los objetivos fijados, evaluar en qué condiciones actúan mejor y meditar si se puede mejorar el proceso mediante mutaciones puntuales en las enzimas elegidas.

Introducción y antecedentes

1. Antecedentes históricos

Los conocimientos adquiridos en el campo de la Microbiología y la Bioquímica a mediados del siglo XIX contribuyeron rápidamente al desarrollo biocatálisis, permitiendo así que Pasteur pudiese identificar a los microorganismos responsables de la fermentación alcohólica y la fermentación láctica. La aplicación de biocatalizadores a diversos procesos industriales comenzó a crecer a fines del siglo XIX con el advenimiento de la segunda revolución industrial, definiéndose Biocatálisis Aplicada como la utilización de un biocatalizador para realizar una transformación química en un biorreactor bajo condiciones controladas.

El primer empleo de la biocatálisis en una estructura esteroidea fue la hidroxilación microbiana en α -7 del colesterol usando *Proactinomyces roseus* en 1949 descrita por Kramli y Horvath. (1)

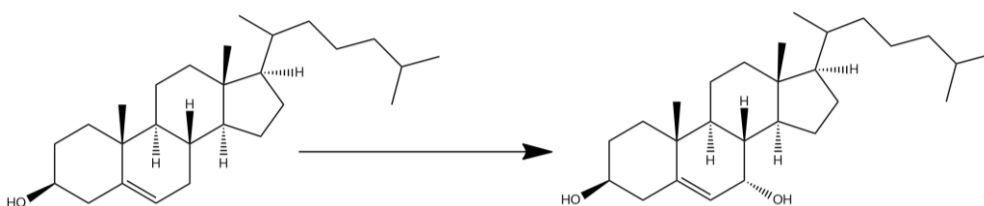


Figura 1. Hidroxilación del colesterol por *Proactinomyces roseus*

Posteriormente, Upjohn Co, describió la transformación de progesterona en 11 α -hidroxiprogesterona utilizando *Rhizopus arrhizus*, siendo esta un intermedio de la síntesis de la cortisona. Al mismo tiempo, Bristol-Mayer-Squibb describió la misma reacción usando *Aspergillus niger*. (1)

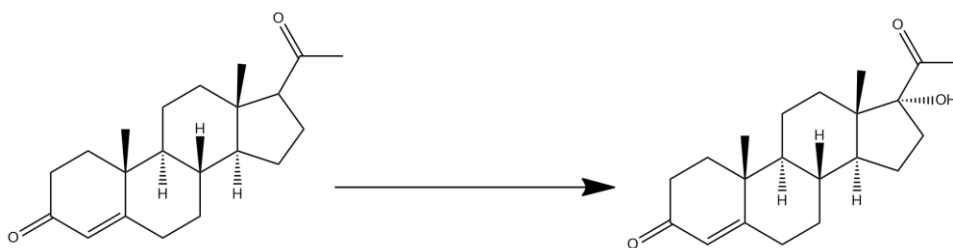


Figura 2. Hidroxilación de la progesterona por *Rhizopus arrhizus*

2. Biocatálisis de esteroides en la actualidad

A día de hoy, la hidroxilación en el esqueleto esteroídico puede darse utilizando microorganismos de una manera estereoespecífica, ya que, por ejemplo, hidroxilaciones en 11 α -, 11 β -, 15 α - y 16 α se hacen industrialmente exclusivamente vía hidroxilación microbiana con buenos rendimientos, y bajos costes de operación.

El auge indiscutible de la biocatálisis se debe a los grandes avances científicos que se han sucedido en los últimos años. Gracias a la tecnología del DNA recombinante se ha logrado la expresión de enzimas en grandes cantidades, lo que ha favorecido una disminución de su precio. Por otra parte, las técnicas de mutagénesis y evolución dirigida han permitido la obtención de nuevos biocatalizadores que presentan un aumento de actividad, estabilidad y/o especificidad respecto a sus respectivas enzimas nativas.

Todas las técnicas anteriores unidas al empleo de las numerosas técnicas de inmovilización de enzimas han logrado facilitar la posterior reutilización de los biocatalizadores, así como mejorar su estabilidad a distintos valores de pH y temperatura, lo que ha abaratado los costes de muchos procesos biocatalíticos. Asimismo, la biocatálisis en medios no convencionales ha posibilitado la realización de reacciones enzimáticas con muchos sustratos poco solubles o insolubles en agua y, de esta manera, se ha ampliado el campo de aplicación de las enzimas en la síntesis de muchos compuestos orgánicos como alternativa a la síntesis química tradicional. (2)

Las biotransformaciones que utilizan enzimas libres como biocatalizadores son ahora una metodología sintética totalmente aceptada y válida para preparar compuestos usados como medicamentos, aditivos alimentarios, cosméticos o productos agroquímicos. Además del uso de enzimas, es posible el uso de células enteras. La aplicación de las mismas, sin embargo, inicialmente quedó limitada a casos especiales, como, por ejemplo, si el microorganismo contiene la enzima necesaria para una sola etapa o cuando la célula era productora natural de un compuesto químico valioso. Actualmente, es posible el empleo de microorganismos que presenten unas características concretas que permitan un mayor uso en la biocatálisis con fines industriales, la denominada Biotecnología Blanca. (1)

3. **Biotecnología Blanca**

El concepto de Biotecnología Blanca (o Biotecnología Industrial) comprende el uso de la biocatálisis, utilizando tanto células completas como enzimas aisladas y purificadas, presentando unas características atractivas en el contexto de la Química Verde.

El objetivo de esta es promover las tecnologías químicas innovadoras que reduzcan la producción de residuos peligrosos en el diseño, fabricación y uso de fármacos. Por tanto, en el conjunto de estas tecnologías se incluye la Biotecnología Blanca cuyo principio básico es minimizar los posibles daños al medio ambiente en lugar de recurrir a la remediación como solución. (3)

A nivel industrial, los procesos biotecnológicos se emplean como alternativa a los procesos químicos convencionales, lo que conlleva principalmente ventajas económicas y medioambientales. (4) Es una opción competitiva y sostenible para productos químicos o fármacos que aprovechan las fuerzas inherentes asociadas a los procesos de fabricación. Permite también el uso de materias primas renovables, sin agotamiento de recursos, siendo estas además reutilizables.

La biocatálisis facilita una producción directa del elemento químico de interés como es el caso de las fermentaciones a gran escala. Otra ventaja de la Biotecnología Industrial frente a la síntesis convencional es la selectividad, gracias al diseño de bioprocesos que disminuyan las emisiones de gases con efecto invernadero y que presenten menor cantidad de subproductos que requieran una eliminación costosa. Otra característica unida a la selectividad importante de considerar, es que los biocatalizadores son lo suficientemente específicos para reducir el número de reacciones, agrupando todo el desarrollo sintético en una única etapa. Asimismo, en los procesos biocatalíticos no se emplean ni temperaturas ni presiones extremas, evitando en la mayoría de las ocasiones también los disolventes inflamables o tóxicos, lo que permite así un proceso de síntesis mucho más seguro. (3) (5)

Hasta ahora, en los procesos biocatalíticos, los microorganismos han sido la principal fuente de enzimas, ya que presentan numerosas ventajas técnicas y económicas en comparación con las enzimas de origen animal o vegetal. Los microorganismos son una fuente muy versátil de enzimas, pudiéndose aislar nuevos microorganismos productores mediante cribado o “screening” a partir de distintas fuentes naturales y/o de colecciones tipo (ATCC, DSMZ, CECT, etc.). Con ello, se evita el empleo de técnicas de separación y

purificación de las enzimas necesarias para el proceso sintética. Por otro lado, es importante destacar, que, a causa del centenar de enzimas presentes en una célula, la puesta en contacto de la misma con el sustrato puede dar lugar a más de un metabolito secundario, junto al metabolito que se desea conseguir.

Más recientemente, mediante técnicas biotecnológicas como la metagenómica, es posible obtener enzimas nuevas y con capacidades catalíticas novedosas, sobre todo en aquellos casos en los que el microorganismo productor es difícil de crecer *in vitro*; y gracias a que cada vez es mayor el número de genomas secuenciados, mediante el denominado screening *in silico* es posible obtener nuevas enzimas no solo de microorganismos sino también de plantas y animales. Esto unido a que los microorganismos pueden ser modificados mediante ingeniería genética con el fin de producir mayor cantidad de enzima, ha hecho que cada vez sea mayor el número de enzimas disponibles para su aplicación en una gran variedad de campos.

La purificación de las enzimas microbianas suele ser fácil, sobre todo si son extracelulares; en contraste con la extracción de enzimas de origen animal o vegetal que resulta más compleja, ya que requiere de etapas previas que incluyen el aislamiento de los tejidos, así como su homogeneización. Sin embargo, existen muchas enzimas intracelulares que requieren la ruptura celular, lo que complica el proceso de purificación (mayor número de proteínas a separar, aumento de la viscosidad del medio por liberación de los ácidos nucleicos, etc.). En muchas aplicaciones industriales, las preparaciones enzimáticas suelen estar parcialmente purificadas. La desventaja del empleo de una única enzima aislada es que, en ciertas rutas sintéticas, la enzima no sería el único componente necesario para catalizar la reacción con el sustrato, como puede ser en las reacciones redox. (6) (2)

Las células enteras como biocatalizadores, son muy interesantes para reacciones redox, reacciones catalizadas por enzimas dependientes de un cofactor como las que catalizan los procesos de oxígeno rojo. Estos cofactores como NAD (P) H o FADH₂ deben regenerarse, y el resto de componentes celulares se encargan de que este proceso se lleve a cabo, ya que la disponibilidad del cofactor afecta a la biotransformación, y por tanto, a la eficiencia del biocatalizador en el proceso sintético. La mayoría de estos cofactores son moléculas relativamente inestables y extremadamente caras como para ser utilizados en cantidades estequiométricas, adicionándolos en la reacción junto a la enzima purificada. (1)

4. Cáncer

Por otro lado, en las últimas décadas ha aumentado la incidencia de enfermedades crónicas como el cáncer a causa de un progresivo aumento de la esperanza de vida de la población. (7)

El cáncer es hoy en día una de las enfermedades más temidas, ya que es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Afecta por igual a hombres y mujeres, siendo el cáncer de mama el más frecuente en las últimas, con 100 veces más de probabilidad de desarrollarlo, en comparación con un hombre. Este cáncer representa aproximadamente un 23% del total de casos de cáncer, y un 14% de las muertes anuales debidas al cáncer. (8)

Los factores de riesgo más importantes, a tener en cuenta es el sexo femenino y la edad. Otros de los posibles factores de riesgo son la utilización de anticonceptivos orales (ACOs), antecedentes familiares (mutaciones en los genes BRCA1, BRCA2 y p53), obesidad, el tratamiento con radioterapia sobre la mama en la infancia, las enfermedades benignas de la mama, el consumo de alcohol y tabaco, y llevar a cabo una dieta hipercalórica. Unicamente tan solo 1% de los cánceres de mama se presentan en varones. (9)

4.1. Cáncer de mama. Enfermedad y posibles tratamientos

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea. Gracias a los estudios de expresión génica se han identificado distintos biomarcadores que tienen una gran relevancia pronóstica y predictiva en el cáncer de mama y están implicados en el tamaño del tumor y su extensión, así como la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales o distales. Los biomarcadores son el receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2).

Gracias a la clasificación TNM desarrollada por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Internacional Unión Against Cancer (UICC), se puede determinar con mayor facilidad el pronóstico de las pacientes con esta patología. (10) (11)

Tumor primario	Tx:tumor primario no puede ser evaluado
	T0: no hay evidencia de tumor primario
	Tis: carcinoma in situ
	T1-4: tamaño y/o alcance del tumor primario
Ganglios linfáticos regionales	Nx: ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
	N0: no hay metástasis ganglionar linfática regional
	N1-3: metástasis de los ganglios linfáticos regionales (número y/o extensión)
Metástasis	Mx: metástasis a distancia no puede ser evaluada
	M0: no hay metástasis a distancia
	M1: metástasis a distancia

Tabla 1. Estadificación del cáncer según el sistema TNM

(12)

Existen diferentes técnicas disponibles para tratar el cáncer, entre las que se incluyen la cirugía, la radioterapia, la inmunología, y la quimioterapia. Cada uno de los posibles tratamientos tiene sus ventajas y sus limitaciones. Generalmente, se aplican una combinación de las técnicas citadas anteriormente, pero prácticamente todos los protocolos de tratamiento presentan un componente químico. Por este motivo, durante las últimas décadas, existe la necesidad de buscar nuevos fármacos contra el cáncer, no sólo porque los citostáticos existentes son insuficientes, sino también por la resistencia que presentan a la medicación ciertos tumores, con el objetivo de reducir la mortandad prolongando y mejorando la esperanza y calidad de vida de los pacientes. (8)

El tratamiento del cáncer de mama se puede abordar con numerosos fármacos de estructura esteroidea, entre los que destacan los propuestos a continuación (8):

- **Andrógenos**, como la fluoximesterona, pueden utilizarse en el tratamiento de mujeres con neoplasia de mama avanzada y metastásica.
- **Estrógenos** en el tratamiento de neoplasia metastásica avanzada de mama, únicamente utilizados cuando la función ovárica ha cesado. Las hormonas sexuales, que presentan estructura esteroidea, son de interés en el tratamiento de neoplasias. El crecimiento de neoplasias malignas en la mama, la próstata, y el endometrio es a menudo dependiente del

equilibrio hormonal del cuerpo. Se observa que el un equilibrio hormonal gracias a la administración hormonas sexuales produce una remisión del cáncer.

- **Inhibidores de la aromatasa** como el exemestano en el tratamiento de cáncer de mama postmenopáusico. Con tipos de cáncer hormonalmente dependientes. Estos fármacos permiten la reducción de la biosíntesis de estrógenos con el fin de disminuir los niveles de estrógenos, siendo así un tratamiento selectivo y efectivo.

5. Fármacos con estructura esteroidea

Los fármacos con estructura esteroidea son moléculas con un elevado interés farmacológico que han sido y son utilizadas en la prevención y el tratamiento de distintas patologías endocrinas, reumáticas, oncológicas, ginecológicas, etc., con indicaciones como antiinflamatorios, inmunosupresores, diuréticos, anabólicos y anticonceptivos, entre otros. (13) (14) En la actualidad, su síntesis continúa siendo un campo muy importante en la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos antitumorales, ya que alrededor de 300 de los medicamentos autorizados y aprobados hasta la fecha presentan estructura esteroidea, representando la segunda categoría más grande después de los antibióticos. (15)

El empleo de biocatálisis en la síntesis de fármacos esteroideos es una alternativa a la química orgánica clásica ya que estas estructuras son complejas presentando también numerosos centros estereogénicos. (13) (14) Esta estructura compleja es común a todos los fármacos y consta de un esqueleto de 17 átomos de carbono en forma de ciclopentanoperhidrofenantreno. (15)

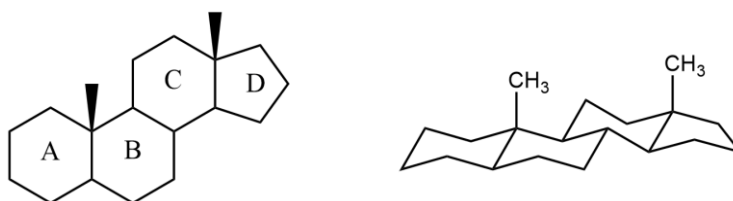


Figura 3. Estructura básica del esteroide

Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo buscar procesos biocatalíticos como alternativa para la síntesis del exemestano, un fármaco utilizado para el cáncer de mama. Para ello, es necesario:

1. Un análisis de las propuestas de síntesis química estudiadas en el exemestano. Se realiza un estudio de las posibles moléculas de partida, ya que para la síntesis de un fármaco con estructura esteroidea siempre se parte de una molécula inicial que ya contenga la estructura de ciclopentanoperhidrofenantreno permitiendo así simplificar el proceso sintético. Una vez analizadas las propuestas de síntesis se estudia cada una de los pasos sintéticos con el fin de detectar aquellas etapas en las que fuese posible aplicar biocatálisis.
2. Búsqueda tanto de células enteras como de enzimas purificadas que puedan ser empleadas en las etapas sintéticas determinadas previamente. En este trabajo, se determinan dos etapas: una oxidación de un grupo hidroxilo presente en el carbono 17 del esteroide, y la formación de un doble enlace entre los carbonos 1 y 2 de la estructura esteroidea. Por tanto, gracias a una búsqueda de enzimas o microorganismos que catalizasen estas reacciones en otros compuestos también esteroideos, se plantean posibles candidatos que tuvieran éxito si estos mismos biocatalizadores se utilizasen en la ruta sintética del exemestano.

Metodología

El método principal utilizado en este trabajo fue la revisión bibliográfica. Para esta búsqueda se utilizaron diversas bases de datos que se encuentran en internet, siendo consultada Pubmed (NCBI) principalmente, utilizando las palabras clave como “steroids”, “synthesis”, “biocatalysis” y “Exemestane”, dando preferencia a aquellas publicaciones previas al 2000.

Además, se recopiló información sobre procesos biocatalíticos descritos en estos fármacos en “Embase” y “Scifinder”, teniendo en este último de acceso gracias a los acuerdos que la Biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid tiene contratados.

Durante la preparación y redacción de este trabajo, fueron consultados también libros electrónicos, patentes registradas, tesis doctorales y publicaciones en revistas científicas (especialmente del CSIC y de la Real Academia Nacional de Farmacia).

Con esta revisión bibliográfica, se obtienen ejemplos de procesos biocatalíticos utilizados en moléculas esteroideas, que pueden ser trasladados a las propuestas de síntesis de fármacos a partir de una estructura esteroidea, siendo esta una posible alternativa a las rutas sintéticas empleadas en la actualidad a nivel industrial.

Paralelamente, para la realización de las moléculas químicas presentes en el trabajo, fue utilizado el programa informático ChemBioDraw®.

Resultados y discusión

En los últimos 40 años, el tamoxifeno y los progestágenos formaban la base de la terapia hormonal frente al cáncer, hasta que aparecieron en el mercado la tercera generación de inhibidores de la aromatasas, entre los que se encuentra el exemestano. (16)

1. Exemestano, Mecanismo de acción y estructura

El exemestano (6-metilenandrosta-1,4-dien-3,17-diona), es el principio activo del Aromasin® (medicamento de referencia), es un inhibidor irreversible de la aromatasas de tipo esteroideo utilizado en el tratamiento del cáncer de mama con receptor ER positivo, ya que se ha observado que el crecimiento de estos tumores depende de la actividad de la aromatasas. Además, no solo disminuye los niveles de estrógenos, sino que incrementa los niveles de testosterona, y los niveles del factor de crecimiento insulínico (IGF). Este fármaco presenta una estructura análoga a la androstenediona, sustrato natural de la aromatasas, por lo que compite con esta en el centro activo de la enzima. (17) (18) (19)

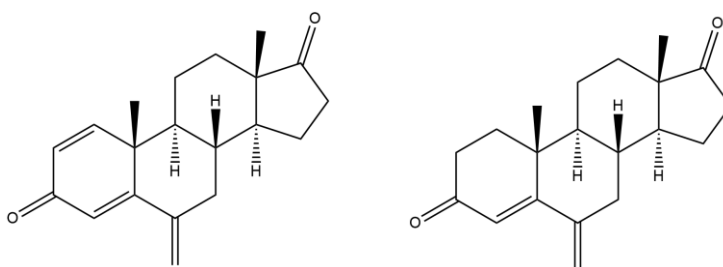


Figura 4. A la izquierda, estructura del exemestano. A la derecha, estructura de la androstenediona.

El mecanismo de acción consiste inicialmente de una interacción entre el fármaco y la aromatasas, lo que favorece la formación de un enlace covalente e irreversible a la enzima,

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

2. Síntesis del exemestano

A nivel industrial, la ruta sintética del exemestano varía dependiendo del compuesto de partida que se utilice. Los posibles metabolitos a utilizar pueden ser androst-4-ene-3,17-diona, testosterona, androsta-1,4-diene-3,17-diona o deshidrotestosterona. A partir de la androst-4-ene-3,17-diona, la ruta sintética propuesta consta de una etapa menos que en el caso de utilizar testosterona como producto inicial, ya que la molécula de partida presenta los dos grupos cetónicos necesarios en el exemestano. Sin embargo, a causa de una complicada purificación cromatográfica de todos los productos de la reacción, la aplicación del método sintético en procedimientos a gran escala no es posible.

Como alternativa, la síntesis del exemestano utilizando testosterona de partida fue propuesto en el trabajo de Marcos-Escribano y cols. Esta síntesis será explicada a continuación.

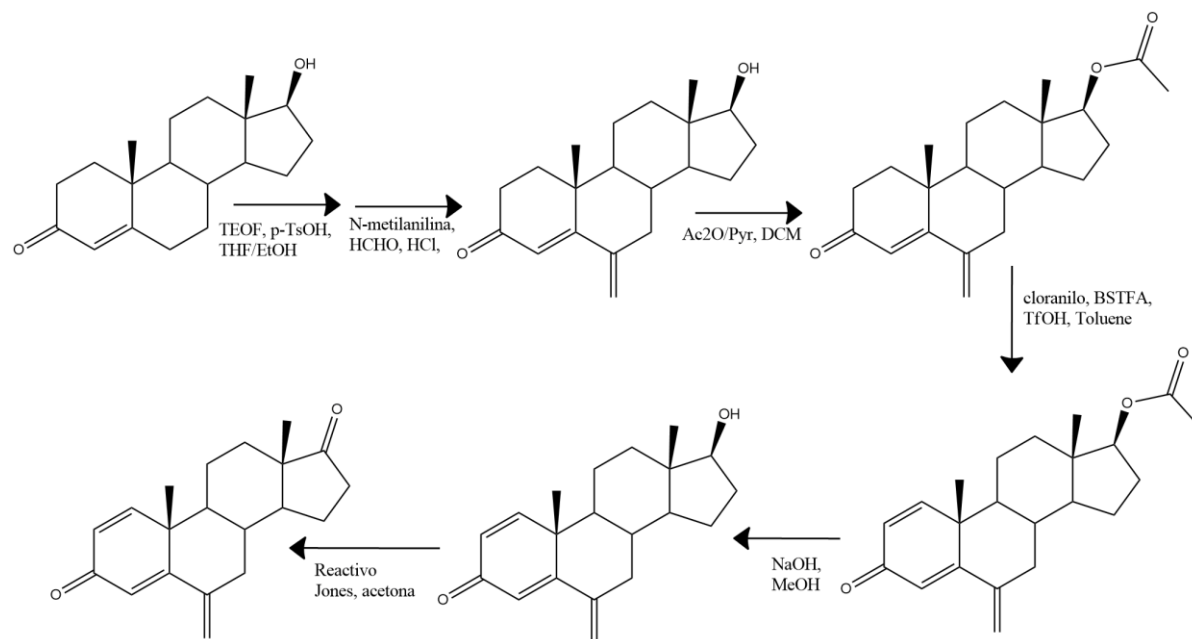


Figura 5. Síntesis química del Exemestano, propuesta por Marcos-Escribano y cols.

La introducción directa de un grupo metileno en la posición 6 de un esteroide 3-oxo-4-eno es un proceso conocido. Esta síntesis propuso la 6-metilenación de la testosterona por tratamiento del esteroide con ortoformiato de trietilo en tetrahidrofurano-EtOH al 40°C en presencia de ácido p-toluenosulfónico.

Se produjo así a formación del intermedio etil $\Delta^{3,5}$ -enoléter que fue tratado con N-metilanilina y formaldehído acuoso a 40°C. El aislamiento de 6-metilentestosterona se consiguió después de la eliminación promovida por HCl junto a N-metilanilina por cuaternización del precursor de Mannich con un rendimiento aislado del 89% después de la precipitación. Previo a la deshidrogenación, se produce la acetilación de la función hidroxilo, que a continuación de la deshidrogenación se realizará una saponificación del acetato con NaOH 1M en metanol.

La deshidrogenación de la 6-metilentestosterona se llevó a cabo con 4,2 equivalentes de BSTFA (N, O - bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida), 1,1 equivalentes de clorano y 0,1 equivalentes de ácido triflico, junto a tolueno en reflujo para durante 18 horas obteniendo un rendimiento del 85%.

Finalmente, se recurre a una oxidación del grupo hidroxilo de la posición 17, gracias al reactivo de Jones en acetona. Se consigue así, un procedimiento a gran escala para transformar la testosterona en exemestano mediante la aplicación de una secuencia de 5 pasos con un rendimiento global del 70%. (20)

3. Análisis de la ruta sintética del exemestano

Al estudiar con detenimiento la ruta sintética anterior, y con el objetivo de proponer una síntesis alternativa del exemestano utilizando biocatálisis, es posible observar que la reacción de acetilación del grupo hidroxilo en la posición 17, es simplemente una protección de este mismo grupo, por lo que se descarta que sea una reacción en la que emplear biocatálisis, ya que, por otro lado, si se dispone de un biocatalizador para la deshidrogenación, la reacción de acetilación sería innecesaria.

Por tanto, una de las etapas interesantes de aplicación de biocatálisis en la deshidrogenación. Junto a ella, otra de las reacciones viables con biocatalizadores en la oxidación del hidroxilo a grupo cetónico.

4. Propuestas biocatalíticas

La búsqueda de posibles biocatalizadores ha permitido proponer el desarrollo de un proceso sintético adecuado para la obtención de exemestano.

Gracias al empleo de biocatálisis aplicadas en otras estructuras esteroideas, se han conocido un elevado número de candidatos aptos para catalizar las reacciones propuestas anteriormente.

A. 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa

Esta enzima pertenece a un grupo de enzimas oxidorreductasas. Esta enzima es la responsable de catalizar la oxidación o reducción de la función hidroxilo o cetona de la posición 17 de la estructura esteroidea. Son moléculas dependientes del cofactor NAD(P)H. (21) (22) Este proceso de oxidorreducción es reversible; por ello, es factible emplear esta enzima para la última etapa de síntesis del exemestano mediante procesos biocatalíticos.

Para ello, se han estudiado distintas situaciones en las que se han empleado biocatalizadores que podrían presentar esta enzima o una similar, en este caso, microorganismos para llevar a cabo la oxidación de la función hidroxilo del carbono 17 de un esteroide a cetona.

En 2008, Al-Aboudi y cols llevaron a cabo la biotransformación de la testosterona con dos microorganismos, *R. stolonifer* y *F.lini* (23) En este trabajo, el resultado fue la detección de tres de los cinco metabolitos originados por *R. stolonifer* que presentaban el grupo hidroxilo oxidado. Además, todos los metabolitos generados por *F.lini* también lo presentaban. Las estructuras de estos compuestos fueron establecidas gracias a técnicas espectroscópicas tales como IR, EIMS o RMN. Se cree que la oxidación de la testosterona en androst-4-en-3,17-diona es seguida por la posterior oxidación de Baeyer-Villiger del anillo D, proporcionando testolactona, que es el principal metabolito producido por *R. stolonifer*. Por tanto, se podría optimizar el empleo de *R. stolonifer*, con el fin de evitar la oxidación del anillo D, pero manteniendo la oxidación del hidroxilo.

Desde entonces se han escrito varios trabajos sobre el uso de microorganismos procedentes del reino fungi sintetizar derivados de testosterona. Así, en 2014, Sabrieh Ghasemi y cols. emplea cuatro especies fúngicas como son *A. griseolla*, *A. chrysogenu*, *F.fujikuroi* y *F.solani* para el estudio de los posibles metabolitos generados por estos

microorganismos a partir de testosterona y heptanoato de testosterona. (24) Para la caracterización de los metabolitos generados, se utilizó técnicas como IR, EI-MS, RMN, punto de ebullición, todo ello junto a una comparación con datos bibliográficos encontrados. Además, para la cuantificación de los mismos, se utilizó como técnica el HPLC.

El heptanoato de testosterona fue incubado con las especies *F.fujikuroi* y *F.solani* produciendo testosterona, 6- β -hidroxi-testosterona y androst-4-eno-3,17-diona, siendo el metabolito principal la 6- β -hidroxi-testosterona con un elevado rendimiento.

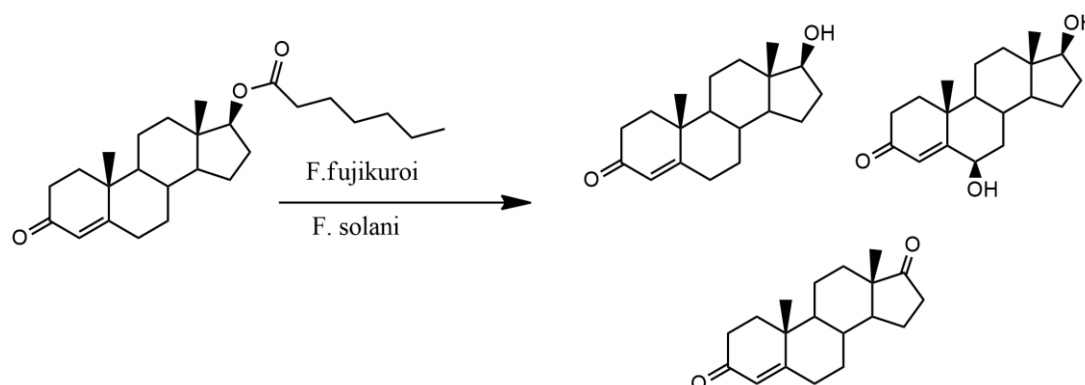


Figura 6. Compuestos originados del heptanoato de testosterona con *F. fujikuroi* y *F.solani*

En el caso de la utilización de las especies *A. griseolla* y *A. Chrysogenu*, fueron obtenidos testosterona, 6- β -hidroxi-testosterona y 14- α -hidroxitestosterona, siendo este último el metabolito más abundante.

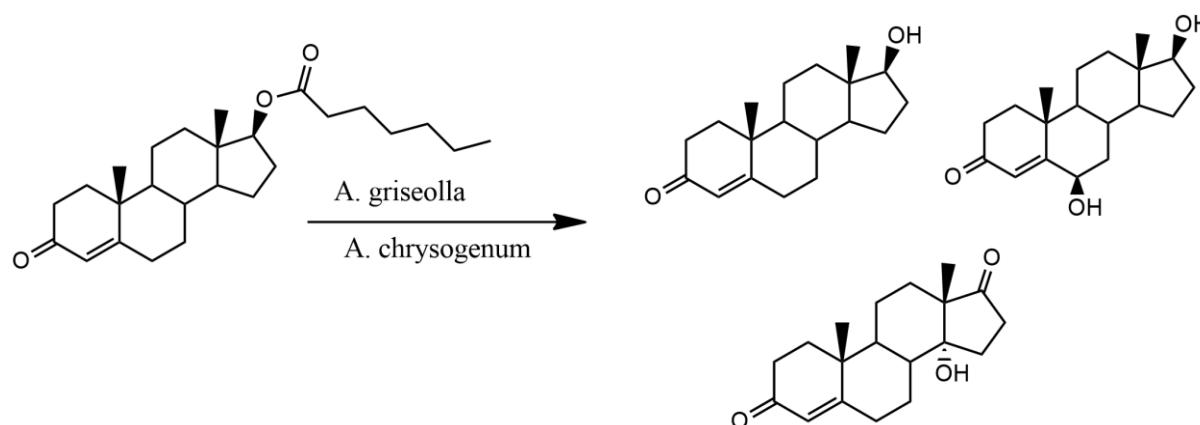


Figura 7. Compuestos originados del heptanoato de testosterona con *A. griseolla* y *A.chrysogenum*

Con el fin de examinar la influencia del grupo éster, los resultados obtenidos en este estudio nos llevan a concluir que el empleo de un compuesto que presente un éster en el

hidroxilo del carbono 17 del esteroide no es una buena alternativa si el objetivo es oxidar esta posición, ya que el heptanoato de testosterona es prácticamente inerte a la oxidación.

No obstante, con el empleo de testosterona como compuesto de partida, los resultados obtenidos indicaron que la testosterona era inerte a la hidroxilación por *F. fujikuroi* y sólo se obtuvo androst-4-eno-3,17-diona con un rendimiento de la reacción del 36%. El compuesto mayoritario que se formó a partir de la biotransformación de heptanoato de testosterona (6- β -hidroxi-testosterona) no fue detectado en la conversión de testosterona.

Asímismo, según describieron Sabrieh Ghasemi y cols. partiendo de la testosterona utilizando *A. griseolla* dio como resultado la formación de androst-4-eno-3,17-diona y 14- α -hidroxitestosterona, esta última con un rendimiento muy bajo (6%).

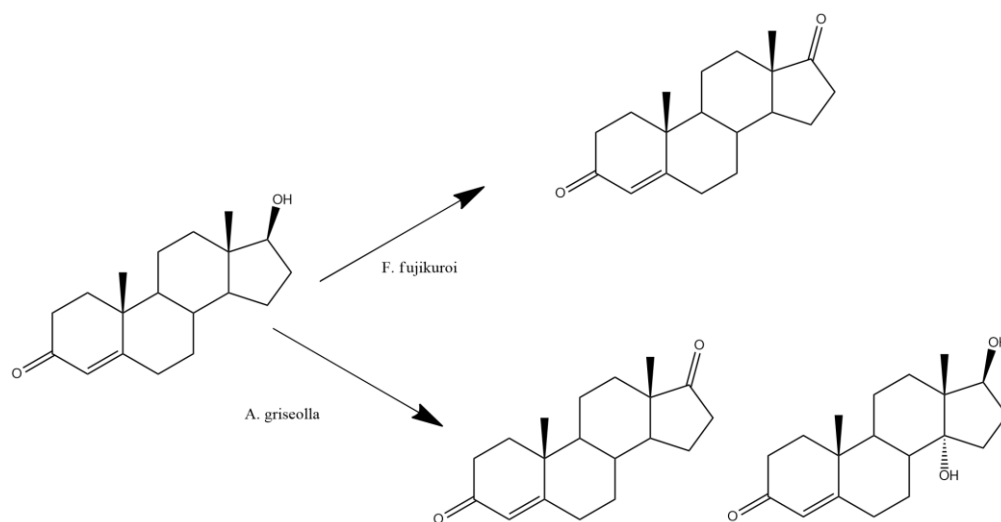


Figura 8. Compuestos originados de la testosterona con *A. griseolla* y *F.fujikuroi*.

Gracias al estudio de estos microorganismos, resulta interesante el uso de *A. griseolla* o *F. fujikuroi* como punto de partida de la aplicación de la biocatálisis en la ruta sintética del exemestano para la etapa de oxidación del grupo hidroxilo de la posición 17 del esteroide, pudiendo tener unos resultados favorables y un porcentaje bajo de metabolitos secundarios.

B. 3-cetoesteroid- Δ^1 - deshidrogenasa (KstD)

Es una enzima microbiana que cataliza la trans-eliminación de los átomos de hidrógenos de los carbonos 1 y 2 del anillo A de la estructura del esteroide. Esta enzima es dependiente de FADH, y ha sido encontrada en distintas bacterias, entre las que se incluyen - *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. and *Arthrobacter* sp. Se han encontrado diferentes

isoformas de la enzima, ya que la especificidad del sustrato podría ser dependientes de la cepa. (25) Además, de forma general, presentan un amplio espectro de sustratos, lo que hace que pueda ser una buena candidata para la etapa sintética del exemestano.

La introducción del doble enlace C1-C2 en el anillo A de los esteroides podría mejorar la actividad biológica comparado con el sustrato original de esteroides, por lo que puede ser el motivo de que el exemestano lo presente.

Bibliográficamente, existen distintos trabajos en los que se hayan empleado deshidrogenasas para la formación de dobles enlaces en los distintos anillos de la estructura esteroidea, pero en el trabajo descrito a continuación, se detalla el empleo de esta enzima procedente de *Gordonia neofelifaecis* expresada en *E.coli* para catalizar la reacción buscada en el exemestano.

En el trabajo de Weiyi Wang y cols. se estudia la 3-cetoesteroid- Δ^1 -deshidrogenasa de *Gordonia neofelifaecis*, con la capacidad de degradar el colesterol. Para ello, se clona la los genes de la enzima 3-cetoesteroid- Δ^1 -deshidrogenasa de *Gordonia neofelifaecis* utilizando como vector *E.coli*. Para ello, inicialmente el gen de la KstD fue amplificado. Después, el gen de esta enzima se subclonó con un vector comercial de *E. coli* pET28a (+) y la proteína KstD₃ recombinante fue expresada en células BL21 (DE3). Por tanto, las células de *E.coli* expresan esta enzima, y fueron probadas en la reacción de deshidrogenación de la androst-4,9(11)-dien-3,17-diona. La capacidad de catalizar la reacción de las células de *E.coli* fue confirmada utilizando HPLC. Por otro lado, las estructuras de los productos fueron determinadas por técnicas espectroscópicas incluyendo RMN y TOF-MS.

Se pudo observar que los sustratos de mayor preferencia de la enzima son los 3-cetoesteroides como son la androst-4-en-3,17-diona y la androst- 4,9(11)-dien-3,17-diona, con un porcentaje de la conversión del 96%, en androst-1,4-en-3,17-diona y androst-1,4,9(11)-trien-3,17-diona respectivamente.

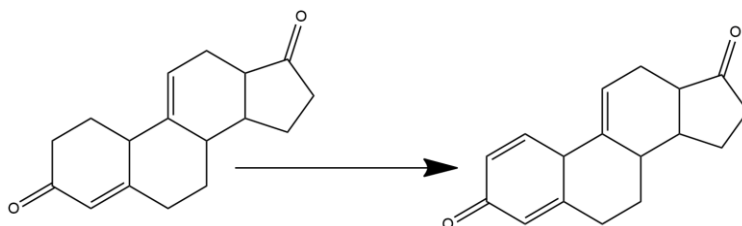


Figura 9. Reacción catalizada por KstD de *G. neofelifaecis* expresada en *E.coli* utilizando andros-4,9(11)-dien-3,17-diona como sustrato

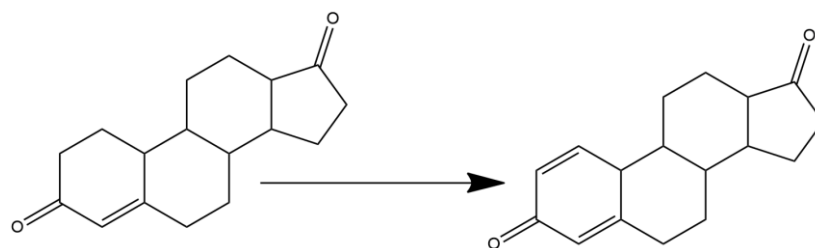


Figura 10. Reacción catalizada por KstD de *G. neofelifaecis* expresada en *E.coli* utilizando andros-4-en-3,17-diona como sustrato

También se pudo comprobar que esta enzima no presenta la capacidad de catalizar reacciones de deshidrogenación sobre la molécula de colesterol.

Claramente, el uso de células de *E.coli* que expresen 3-cetoesteroid- Δ^1 - deshidrogenasa procedente de *Gordonia neofelifaecis* puede ser una opción a contemplar para la síntesis del exemestano, ya que este presenta una estructura muy similar a la androst-4-en-3,17-diona, metabolito de preferencia de esta enzima.

Conclusiones y perspectivas de futuro

Actualmente, es importante la optimización de los procesos sintéticos de los fármacos, especialmente los anticancerígenos ya que se sintetizan en cantidades elevadas. Por ello, la biocatálisis está experimentando un auge continuo en la Industria Farmacéutica, permitiendo conseguir un rendimiento óptimo de producción, disminuyendo las sustancias de desecho. Es conveniente destacar, la no necesidad de proteger los sustituyentes, ya que en el caso del exemestano, simplifica la ruta sintética en un menor número de etapas porque las condiciones de reacción son muy suaves, y gracias a la precisión y especificidad de la enzima, esta catalizará la reacción en el grupo que se desea. Esto evita a su vez, la presencia de metabolitos secundarios que complicarían la purificación del compuesto buscado.

La problemática presentada para la biocatálisis, es una versatilidad limitada, ya que las enzimas catalizan reacciones únicamente con sustratos concretos, por lo que es importante un amplio conocimiento del enzima previo a la puesta en marcha de la biocatálisis. Haciendo hincapié en esta desventaja, se podrá desarrollar nuevos protocolos de síntesis de compuestos antitumorales más eficientes tanto desde el punto de vista energético como económico.

Bibliografía

1. *Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions.* **J.D. Carballeira, M.A. Quezada, P. Hoyos et all.** Biotechnology Advances 27. 686–714 : s.n., 2009.
2. *Biocatálisis y biotecnología.* **Arroyo, M. y Acebal, C. y Mata, I. de la.** Arbor, 190 (768): a156 : s.n., 2014.
3. *Enzyme promiscuity: using the dark side of enzyme specificity in white biotechnology.* **Benu Arora, Joyeeta Mukherjee, Munishwar Nath Gupta.** Sustainable Chemical Processes 2:25 : s.n., 2014.
4. *Biotecnología: Presente y futuro.* **Montero, José Maria Sánchez.** Real Academia Nacional de Farmacia : s.n., 2011.
5. *Biotechnology for Chemical Production: Challenges and Opportunities .* **Mark J. Burk, Stephen Van Dien.** Trends in Biotechnology, Vol. 34, No. 3 : s.n., 2016.
6. *Alize Z Coelho, Bernardo D. Ribeiro. White Biotechnology for Sustainable Chemistry.* 2015.
7. *Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010.* **David J. Newman, Gordon M. Cragg.** Journal of Natural Products 75, 311–335. American Chemical Society : s.n., 2012.
8. *Man-Made Cytotoxic Steroids: Exemplary Agents for Cancer Therapy.* **Acharya, Ranju Bansal and Pratap Chandra.** Chemical Reviews. American Chemical Society : s.n., 2014.
9. **Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL et al. Lippman M. Cáncer de Mama.** Eds. Harrison Principios de Medicina Interna.Vol 1. 18ª ed. México: McGraw-Hill; p. 441-446 : s.n., 2013.
10. What is Cancer Staging?. AJCC. The American Joint Committee on Cancer [Sede Web]. . 2009. <https://cancerstaging.org/references-tools/Pages/What-is-Cancer-Staging.aspx>.
11. *Molecular subtyping for clinically defined breast cancer subgroups.* **Xi Zhao, Einar Andreas Rødland, Robert Tibshirani et all.** Breast Cancer Research 17:29 : s.n., 2015.
12. *Revision of the American Joint Committee on Cancer. Staging System for Breast Cancer.* **S. Eva Singletary, Craig Allred, Pandora Ashley et all.** J Clin Oncol 20:3628-3636. American Society of Clinical Oncology. : s.n., 2003.
13. *Transformation of Steroids by Actinobacteria: A Review.* **Donova, M. V.** Applied biochemistry and microbiology Vol. 43 No. 1 : s.n., 2007.

14. *Microbial conversion of steroid compounds: recent developments.* **P. Fernandes, A. Cruz, B. Angelova et all.** Enzyme and Microbial Technology 32. 688–705 : s.n., 2003.
15. *A Whole-cell Biocatalysis Application of Steroidal Drugs.* **Syed Adnan Ali Shah, Sadia Sultan et all.** Orient. J. Chem., Vol. 29(2), 389-403 : s.n., 2013.
16. *The Role of Aromasin in the Hormonal Therapy of Breast Cancer.* **Dank, Magdolna.** Pathology Oncology Research. Vol 8, No 2. : s.n., 2002.
17. *Microbial transformation of anti-cancer steroid exemestane and cytotoxicity of its metabolites against cancer cell lines.* **Elias Baydoun, Marium Bibi, Muhammad Asif Iqbal et all.** Chemistry Central Journal, 7:57 : s.n., 2013.
18. *Unravelling exemestane: From biology to clinical prospects.* **Ana Filipa Sobral, Cristina Amaral, Georgina Correia-da-Silva et all.** Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology : s.n., 2016.
19. *Review of hormone-based treatments in postmenopausal patients with advanced breast cancer focusing on aromatase inhibitors and fulvestrant.* **Iben Kümler, Ann S Knoop, Christina A R Jessing et all.** ESMO Open;1 : s.n., 2016.
20. *1,2-Dehydrogenation of steroidal 6-methylen derivatives. Synthesis of exemestane.* **Andrés Marcos-Escribano, Francisco A. Bermejo, Antonio Lorente Bonde-Larsen et all.** Tetrahedron 65, 7587–7590 : s.n., 2009.
21. *Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases.* **Gabriele Moellera, Jerzy Adamskia.** Molecular and Cellular Endocrinology 301, 7–19 : s.n., 2009.
22. *Structural and biochemical insights into 7beta-hydroxysteroid dehydrogenase stereoselectivity.* **Simone Savino, Erica Elisa Ferrandi, Federico Forneris et all.** Proteins; 84:859–865. : s.n., 2016.
23. *Microbial transformation of testosterone by Rhizopus stolonifer and Fusarium lini.* **Amal Al-Aboudi, Mohammad Yasin Mohammad, S. Ghulam et all.** Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 22:17, 1498-1509 : s.n., 2008.
24. *Biotransformation of testosterone and testosterone heptanoate by four filamentous fungi.* **Ghasemi, S., Mohajeri, M., Habibi, Z.** Steroids : s.n., 2014.
25. *Heterologous expression and characterization of a 3-ketosteroid-Δ1-dehydrogenase from Gordonia neofelifaecis and its utilization in the bioconversion of androst-4,9(11)-dien-3,17-dione.* **Weiyi Wang, Fanglan Ge, Caihong Ma, et all.** 3 Biotech, 7:19 : s.n., 2017.