

Ecdiesteroides II. Propiedades geométricas y electrónicas: una aproximación QSAR para determinar el potencial de actividad biológica

Noel Ferro, Juan E. Tacoronte,* Luis. A. Montero,** María T. Cabrera Pedroso*** y Armando Zaldo.*

Lab. Biotecnología de las Plantas, Facultad. Agronomía y Forestal, Universidad de Pinar del Río. *Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de la Habana, Calzada de Zapata y calle G. El Vedado, Plaza de la Revolución, Código Postal 10400. email taco@fq.uh.cu **Grupo de Química Computacional y Teórica, Bioinformática, Facultad de Química, Universidad de la Habana, Calzada de Zapata y calle G, El Vedado, Plaza de la Revolución. ***Oficina Cubana de la Propiedad Intelectual. Depto COMPITEC, Picota y Luz, Habana Vieja, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 21 de febrero de 2003. Aceptado: 8 de septiembre de 2004.

Palabras clave: ecdiesteroides, relación estructura-actividad, Hyperchem, HOMO, LUMO.
Key words: ecdysteroids, quantum structure-relationship, Hyperchem, HOMO, LUMO.

RESUMEN. Se hace un análisis molecular a nivel semiempírico de los ecdiesteroides, uno de los grupos hormonales más importantes del reino animal. Actualmente, se han descrito más de 120 compuestos naturales pertenecientes a esta familia, los cuales están involucrados en los procesos de metamorfosis, desarrollo, reproducción y activación metabólica de los procesos vitales de los invertebrados (esp. Artrópodos) y además, pueden ser antagónicos de los brasinosteroides en plantas, donde actúan como agentes protectores contra insectos fitófagos. En esta comunicación, se describen los estudios preliminares mecano-cuánticos y estructurales, de 21 ecdiesteroides naturales diferentes (a partir de la ecdisona y sus modificaciones) y la relación estructura-actividad biológica, así como los principales parámetros y descriptores que potencian la acción ecdiesteroides y las interacciones con el receptor (distancia O_3-O_{22} ; O_{22} -HOMO 3; áng. 2,3,4; áng. 8,9,10; distancia C_2-C_3 ; O_3 Mayor contribuyente a HOMO-3; Carga de C_{16}). Se detalla el proceso analítico hasta la obtención de una ecuación que describe el comportamiento de las relaciones estructura-actividad para una serie de dichos compuestos a partir de las variables determinadas a partir de cuya resolución se diferencian significativamente los grupos de moléculas con actividad biológica diferente a partir de la estructura base. $Y = -15\,071,3 + 66,506 (O_{22} \text{ HOMO } 3) - 10,166 (O_3 \text{ HOMO } 3) + 34,278 (\text{distancia } O_3-O_{22}) + 172,6983 (\text{distancia } C_2-C_3) - 24,306 (\text{áng. } C_{2,3,4}) + 127,276 (\text{áng. } C_{8,9,10}) - 611,975 (q_{C_{16}})$.

ABSTRACT. A molecular analysis of natural ecdysteroids compounds is made at semi-empiric level, The ecdysteroids are one of the most important hormonal groups in the animal kingdom. At present more than 120 compounds relates to this family of metabolites. been involved in the processes of metamorphosis, development, reproduction and metabolic activation of living events of invertebrates (spec. Arthropoda) have been described and they can also be antagonistic of the brassinosteroides in plants where they provide a potential defense against phytophagous insect plagues. The aim of the undertaken report is a preliminary mechano-quantum study of some electronic properties (and structural fragments) and their significance to bioactivity of 21 different natural ecdysteroids (starting from ecdysone and its modifications) and their interactions with the receptor (Distance O_3-O_{22} ; O_{22} -HOMO 3; ang. 2,3,4; ang. 8,9,10; distance C_2-C_3 ; O_3 mayor contribution to HOMO-3; Charge C_{16}). In the course of reported investigation is detailed an equation which describes, satisfactory, the behavior of relationship between structure and bioactivity for a series of described compounds starting from base structure of ecdysone. $Y = -15071.3 + 66.506 (O_{22} \text{ HOMO } 3) - 10.166 (O_3 \text{ HOMO } 3) + 34.278 (\text{distance } O_3-O_{22}) + 172.6983 (\text{distance } C_2-C_3) - 24.306 (\text{ang. } C_{2,3,4}) + 127.276 (\text{ang. } C_{8,9,10}) - 611.975 (q_{C_{16}})$

INTRODUCCION

La evolución de los organismos es, básicamente, el resultado de un complejo y cambiante entorno celular en interacción constante con el medio ambiente, que se manifiesta por una especialización más eficiente en el desarrollo de:

- mecanismos de control interno en la célula, (señales químicas intracelulares).
- mecanismos de control externo de la célula (señales químicas intercelulares).
- un vínculo entre el medio ambiente y los genes. De esta forma, se genera un "control quimio-evolutivo" que garantiza el desarrollo de todo el organismo, tejido, célula.^{1,2}

Un ejemplo del complejo sistema de señales químicas que aparecen en un organismo multicelular, son las transformaciones (metamorfosis) durante el ciclo de vida de los insectos (e invertebrados) en los diferentes estados larvales. Aquí media la acción de los esteroides, cuyo mecanismo de acción, en respuesta a efectos neuroendocrinos, tienen marcada influencia en el crecimiento, desarrollo de tejidos, reproducción y la homeostasis.³ A estos estados larvales entre fases se les llama muda. La ecdisona, hormona esteroide de la "muda y(o) metamorfosis", siguiendo el mecanismo clásico, es producida por las glándulas

protorásicas, después que estas son activadas por neuropéptidos. Esta hormona controla los eventos directamente vinculados con la muda, que controlan la morfogénesis.^{2,4}

Los ecdiesteroides, compuestos estructuralmente relacionados con la ecdisona, son hormonas lipídicas de tipo esteroide, de acción a distancia que han sido estudiados profundamente.⁵ Se conoce que durante la muda un agente de endurecimiento, la *N*-acetil-dihidroxiifeniltiamina, aparece en las células epidérmicas de la larva. Esta sustancia es derivada por decarboxilación a partir de la dihidroxiifenilalanina cuya reacción es llevada a cabo por la aparición de un tipo de ARN mensajero que instruye a los ribosomas en la producción de la enzima decarboxilasa. Este ARN mensajero es únicamente producido bajo la influencia de la ecdisona.^{2,4}

Se considera que todas las respuestas endocrino-metabólicas generadas por ecdiesteroides son mediadas por un complejo receptor intracelular con tres componentes fundamentales, EcR, UsP y el de unión con el ecdiesteroides que es de gran especificidad y afinidad con una $K_D = 30$ nmol/L. Sin embargo, los elementos estructurales requeridos para la actividad hormonal a partir de los tres sitios de contacto propuestos para la interacción no están claros, incluso, se contradicen con una de las definiciones de ecdiesteroides propuesta en 1989⁶ y, al mismo tiempo, las evidencias acumuladas indican que los ecdiesteroides también pueden generar efectos no genómicos. Consecuentemente, los estudios de relación estructura-actividad (SAR) pueden estar influenciados por el tipo de especie de invertebrado utilizado, su estado de desarrollo y el formato del bioensayo, así como problemas típicos (pureza de los compuestos evaluados, penetrabilidad, metabolismo, etc.).

A partir de ensayos *in vivo*⁷⁻⁹ e *in vitro* (ensayos de pupación en *Calliphora* y *Musca*), se dedujeron algunos requerimientos estructurales para que se manifieste actividad ecdiesteroides:

- Unión *cis* de los anillos A/B.
- Existencia del grupo 7-en-6-ona.
- Cadena lateral completa con una función oxo en la posición 22R, que contiene ocasionalmente grupos alquilo en la posición 24 α
- Una función oxigenada, generalmente en forma de 3 β -OH.
- Grupos OH adicionales en C_{14 α} ; C_{2 β} y en varios casos en C₂₀ y C₂₅.

Recientemente, un estudio sistemático con conjugados de ecdisona (ésteres, glucósidos) empleando *Sarcophaga* (Díptera) y *Galleria* (Lepidóptera) reveló que los derivados 2-acetilo y derivados 25-benzoato de 20-ecdisona retienen una significativa actividad mientras que derivados di- y tri-ésteres apenas manifestaban efecto ecdiesteroides,¹⁰ los resultados de los estudios *in vivo* han demostrado que existe una amplia variación en la susceptibilidad de ecdiesteroides específicos, e igualmente amplia variación en la respuesta metabólica de una especie de insecto frente a diferentes estructuras moleculares. Debido a esto, se han desarrollado extensivos estudios en un intento de "cuantificar" las relaciones estructura-actividad.^{11,12} Estas relaciones fueron evaluadas mediante CoMFA (comparative molecular field analysis) y QSAR para generar modelos con potenciales capacidades predictivas y proponer una hipótesis sobre farmacóforos para las interacciones de los ecdiesteroides con el receptor. En esta hipótesis, la capacidad de interacción es el resultado de un incremento de las contribuciones de fragmentos (sub-unidades) moleculares (heteroátomos en C₂, C₃, C₂₀, C₂₂, dipolo en C₆, ángulos y distancias de enlaces, etc.). Cada una de estas sub-unidades estructurales contribuye a la afinidad por el receptor, incrementando la posibilidad de interacciones enlazantes, pero ninguna constituye un requisito absoluto. En comparación con las primeras conclusiones SAR empíricamente determinadas, está claro que la unión *cis* A/B, el Δ^7 doble enlace, el grupo 6-ceto, una cadena carbonada de ocho átomos de carbono en C₁₇ y cada uno de los grupos OH mencionados, no son esenciales para la actividad biológica, pero, la ausencia de 7-en-6-ona inhibe toda acción ecdiesteroides. También ha quedado demostrado que las consecuencias de la adición, sustitución y eliminación de fragmentos estructurales individuales no es siempre aditiva. Los resultados sobre actividad biológica obtenidos para ecdiesteroides han contribuido significativamente en el desarrollo de otros modelos de estudios sobre interacciones con el receptor de aquellos, empleando homologías moleculares y técnicas 4D-QSAR y de modelación CoMFA-3D (4D) QSAR.^{13,14}

En este contexto, el estudio de las singularidades estructurales de

derivados ecdiesteroides y su correlación con la actividad biológica potencial, es de gran significación y constituye una vía interesante para potenciar agentes endocrinos para control de crecimiento, útiles en el manejo integral de plagas en condiciones de desarrollo ecológicamente sustentable.

Este trabajo se propuso como objetivos, determinar, cuantitativamente, los puntos clave de la molécula que desencadenan la acción ecdiesteroides, a partir de la relación estructura-actividad y del análisis de propiedades electrónicas y propiciar una herramienta matemático-estadística que permitiera discriminar las moléculas más activas de las menos activas, en aras de generar una filosofía sintética de análogos potencialmente utilizables en el control de especies de insectos perjudiciales con percepción ecológicamente sostenible

MATERIALES Y METODOS

El estudio de las moléculas de los ecdiesteroides fue realizado a partir de diseños elaborados en el programa HYPERCHEM. Se realizó una primera optimización de geometría con mecánica molecular (MM3). Los cálculos químico-cuánticos fueron realizados a nivel semiempírico utilizando el formalismo PM3. Fue utilizado el paquete MOPAC en su versión 6.0. Para el cálculo de la ubicación espacial de los orbitales se utilizó la opción ZINDO/S en HYPERCHEM 5.02.

La metodología seguida en este caso para el trabajo fue calcular y optimizar inicialmente la geometría de la ecdisona y posteriormente, se fueron eliminando o adicionando grupos funcionales que esta molécula posee y que coinciden con las estructuras conocidas de esta familia de compuestos. Para el caso de cambios en la geometría, se hicieron los respectivos arreglos, de forma tal, que quedaron estructurados todos los compuestos de la vía metabólica que se conocen hasta el momento. También se estudiaron otras moléculas que manifiestan actividad biológica agonista o antagónica de ecdiesteroides con estructura análogas a la ecdisona.

Se calcularon las propiedades (*descriptores*) que fueron utilizadas como variables en los análisis estadísticos, a saber: potenciales de ionización; energía de los orbitales frontera HOMO y LUMO, así como de los orbitales contiguos HOMO -1 hasta el -5 y LUMO +1 hasta +3; áto-

mos de mayor contribución a cada uno de estos orbitales moleculares; átomos de oxígeno que contribuyen a los orbitales HOMO-3 y HOMO-4; distribución espacial de los orbitales HOMO, LUMO y HOMO-3; distancias entre átomos intramoleculares, ángulos de valencia y diedros (τ) entre todos los átomos de la molécula que forman los anillos; carga de cada uno de los átomos. Las propiedades obtenidas representan un total de 167 variables analizadas para cada molécula (Figuras 1 y 2 y Tabla 1).

Una vez calculadas las variables, se procedió a caracterizar las moléculas estadísticamente para estudiar las diferencias, entre otros, desde el punto de vista químico-cuántico, así como determinar las variables que las provocan.

Se utilizaron técnicas estadísticas descriptivas y confirmatorias [análisis de "cluster" y de discriminante mediante el método Lambda de Wilks y la prueba-*t* (paquete estadístico SPSS versión 10 de 1999)]. Todos los cálculos se realizaron en un ordenador personal IBM-PC con procesador Pentium III a 750 MHz con 128 MB de memoria RAM.

RESULTADOS

Ante un fenómeno complejo, como el estudio de las causas que provocan las variaciones en la actividad biológica de los ecdiesteroides, se hace necesario analizar la influencia de los elementos que caracterizan, por parte y en conjunto, la estructura molecular correspondiente. Por tanto, primero, se definieron de la forma más simple posible, las relaciones estructurales de las que depende, primariamente, dicha actividad. Así entonces, el análisis de la presencia-ausencia de diferentes grupos OH u otros sustituyentes en las moléculas facilitó la primera aproximación al problema.

A partir de la clasificación de las moléculas por su actividad biológica en tres categorías, [Actividad biológica $>$, $=$, $<$ 100 %], se realizó una agrupación que responde a esta formulación (Fig. 3). Esto permitió conocer los sustituyentes en la molécula que discriminan estos tres grupos de actividad biológica. La existencia del OH en la posición del C_{22} y la relación funcional de los OH en la posición C_5 y C_{14} son de vital importancia en esta diferenciación. Si se disminuye la potencia de la prueba para tratar de entrar más variables al análisis, entonces apare-

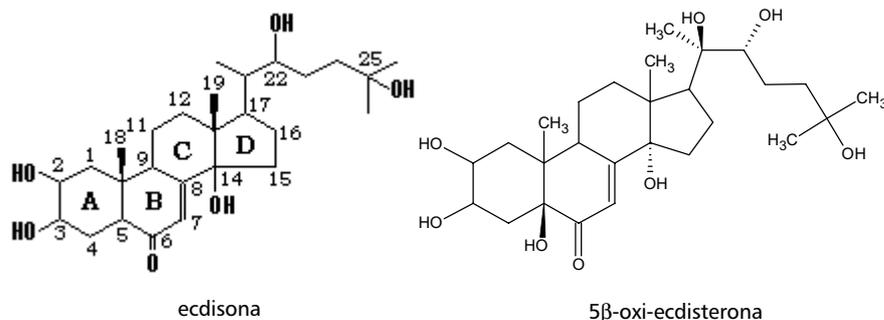


Fig. 1. Representación y numeración de la ecdisona y de la 5β-oxi-ecdisterona.

ce la existencia de grupos OH o CH_3 en la posición C_{24} .

Sin embargo, la membresía predicha por las funciones discriminantes (Tablas 2 y 3) una vez que se realiza la validación cruzada asegura que el primer grupo [Actividad biológica $>$ 100 %] con una sola molécula, no es suficiente para dar un criterio definitivo acerca de las diferencias desde el punto de vista estadístico. Aunque, según se mostró, la variable que más diferencia es la existencia de los grupos OH en C_5 y C_{14} . En el segundo grupo, después y antes de la validación cruzada, se logra una membresía del 89,9 %. El tercer grupo solo predice correctamente una membresía del 54,5 %. Esto indica que la existencia o no de sustituyentes (generalmente OH) no agotan la explicación de una dependencia funcional entre las propiedades estructurales y la actividad biológica.

Hecha la selección de las variables que discriminan la existencia de actividad biológica diferente, se realizó un análisis estadístico confirmatorio. De los resultados estadísticos, se infiere que el elemento estructural fundamental que promueve actividad biológica es el OH en la posición C_{22} , debido a que ninguna otra sustitución promueve diferencias claramente visibles en ella (Fig. 4, Tabla 4).

Si de estos análisis confirmatorios se toman solo dos grupos de actividad biológica, para lo cual, se determinó como punto de partida la media de la actividad biológica, como referencia [100 % \geq Actividad biológica $<$ 100 %] queda definitivamente demostrado que el OH en la posición C_{22} es la sustitución que determina esta agrupación con un 76,2 % de casos clasificados correctamente en el análisis de discriminante (Tabla 5). No clasificaron correctamente en cuanto a su actividad biológica a partir de la estructura, cinco moléculas de las 9 pertene-

cientes a las de actividad menor de 100 %.

Para el caso de la predicción determinada por la ecuación en la función con OH en C_{22} entre las moléculas con actividad mayor o igual a 100 % y las menores de 100 % se tienen cinco moléculas que quedan entre las de actividad biológica con 100 % o mayor, cuando en realidad estas tienen menor actividad (Tabla 6). Para el otro caso, en el que se busca diferenciar entre las moléculas con 100 y 400 % de actividad a partir de la existencia de OH en C_5 y C_{14} se encontró que la clasificación original a partir de las funciones canónicas ubica a la podecdisona C junto a la 5β-oxi-ecdisona y en la validación cruzada mueve nuevamente a las dos moléculas hacia el otro bando. Adicionalmente, resulta interesante destacar que las moléculas que tienen 100 % de actividad biológica tienen en común los sustituyentes siguientes: OH en las posiciones C_3 , C_{14} , y C_{22} ; ceto en C_6 anillo B y sustituyentes en C_{24} . Mientras, la diferencia fundamental entre ellas son los diferentes sustitutos en C_{24} , por lo que, esto no es definitivo para promover un 100 % de actividad biológica en estos compuestos.

La continuación de esta investigación se auxilió del análisis químico-computacional para determinar algunos descriptores geométricos y cuánticos que permiten la realización de un análisis más riguroso y funcional desde el punto de vista químico-biológico. Con la presencia de los descriptores correspondientes, se llevó a cabo un análisis de discriminante que permitió la selección de las variables que más contribuyen a diferenciar la actividad biológica de los dos grandes grupos ya mencionados. De este modo, se encontró que las variables que determinan esta diferencia son:

Distancia O_3-O_{22} ; O_{22} -HOMO 3; áng. 2,3,4; áng. 8,9,10; distancia C_2 -

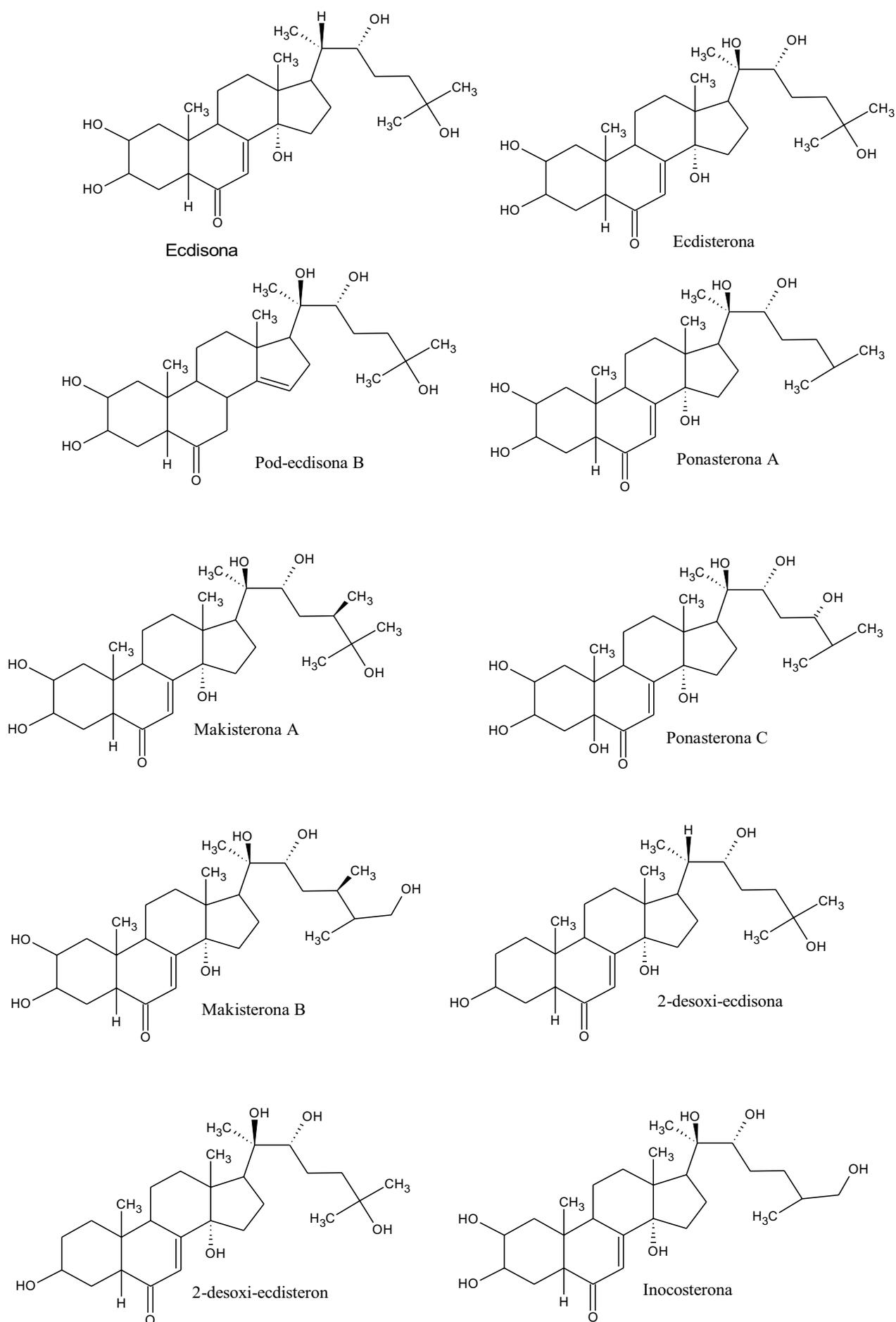


Fig. 2. Ecdiesteroides estudiados. (Continúa en la página siguiente.)

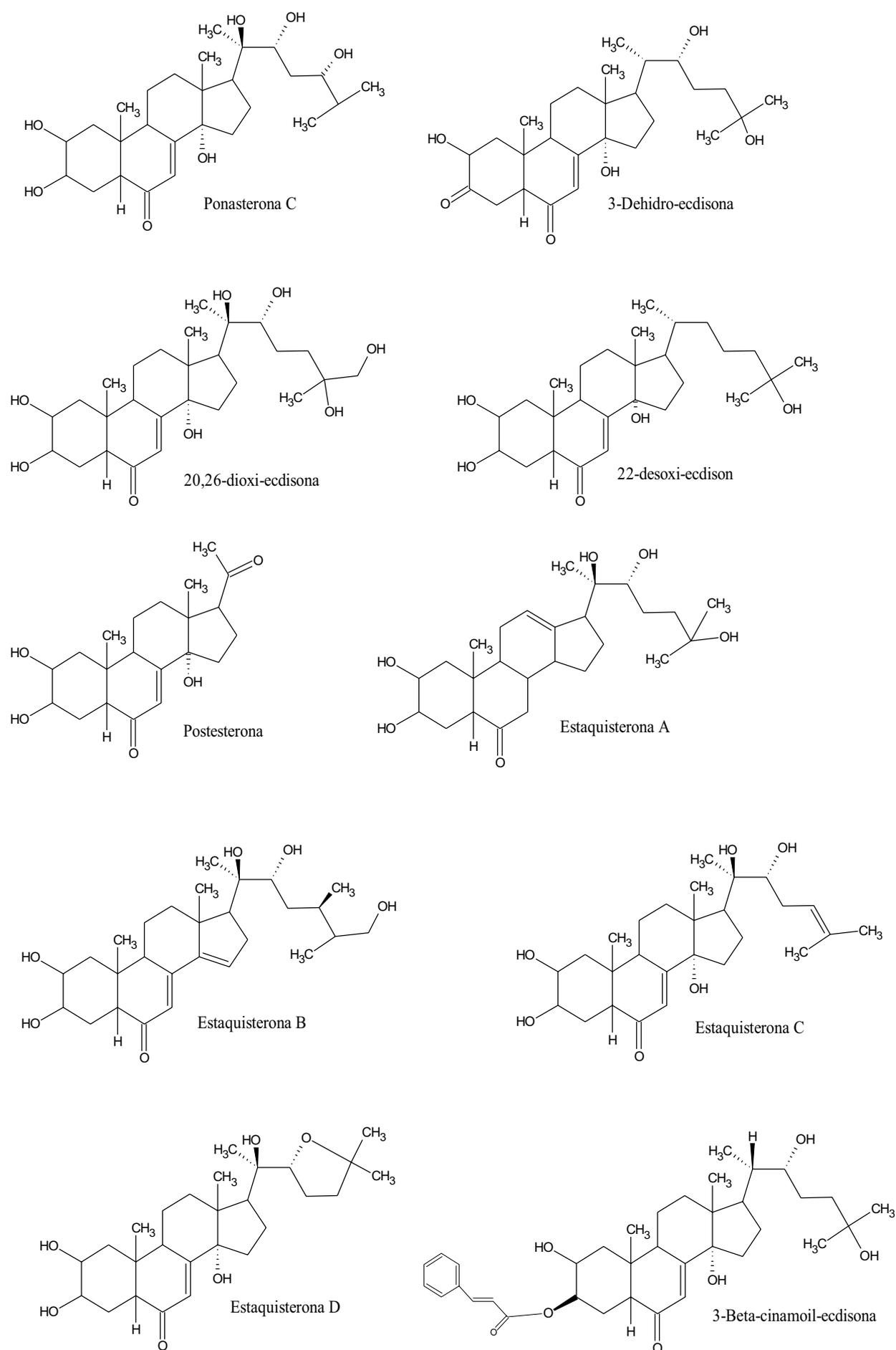
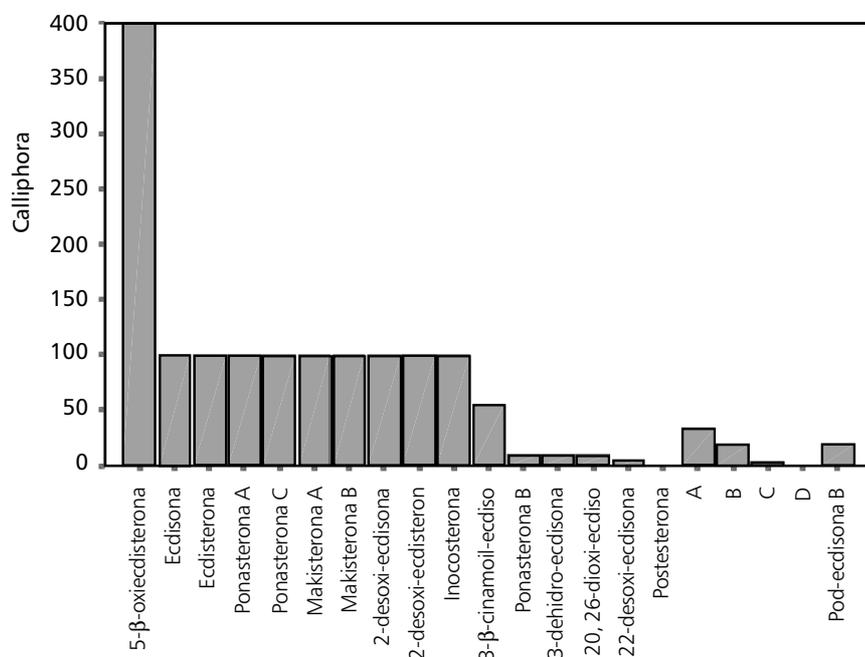


Fig. 2. Ecdiesteroides estudiados. (Continuación)

Tabla 1. Valores de las variables seleccionadas por los análisis estadísticos y otras de interés para los análisis correspondientes.

Comp.	Act. biol.	O ₂₂ en HOMO 3	(+) HOMO-3	O ₆ HOMO	Distancia O ₃ -O ₂₂	Distancia O ₃ -O ₆	HOMO-4	HOMO-3	HOMO	OH ₂₂	Distancia C ₂ -C ₃	Angulo C ₂ ,C ₃ ,C ₄	Angulo C ₈ ,C ₉ ,C ₁₀	q C ₁₆
1	400	sí	O3	sí	11,38450	4,99406	-11,06943	-10,7562	-10,4158	sí	1,554812	108,302611	113,78984	-0,0912
2	100	no	O3	sí	11,67870	4,94606	-11,02404	-10,9778	-10,2037	sí	1,551365	108,81674	114,36234	-0,0946
3	100	sí	O22	sí	11,40620	4,94258	-11,00003	-10,9804	-10,2465	sí	1,551433	108,831681	113,8535	-0,0909
4	100	sí	O3	sí	11,38490	4,99463	-11,09706	-10,778	-10,4378	sí	1,554828	108,305827	113,78529	-0,091
5	100	sí	O22	sí	11,37350	4,99436	-11,00339	-10,7903	-10,4201	sí	1,554814	108,303196	113,71121	-0,0913
6	100	sí	O22	sí	11,40630	4,94257	-10,99885	-10,9263	-10,2485	sí	1,551432	108,830742	113,85174	-0,0909
7	100	sí	O27	sí	11,40730	4,94273	-11,02635	-10,8874	-10,2906	sí	1,551431	108,833026	113,86155	-0,0906
8	100	sí	O3	sí	11,73770	4,98894	-11,08158	-11,0193	-10,2583	sí	1,53188	109,915584	114,30791	-0,0944
9	100	sí	O22	sí	11,39740	4,98794	-11,03107	-10,9685	-10,1985	sí	1,53188	109,915584	114,30791	-0,0944
10	100	sí	O27	sí	11,40610	4,94268	-10,99781	-10,9262	-10,2469	sí	1,551436	108,830187	113,85243	-0,0909
11	55	no	c4	no	11,39310	4,85835	-10,62731	-10,3538	-9,24151	sí	1,553201	109,152117	113,80864	-0,1039
12	10	sí	O2	sí	10,47730	5,71962	-11,03609	-10,9153	-10,1484	sí	1,551688	110,863617	113,95619	-0,0902
13	10	sí	O22	sí	11,57060	5,34070	-11,19595	-10,8573	-10,3349	sí	1,529722	112,801696	114,29352	-0,095
14	10	no	O27	sí	11,40680	4,94256	-11,01556	-10,8496	-10,2753	sí	1,551429	108,832592	113,85228	-0,0907
15	5	no	O2	sí		4,94332	-11,08158	-11,0193	-10,2583	no	1,551359	108,81521	114,34107	-0,0943
16	0	no	O2	sí	11,07860	4,94210	-11,33923	-11,1194	-10,4145	no	1,551364	108,827626	113,92818	-0,0866
A	33	no	c23	sí		4,98858	-11,1132	-11,0863	-10,232	no	1,531895	109,919209	114,28803	-0,0938
B	20	no	c23	sí		5,01201	-11,09946	-11,0758	-10,1958	no	1,529681	110,760412	114,31047	-0,0938
C	4	no	c23	sí		5,00877	-11,09423	-11,0723	-10,188	no	1,530075	110,653747	114,30718	-0,0937
D	0	no	c13	sí		4,87910	-11,14715	-11,1021	-10,237	no	1,530947	110,509226	114,31307	-0,0938
17	20	sí	O20	no	10,54970	4,98442	-10,98475	-10,6796	-8,9549	sí	1,55026	108,492074	121,30567	-0,0654

1) 5-β-oxi-ecdisterona. 2) Ecdisona. 3) Ecdisterona. 4) Ponasterona A. 5) Ponasterona C. 6) Makisterona A. 7) Makisterona B. 8) 2-Desoxi-ecdisona. 9) 2-Desoxi-ecdisterona. 10) Inocosterona. 11) 3-β-Cinamoil-ecdisterona. 12) Ponasterona B. 13) 3-Dehidro-ecdisona. 14) 20,26-Dioxi-ecdisona. 15) 22-Desoxi-ecdisona. 16) Postesterona. 17) Pod-ecdisona B. (+) Átomo de mayor contribución al orbital molecular HOMO-3. Carga: q_{C₁₆}


Fig. 3. Actividad biológica de diferentes ecdiesteroides y sus análogos en el bioensayo con *Calliphora*. Se muestra en el gráfico (de izquierda a derecha) la disminución de la actividad biológica de forma ordenada en función de las variaciones estructurales.

actividad biológica diferente a partir de la estructura base.

$$\begin{aligned}
 Y = & -15\,071,3 + 66,506 (O_{22} \text{ HOMO-3}) \\
 & - 10,166 (O_3 \text{ HOMO-3}) \\
 & + 34,278 (\text{distancia } O_3-O_{22}) \\
 & + 172,698 \text{ } 3 (\text{distancia } C_2-C_3) \\
 & - 24,306 (\text{áng. } C_2,3,4) + 127,276 \\
 & (\text{áng. } C_8,9,1) - 611,975 (q_{C_{16}})
 \end{aligned}$$

A partir de la solución de esta ecuación el valor medio para el Grupo 1 = 23,001 y para el Grupo 2 = -46,002. Si se hace un análisis de las variables seleccionadas sobre la molécula (Fig. 5) aparecen relaciones muy importantes, pues coinciden con puntos y regiones de muy marcado interés analítico a la hora de determinar la actividad biológica. Es importante precisar que mediante la ecuación que se logró en este caso, se agrupa correctamente el 100 % de los casos en la validación cruzada.

Los resultados permiten corroborar que para predecir actividad biológica a partir de la estructura molecular: algunos sustituyentes deben formar parte imprescindible de la estructura molecular; siempre que, la disposición espacial y parámetros orbitálicos de estos sean importantes y, adicionalmente, estos

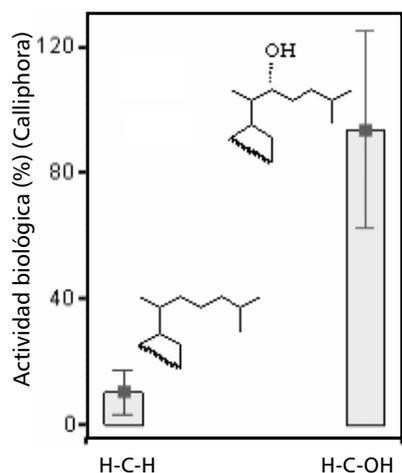
C₃; O₃ mayor contribuyente a HOMO-3; Carga de C₁₆ (Tabla 1).

Con estas variables se determina una función estadística (coefi-

ciente de correlación 0,99, 95 % confiabilidad) a partir de cuya resolución se diferencian significativamente los grupos de moléculas con

Tabla 2. Funciones discriminantes obtenidas en el análisis.

	Función	
	1	2
OH ₅ -OH ₁₄	3,942	-2,171
OH ₂₂	1,239	2,250
Constante	-6,442	-1,480


Fig. 4. Actividad biológica con el cambio de *a*-H por *α*-OH en C₂₂.

sustituyentes elegidos deben tener una contribución importante a las propiedades de la molécula como un todo. Este es el caso que se tiene en los ecdiesteroides con la contribución al orbital molecular HOMO-3 de los átomos O₃ y O₂₂. Cabría acotar que, debe existir una dependencia respecto al tipo de reacción que se lleve a cabo entre el receptor y el ligando en cuestión. Esta percepción ha sido previamente considerada y reportada en trabajos preliminares.¹⁵

DISCUSION

Para enfocar el trabajo con reacciones en sistemas biológicos, primero, se debe tener en cuenta que actividad biológica es sinónimo de un intervalo de reactividad cuantitativamente definido. La reactividad del compuesto no puede ser elevada (tóxico) ni baja (inactivo). O sea, la actividad biológica demanda una reactividad química y propiedades fisicoquímicas óptimas.

Si el comienzo del análisis se realiza por el concepto de ecdiesteroides que ofrece Lafont y Horn.⁶

“Ecdiesteroides son esteroides con un núcleo *cis*-fusionado en la junción de los anillos A-B, un cromóforo 7-en-6-ona y un 14 α -OH, independiente de su actividad en un ensayo de hormona de la muda.”

Tabla 3. Membresía predicha para cada grupo a partir de las funciones discriminantes creadas con las variables seleccionadas.

Tipo	Grupo	Membresía predicha			Total	
		1,00	2,00	3,00		
Original	Contado	1,00	1	0	0	1
		2,00	1	8	0	9
		3,00	0	5	6	11
	%	1,00	100	0,0	0,0	100,0
		2,00	11,1	88,9	0,0	100,0
		3,00	0,0	45,5	54,5	100,0
Validación cruzada	Contado	1,00	0	1	0	1
		2,00	0	8	1	9
		3,00	0	5	6	11
	%	1,00	0,0	100,0	0,0	100,0
		2,00	0,0	88,9	11,1	100,0
		3,00	0,0	45,5	54,5	100,0

La validación cruzada fue hecha solo para los casos que están en el análisis. En ella, cada caso fue clasificado por la función derivada a partir de todos los casos. El 71,4 % de los originalmente agrupados fue correctamente clasificado. El 66,7 % de ellos fue clasificado correctamente en la validación cruzada.

Tabla 4. Análisis de la actividad biológica de los compuestos con o sin OH en C₂₂, en el cual, se demostró mediante la prueba-*t* que existían diferencias significativas ($t = 0,045$ 17**).

Calliphora	N	Media	DE	EE	Intervalo de confianza		Mín.	Máx.
					Menor	Mayor		
No (OH en C ₂₂)	6	10,33	13,34	5,44	-3,66	24,33	0	33
Sí (OH en C ₂₂)	15	93,67	93,40	24,12	41,94	145,39	10	400

DE Desviación estándar. EE Error estándar.

Tabla 5. Predicción a partir de la función encontrada con el OH en C₂₂.

	Grupo	Membresía predicha		Total	
		1,00	2,00		
Original	Numérico	≥ 100	10	0	10
		< 100	5	6	11
	%	≥ 100	100,0	0,0	100,0
		< 100	45,5	54,5	100,0
Validación cruzada	Numérico	≥ 100	10	0	10
		< 100	5	6	11
	%	≥ 100	100,0	0,0	100,0
		< 100	45,5	54,5	100,0

El 76,2 % fue clasificado correctamente en la validación cruzada.

Los compuestos relacionados de tipo ecdiesteroides no cumplen todos con el criterio anterior; cualquiera de ellos carece de 14 α -OH o de 7-en o presentan un doble enlace adicional en 4- ó 14-eno.

Si se toma como referencia el trabajo de Koollman⁴ para el análisis de los puntos clave de las moléculas de ecdiesteroides, en el esque-

ma ofrecido se verá que una de las regiones importantes para la actividad biológica es la cadena lateral. Sin embargo, según los resultados, de este trabajo, no toda la cadena lateral es importante, sino, la presencia del OH₂₂ que resulta el punto determinante en la actividad biológica.

¿Quiere esto decir que los demás grupos funcionales no son impor-

Tabla 6. Predicción a partir de la función encontrada con OH en C_3 y C_{14} .

	Grupo	Grupo	Membresía predicha		Total
			1,00	2,00	
Original	Numérico	> 100	1	0	1
		= 100	1	8	9
	%	> 100	100,0	0,0	100,0
		= 100	11,1	88,9	100,0
Validación cruzada	Numérico	> 100	0	1	1
		= 100	0	9	9
	%	> 100	0,0	100,0	100,0
		= 100	0,0	100,0	100,0

tantes? No, pues si se tienen moléculas formadas por grupos funcionales, es importante comprender que la presencia de un grupo en particular no es garantía de respuesta positiva frente a un bioensayo específico. Solo es condición necesaria, pero no suficiente y la actividad biológica tiene que ser considerada función de la molécula como un todo. Se conoce que en los compuestos biológicamente activos los grupos OH, alquil o halogenuros se dividen en dos categorías, dependiendo de, si el grupo confiere propiedades moduladoras en virtud de sus efectos sobre las propiedades físicas o si este experimenta una reacción química significativa.¹⁶ Por tanto, debe ser sobre el grupo OH_{22} que se lleve a cabo una reacción específica o sea, el primer, o único punto de

unión al receptor, mientras que los demás grupos de la cadena lateral, en lo fundamental, confieren modulaciones sobre las propiedades físico-químicas de la molécula de ecdiesteroides.

Se coincide con Brosa¹⁷ en que los átomos de O son importantes, pero desde el punto de vista espacial, no todos, sino solo algunos. La explicación podría estar en que, es innecesaria una orientación espacial de todos los átomos oxígenos para llevar a cabo una reacción con la enzima-receptor. El ligando, en caso de una molécula plana de esteroide, no necesitará, termodinámicamente, más de dos uniones con el receptor para que la célula no gaste energía innecesaria en enlaces, entonces, no debe ser imprescindible una restricción conforma-

cional más estricta que la propia planaridad ya existente. Si los grupos hidroxilo (OH) entran, definitivamente, a representar un papel sobre propiedades de la estructura electrónica de las moléculas,¹⁸ entonces, no se debe reducir la influencia de estos átomos a simple disposición espacial. Una vez unida la molécula por la posición O_{22} será necesaria una restricción de distancia respecto a ese punto, que puede ser la posición O_3 , puntos que están involucrados en un mismo orbital molecular.

El caso que se analiza son moléculas polihidroxiladas que presentan una elevada capacidad de unión con otras moléculas por enlaces de tipo puente de hidrógeno. Tales uniones están dadas por las orientaciones estereoquímicas de los grupos OH correspondientes, lo cual, determina propiedades tales como la afinidad a una enzima específica.¹⁵ Si se tienen en cuenta estas condicionales, entonces, los análisis de las variables geométricas de las moléculas aclaran el camino hacia la comprensión de los puntos o regiones que determinan la actividad. El hecho de que entre los elementos más importantes que diferencian las moléculas activas de las no activas se encuentre la distancia entre los grupos OH_3 y O_6 evidencia una relación funcional muy importante, si se le suma que es importante también la distancia OH_3

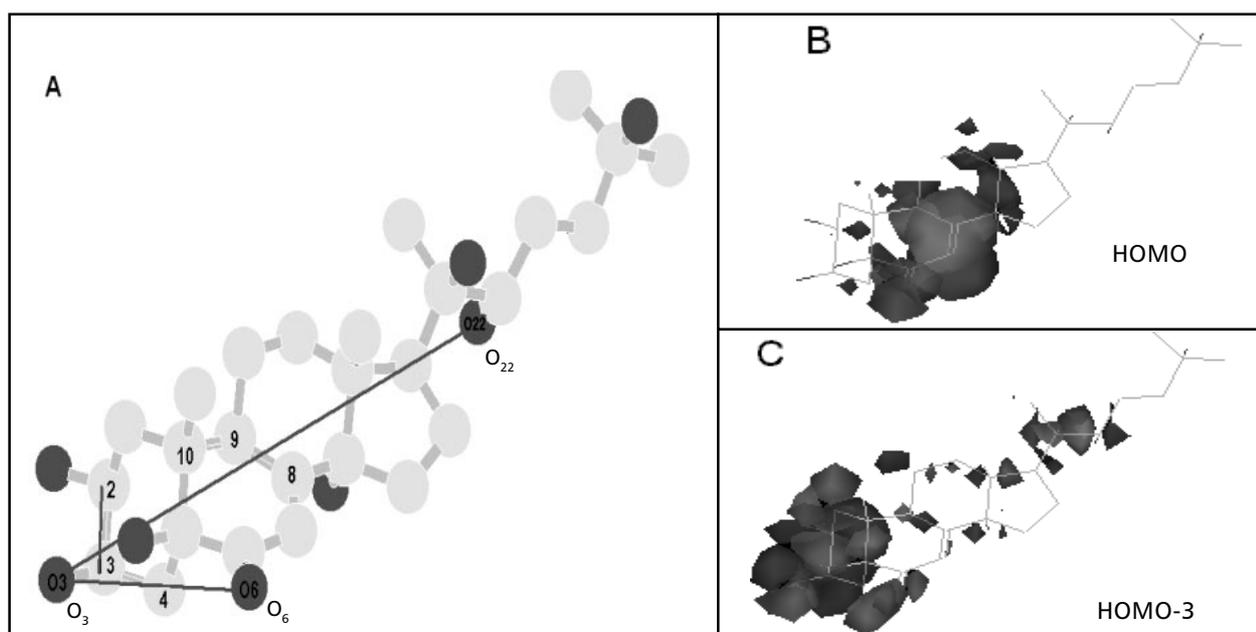


Fig. 4. Representación de las variables geométricas y cuánticas que más contribuyen a diferenciar las moléculas de ecdiesteroides más activas y menos activas. **A** Muestra las distancias interatómicas más importantes (mediante líneas), los ángulos (mediante triadas de átomos enumerados unidos por líneas), los átomos O_3 y O_{22} por su contribución al orbital HOMO-3 y el O_6 por su mayor contribución al HOMO. **B** Representación espacial del orbital molecular HOMO. **C** Representación espacial del orbital molecular HOMO-3. (Los átomos en rojo son oxígenos y los amarillos son carbonos).

OH₂₂, relación que no queda clara en el modelo de los sitios de interacción de ecdiesteroides con su receptor hormonal propuesto por Koolman,⁴ en el cual, se margina la región del anillo-B como punto importante dando mayor peso al grupo OH₁₄, el cual, no deja de ser significativo, pues cuando se une a la molécula un OH₅ se convierte en la razón, estadísticamente significativa, de dar una actividad de 400 %, además en los cardenólidos, junto a C₂₁ o C₂₂, aparece como importante en su interacción con la Na⁺,K⁺-ATPasa con coeficientes de correlación mayores que r = 0,950¹⁹ (Fig. 6).

Todo lo expresado confirma, una vez más, la conexión entre las propiedades de una molécula y su estructura electrónica. En los sistemas biológicos estos análisis son de vital importancia, pues desde hace algunos años, se demostró que los simples campos coulómicos no representan totalmente las características electrónicas de las moléculas. En tales casos, las características tridimensionales (ej.: tamaño y localización sobre, o alrededor de una molécula) del campo de orbitales moleculares tiene un probado uso como descriptor.²⁰ Teniendo como premisa la importancia de los orbitales moleculares entonces, no es alarmante que la región de los anillos A y B (Fig. 5, B y C y Fig. 6) sea de vital importancia en el desencadenamiento de la actividad biológica, pues sobre ellos se localizan los orbitales HOMO, LUMO (no graficado) y HOMO-3. Se reconoce que la contribución e influencia del HOMO en la interacción receptor-ligando es un indicador de interacciones con el bolsillo hidrofóbico del receptor,²¹ que permite considerar y extender a otra serie de derivados esteroidales (ecdiesteroides) la relación "Cadena Lateral que liga-Anillo-A,B que actúa" (*Side Chain binding-A,B-ring acting*), descrita por otros autores para diferentes tipos de esteroides.²²

CONCLUSIONES

Se determinaron, cuantitativamente, los puntos claves de la molécula de ecdisona y 21 derivados naturales, que contribuyen estructuralmente a las interacciones con el receptor y desencadenan la acción ecdiesteroides, a partir de la relación estructura-actividad y del análisis de propiedades electrónicas. Corroborando las previamente relaciones SAR empíricamente descritas, en la región de la cadena la-

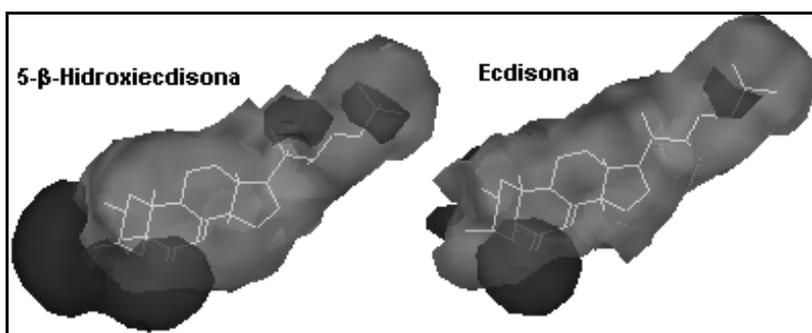


Fig. 5. Sobreposición de estructuras de ecdiesteroides activos. Zonas estructurales (OH) de gran significación en la actividad biológica.

teral, el punto determinante es el OH₂₂, mientras la región de los anillos A y B (ángulos de enlace C₈-C₉-C₁₀; distancia C₂-C₃ y contribución de O₃ al HOMO-3) determina la potencial actividad biológica. La ecuación propuesta constituye una herramienta matemático-estadística aproximada y preliminar que permite discriminar las moléculas de ecdiesteroides más activas de las menos activas, en aras de generar una filosofía sintética de análogos potencialmente utilizables en el control de especies de insectos perjudiciales con percepción ecológicamente sostenible.

BIBLIOGRAFIA

1. Clegg P.C. Introduction to mechanism of hormone action. Ed. Heimann, London, 1969.
2. Alberts B., Bray D., Lawis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. D. Molecular biology of the cell. , Third edition, Ed. Garland Publishing, Inc. New York, 1994.
3. Lewin B. Genes VII. Ed. Oxford University Press, New York, 380, 2000.
4. Koolman J. Ecdysteroids. **Zoological Science**, **7**, 563-580, 1990.
5. Suksamrarn A. *et al.* Chemical Modifications at 22-hydroxyl group of ecdysteroids. **Insect. Biochem. & Mol. Biology**, **32**, 193-197, 2002.
6. Lanfont R. and Horn D.H.S. en Ecdysone. Ed. J. Colman, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 39-64, 1989.
7. Cherbas L *et al.*, The morphological response of Ke-cells to ecdysteroids : hormonal specificity. **Wilhelm Roux's Archives Developmental Biol.**, **189**, 1-15, 1980.
8. Cymborowski B. Bioassays for ecdysteroids in Koolman Ed. Ecdysone, from chemistry to mode of action. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 144-149, 1989.
9. Dinan L. Ecdysteroid structure and hormonal activity. In Koolman Ed. Ecdysone, from chemistry to mode of action. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 345-354, 1989.
10. Slama K, *et al.* Hormonal activity of ecdysteroids from certain asiatic plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **23**, 181-185, 1993.
11. Harmatha J., Dinan L. Biological activity of natural and synthetic ecdysteroids

in the B_{II} bioassay. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, **35**, 219-225, 1997.

12. Dinan L., *et al.* An extensive ecdysteroid CoMFA. **J. Comp. Aided Mol. Design.**, **13**, 185-207, 1999.
13. Dinan L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochem.**, **57**, 325-339, 2001.
14. Bursi R. & Groen M. Application of quantitative structure-activity relationships to progestagens: from serendipity to structure-based design. **Eur. J. Med. Chem.**, **35**, 787-796, 2000.
15. Santagati M., *et al.* in Gundertofte & Jorgensen Eds. Molecular Modelling and Prediction of Bioactivity. Kluwer Academic-Plenum Press, New York, 443-475, 2000.
16. Sexton W. A. Chemical constitutions and biological activity. Ed. E & F. N. Spon LTD. London, 517, 1963.
17. Brosa C., Capdevila J. M. and Zamora I. Brassinosteroids: A new way to define the structural requirements. **Tetrahedron**, **52**, 2435-2448, 1996.
18. Kubli-Garfias C., Mendieta J. and Vasquez R. Semi empirical assessment of changes on the electronic structure of androstene with addition of carboxyl and hydroxyl groups. **Theochem.**, **388**, 35-41, 1996.
19. Bohl M. Theoretical investigations on steroids structure and quantitative structure-activity relationships. In Molecular Structure and Biological Activity of Steroids. Ed., Bohl M.; Duax. Oxford Press, NY, USA, 1, 1992.
20. Oprea T. I. and Waler Ch. L. Theoretical and practical aspects of three-dimensional quantitative structure-activity relationships. *Review in Computational Chemistry*. 11: Chapter 3, Ed. John Willey and Sons., New York, 1997.
21. Smeyers I.G., Bouniam L., Smeyers N.J., Ezzamarty A., Hernández-Laguna A. and Sainz-Diaz C.I. Quantum mechanical and QSAR study of some a-arylpropionic acids as anti-inflammatory agents. **Eur. J. Med. Chem.**, **33**, 103-112, 1998.
22. Zaldo A., Tacoronte Morales J.E., Coll Manchado F., Aguilera L. y Cabrera M.T. Ecdysteroid analogs based on steroidal sapogenins I. Synthesis of bromoderivatives from diosgenina. Preliminary study of their biological activity. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **33**, 19-23, 2002.