



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**Departamento de Química**

**“SÍNTESIS DE ANÁLOGOS FOSFORADOS DE LA VITAMINA D<sub>3</sub> Y  
ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL”**

Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Química de la Universidad Nacional del Sur.

*Lic. Silvina Mariela Grioli*

**Director: Dr. Cristian Alejandro Vitale**

**Co-Directora: Dra. María Marta Facchinetti**

**INQUISUR-UNS-CONICET**

**Bahía Blanca**

**Argentina**

**2022**

## **PREFACIO**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Química de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en un Laboratorio de Química Orgánica del Instituto de Química del Sur (INQUISUR) y en el Laboratorio de Biología del Cáncer del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), integrantes del centro Científico y Tecnológico Bahía Blanca (CONICET-UNS) durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2012 al 31 de Marzo de 2017, bajo la dirección del Dr. Cristian Alejandro Vitale y la co-dirección de la Dra. María Marta Facchinetti.

El presente trabajo de tesis fue financiado con subsidios otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2010-0669, PICT 2012-0966, PICT 2016-4454), y por la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Sur (PGI 24/B221, PGI 24/Q072).

|   |  |
|---|--|
|  | <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR</b><br/><b>Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</b></p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el .../.../..... , mercedo la calificación de .....(.....)</p> |
|---|--|

# AGRADECIMIENTOS

Al CONICET por financiar mis estudios de posgrado y a la UNS por brindarme la posibilidad de estudiar una carrera de grado y posgrado de excelencia académica y de manera gratuita.

Al INQUISUR y al INIBIBB por el soporte institucional, y a todo su personal de apoyo y administrativo que facilitan la tarea diaria.

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. Cristian Alejandro Vitale y a mi codirectora, la Dra. María Marta Facchinetti, por haberme brindado un lugar en su laboratorio, por su capacidad y experiencia científica.

A mis compañeros de laboratorios vecinos, Cin, Chuli, Mary, Brune, Tavo, Ana, Sil, Ale, Tania, Vivi, por las charlas, la buena onda y el apoyo.

A mis compañeros de laboratorio, Mary, Santi, Eva, Meli, Eli, Euge, Juli, Jose, Ariel, Fabi, Yani y Diego, por su apoyo y compañía, por las charlas, los mates, las risas, la solidaridad constante y el trabajo en equipo.

A mis amigos de la vida, Debo, Fer, Glen, Maju, Sol, Sabri, Na, Gise, Romi, Lore, Bel, Naty, Dani, por bancarme siempre en las buenas y las malas, por sus palabras de aliento y por ser un gran apoyo para mí.

A los increíbles amigos que me dio esta carrera, por compartir la misma pasión por la ciencia. Por esos momentos compartidos, los triunfos y fracasos, las risas y lagrimones, pero por sobre todo de apoyo incondicional.

A Olguita, por sus lindas charlas, acompañamiento y cariño siempre.

A Santi y Eva porque sin ellos esto no hubiese sido posible, por ser unos excelentes compañeros de equipo, por su cariño y apoyo.

A toda mi familia, y muy especialmente a mi papá Omar y a mi mamá Delia, por compartir este sueño conmigo, por su amor y apoyo incondicional, y por sus grandes enseñanzas de vida.

A mis hermanos, mi cuñado, mis cuñadas y mis sobrinitos, por su amor, paciencia y saber que siempre puedo contar con ellos.

Agradezco a esta gran familia que amo, por estar siempre conmigo en cada momento de felicidad y aquellos un poco difíciles de este largo camino, y por alentarme siempre a seguir adelante y ser mejor persona.

Muchas gracias!

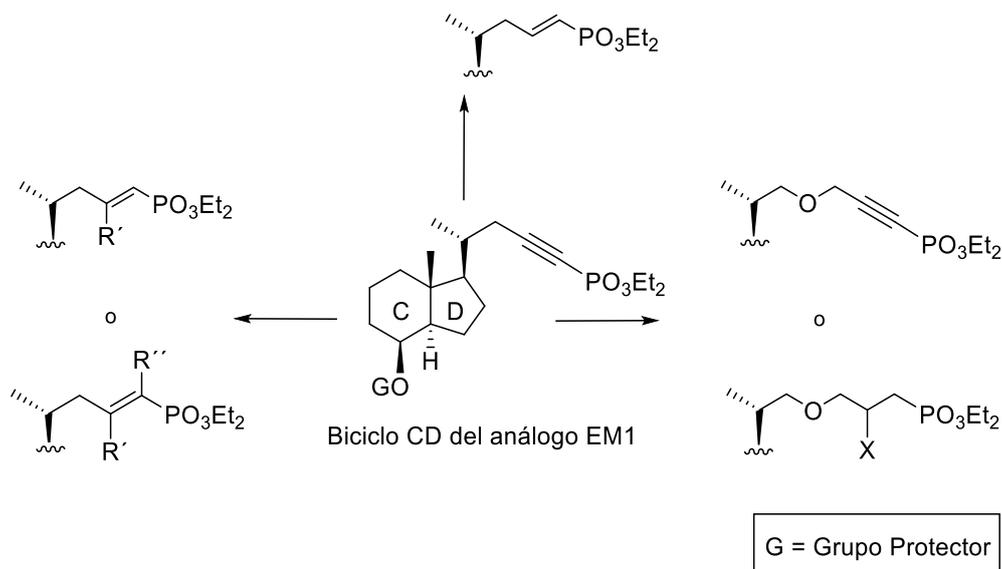
## RESUMEN

A pesar de los grandes avances logrados en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades oncológicas, la supervivencia de los pacientes se ha alargado mínimamente en algunos tipos de cáncer. Por ello, resulta fundamental profundizar la búsqueda y desarrollo de terapias novedosas evaluando nuevos blancos moleculares y nuevos agentes quimioterapéuticos.

La forma hormonalmente activa de la vitamina D<sub>3</sub>, el 1 $\alpha$ , 25-dihidroxiVitamina D<sub>3</sub> o calcitriol, tiene efectos antitumorales en varios tipos de cáncer pero presenta hipercalcemia como efecto secundario, lo que dificulta la administración de la dosis necesaria para inducir una respuesta antitumoral. Es por ello, que se busca diseñar racionalmente análogos del calcitriol que posean mayores o iguales efectos antitumorales, pero que carezcan de la actividad hipercalcemiante. En este sentido, análogos de la vitamina D que poseen un grupo fosfonato en su cadena lateral han mostrado tener baja actividad calcémica. Teniendo en cuenta estos antecedentes, previamente a este trabajo de Tesis Doctoral, se diseñó y sintetizó un análogo del calcitriol denominado EM1, que contiene un grupo alquilfosfonato en su cadena lateral. Este análogo demostró poseer potentes efectos antitumorales *in vitro* en diferentes líneas celulares cancerosas e *in vivo* en modelos animales de cáncer, y carecer de actividad hipercalcemiante en ratones, demostrando que es un buen candidato para el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Por lo tanto, en base a la evidencia previa sobre los potentes efectos antitumorales del análogo sintético EM1; en este trabajo de Tesis Doctoral, nos propusimos sintetizar nuevos análogos fosforados de la vitamina D<sub>3</sub>, introduciendo modificaciones en la cadena lateral del análogo EM1 a partir de reducciones parciales, síntesis de oxanálogos, así como también síntesis de vinilfosfonatos vía química de cupratos y/o complejos de titanio, adición con pentacloruro de fósforo o clorofosfato de dietilo; y síntesis de bisfosfonatos.

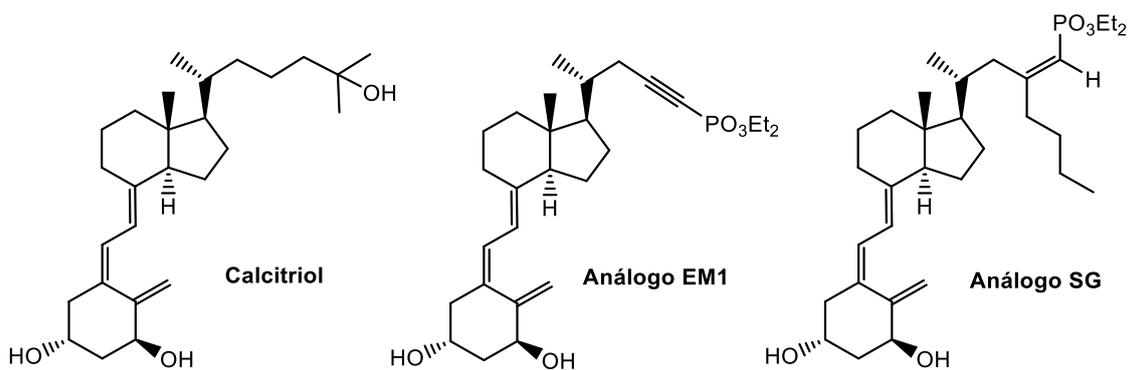
Las distintas alternativas fueron ensayadas en primera instancia con sustratos modelos, con el objeto de optimizar las condiciones de reacción para luego trabajar sobre el biciclo CD del análogo EM1. En cuanto a la estrategia de reducción, con sustratos modelos se logró controlar la reducción parcial del alquilfosfonato, sin embargo, cuando dichas condiciones se emplearon con el biciclo CD, no se pudo controlar el grado de avance de la misma, conduciendo a la obtención del producto de reducción total del triple enlace. Además, una alternativa que se evaluó para sintetizar

vinilfosfonatos, es la adición de complejos de titanio sobre alqunilfosfonatos pero lamentablemente, los resultados no fueron los esperados. Otra opción contemplada dentro del plan de trabajo, fue la adición de cupratos sobre alqunilfosfonatos. De este modo, obtuvimos vinilfosfonatos di y trisustituídos con rendimientos buenos y moderados en sustratos modelos y biciclo CD del análogo EM1.



En la presente Tesis Doctoral se describe la síntesis, caracterización, evaluación biológica y computacional de un nuevo análogo del calcitriol denominado SG, el cual es un derivado del EM1. Este análogo se sintetizó a partir de la química de cupratos, y presenta un grupo vinilfosfonato disustituído en su cadena lateral. Por otra parte, se describen los métodos elegidos para la preparación de los precursores del análogo SG, como son, la síntesis del biciclo CD a partir del diol de Inhoffen y el óxido de fosfina portador del anillo A. La construcción del sistema triénico, se realizó mediante la reacción de Wittig-Horner, a través del acoplamiento entre la cetona de Grundmann con la cadena lateral modificada y el anión del óxido de fosfina. Este método permite construir el sistema triénico de manera eficiente, estereoselectiva y en condiciones suaves en las últimas etapas de síntesis. Posteriormente, se evaluó la actividad calcemiente y acción antitumoral del análogo SG, comparando sus efectos con los ejercidos por el calcitriol y el análogo EM1, con el fin de realizar estudios estructural-actividad. Pudimos demostrar que SG no presenta efectos hipercalcemiantes *in vivo* en ratones, resultados similares al análogo sintético EM1, aunque sus efectos biológicos sobre diferentes líneas tumorales *in vitro* fueron escasos. Por último, realizamos los

estudios *in silico* de modelado y dinámica computacional para poder comprender los efectos biológicos diferenciales entre ambos análogos, y pudimos evidenciar que debido a la modificación estructural en la cadena lateral entre el vinilfosfonato SG y el alquinilfosfonato EM1, hay una considerable variación en la energía de unión específica con el receptor de vitamina D (VDR), debido a una interacción diferencial, que se refleja en los cambios observados en los efectos antitumorales. De este modo, podemos concluir que el análogo SG tiene menor afinidad al VDR, lo cual sugiere que es un mal ligando y modulador en comparación con el análogo EM1.



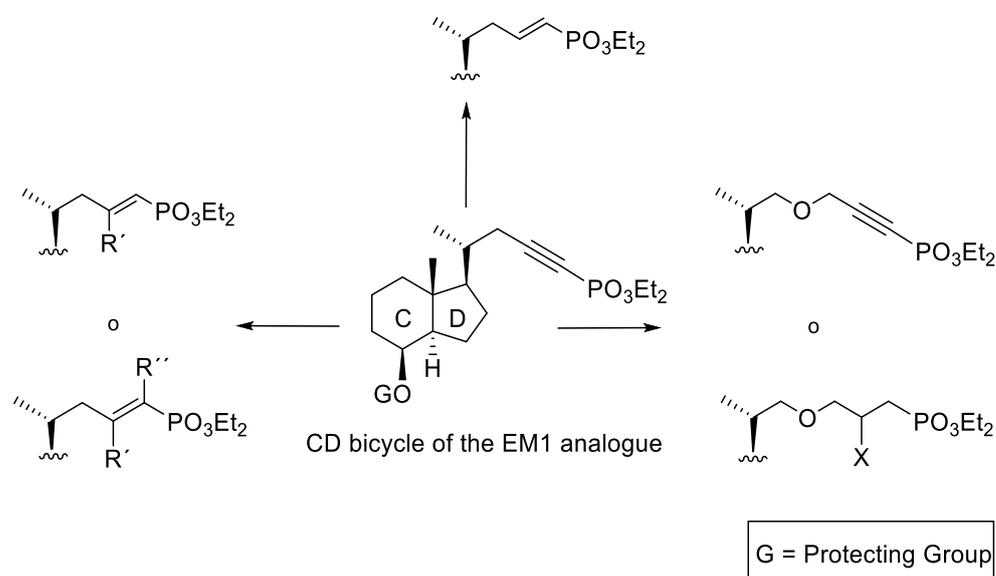
## ABSTRACT

Despite of the great advances made in the diagnosis and treatment of oncological diseases, patient outcome has improved minimally in some types of cancer. Therefore, it is essential to deepen the search and development of novel therapies by evaluating new molecular targets and new chemotherapeutic agents.

The hormonally active form of vitamin D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyVitamin D<sub>3</sub> or calcitriol, has antitumor effects in several types of cancer but displays hypercalcemia as secondary effect, making it difficult to administer the necessary dose to induce an antitumor response. For this reason, the aim is to rationally design calcitriol analogues that display greater or equal antitumor effects, but lack hypercalcemic activity. In this regard, vitamin D analogues that have a phosphonate group in their side chain have been shown to have low calcemic activity. Taking into account these antecedents, before this Doctoral Thesis work, a calcitriol analogue called EM1 was designed and synthesized, which contains an alkynylphosphonate group in its side chain. This analogue was shown to have potent antitumor effects *in vitro* in different cancer cell lines and *in vivo* in animal models assays, and to lack *in vivo* hypercalcemic activity in mice, showing that it is a good candidate for the treatment of some types of cancer. Therefore, based on previous evidence on the potent antitumor effects of the synthetic EM1 analogue; this doctoral thesis work, we set out to synthesize new phosphorous analogues of vitamin D<sub>3</sub>, introducing modifications in the side chain of the EM1 analogue from partial reductions, synthesis of oxanalogues, as well as synthesis of vinylphosphonates via chemical cuprates and/or titanium complexes, added with phosphorous pentachloride or diethyl chlorophosphate; and synthesis of bisphosphonates.

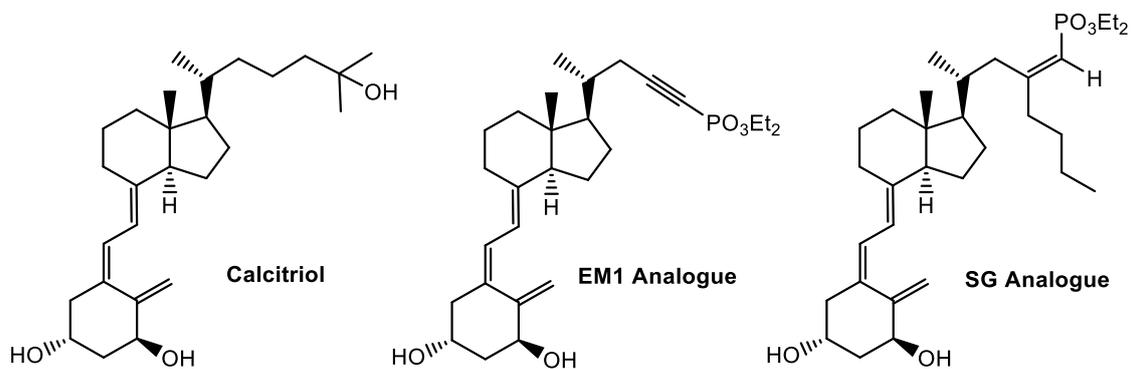
The different alternatives were first tested with model substrates, in order to optimize the conditions of reaction and then work on the CD bicycle of the EM1 analogue. Regarding the reduction strategy, with models substrates it was possible to control the partial reduction of the alkynylphosphonate, however, when these conditions were used with the CD bicycle, the degree of advancement of the same could not be controlled, leading to obtaining the product of total reduction of the triple bond. In addition, an alternative that was evaluated to synthesize vinylphosphonates is the addition of titanium complexes on alkynylphosphonates, but unfortunately, the results were not as expected. Another option contemplated within the work plan was the addition of cuprates over alkynylphosphonates. In this way, we obtained di and trisubstituted

vinylphosphonates with good and moderate yields on model substrates and CD bicycle of the EM1 analogue.



This doctoral thesis describes the synthesis, characterization, biological and computational evaluation of a new calcitriol analogue called SG, which is a derivative of EM1. This analogue was synthesized from cuprate chemistry, and has a disubstituted vinylphosphonate group on its side chain. On the other hand, the methods chosen for the preparation of the SG analogue precursors are described, such as the synthesis of the CD bicycle from the diol Inhoffen and the phosphine oxide carrying ring A. The construction of the trienic system is performed by the Wittig-Horner reaction, through the coupling between Grundmann's ketone with the modified side chain and the phosphine oxide anion. This method allows to build the triene system efficiently, stereoselectively and under mild conditions in the last stages of synthesis. Subsequently, the calcemic activity and antitumor action of the SG analogue was evaluated, comparing its effects with those exerted by calcitriol and the EM1 analogue, in order to carry out structure-activity studies. We were able to show that SG does not have hypercalcemic effects *in vivo* in mice, similar results to the synthetic EM1 analogue, although its biological effects on different tumor lines *in vitro* were scarce. Finally, we carried out *in silico* modeling and computational dynamics studies in order to understand the differential biological effects between both analogues, and we were able to show that due to the structural modification in the side chain between vinylphosphonate SG and

alkynylphosphonate EM1, there is considerable variation in the specific binding energy with the vitamin D receptor (VDR), due to a differential interaction, which is reflected in the changes observed in the antitumor effects. Thus, we can conclude that the SG analogue has a lower affinity to VDR, which suggests that it is not a good ligand and modulator compared to the EM1 analogue.



## ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$ : Microlitro

$^{13}\text{C}$ -RMN: Resonancia magnética nuclear de carbono 13

$^1\text{H}$ -RMN: Resonancia magnética nuclear de protón

$^{31}\text{P}$ -RMN: Resonancia magnética nuclear de fósforo 31

AcOEt: Acetato de etilo

AcOH: Ácido acético

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de la varianza

Ar: Arilo

Arg: Arginina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

AUC: Área debajo de la curva

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

Bcl-X<sub>L</sub>: B-cell lymphoma extra large

Bu: Butilo

c: Cuadruplete

Ca<sup>2+</sup>: Calcio

CaSR: Receptor sensible al calcio

CBr<sub>4</sub>: Tetrabromuro de carbono

CDKs: Quinasas dependientes de ciclinas

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: Diclorometano

CH<sub>3</sub>CN: Acetonitrilo

CH<sub>3</sub>COOH: Ácido acético

CKIs: Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas

CIPO(OEt)<sub>2</sub>: Clorofosfato de dietilo

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

CoA: Coactivadores

CoR: Corepresores

CuCl: Cloruro de cobre

CuI: Yoduro de cobre

CYP24A1: Enzima 24-hidroxilasa

CYP27B1: Enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa

CYP2R1: Enzima 25-hidroxilasa

d: Doblete

DBD: Dominio de unión al ADN

DBP: Proteína transportadora de vitamina D

dd: Doble doblete

DIBAL-H: Hidruro de diisobutilaluminio

DM: Dinámica Molecular

DMEM: Dolbecco's Modified Eagle Medium

DMF: N,N-Dimetilformamida  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
EDTA: Etilen-diaminetra-ácido acético  
EGF: Factor de crecimiento epidérmico  
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico  
eq.: Equivalentes  
Et<sub>2</sub>O: Dietil éter  
FGF-23: Factor de crecimiento fibroblástico 23  
Fs: Femtosegundo  
g: Gramos  
GL26: Línea celular de glioblastoma murino  
h: Horas  
H12: Hélice 12  
H<sub>2</sub>: Hidrógeno  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Agua oxigenada  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido sulfúrico  
HCT116: Línea celular de carcinoma colorrectal humano  
HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2  
Hex: Hexano  
HF: Ácido fluorhídrico  
His: Histidina  
HN12: Línea celular de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello humana  
HPLC: Cromatografía líquida de alta performance  
HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución  
Hz: Hertzio  
IARC: Agencia internacional de investigación en cáncer  
IC<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50  
i-PrOH: Isopropanol  
J: Constante de acoplamiento en Hz  
KCl: Cloruro de potasio  
kDA: Kilodalton  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato de potasio monobásico  
LBD: Dominio de unión al ligando  
LDA: Diisopropilamido de litio  
LM3: Línea celular de adenocarcinoma mamario murino  
L<sub>máx</sub>: Longitud de onda máxima  
M: Molar  
m: Multiplete  
MeOH: Metanol  
MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de magnesio  
min: Minutos  
mL: Mililitro  
mmHg: Milímetros de mercurio  
mmol: Milimol

N<sub>2</sub>: Nitrógeno  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Sodio fosfato dibásico  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfato de sodio  
NaCl: Cloruro de sodio  
NaH: Hidruro de sodio  
NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonato de sodio  
n-BuLi: n-Butil litio  
nm: Nanómetros  
NOE: Efecto Nuclear Overhauser  
Ns: Nanosegundos  
OH: Grupo hidroxilo  
PBS: Buffer fosfato salino  
PDB: *Protein DataBank*  
PDC: Dicromato de piridinio  
PGs: Prostaglandinas  
Pi: Piridina  
PKA: Proteína quinasa A  
PKC: Proteína quinasa C  
PPh<sub>3</sub>: Trifenilfosfina  
ppm: Partes por millón  
PPTS: p-toluensulfonato de piridinio  
PSA: Antígeno prostático específico  
PTH: Hormona paratiroidea  
p-TsCl: Cloruro de p-toluensulfonilo  
RAP: Proteína asociada al receptor  
Rf: Factor de retención  
RMSF: *Root Mean Square Fluctuation*  
Rpm: Revoluciones por minuto  
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*  
Rto.: Rendimiento  
RXR: Receptor del ácido 9-cis-retinoico  
s: Singulete  
Seg: Segundos  
Ser: Serina  
SFB: suero fetal bovino  
t.a.: Temperatura ambiente  
t: Tiempo  
t: Triplete  
T98G: Línea celular deglioblastoma multiforme humano  
TBAF: Fluoruro de tetrabutilamonio  
TBS: Tris bufer salino  
TESCl: Cloruro de trietilsililo  
THF: Tetrahidrofurano  
TLC: Cromatografía en capa fina

TMS: Trimetilsilano

Tris: Tris (hidroximetil) amino metano

TSP-1: Trombospondina-1

Tyr: Tyrosina

U251: Línea celular de glioblastoma astrocitoma humano

UV: Ultravioleta

V: Vehículo

VDR: Receptor nuclear de la vitamina D

VDRE: Elementos de respuesta específicos para el VDR

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

Vs: *Versus*

$\delta$ : Desplazamiento químico en ppm

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| AGRADECIMIENTOS .....   | 3  |
| RESUMEN.....  | 5  |
| ABSTRACT.....   | 8  |
| ABREVIATURAS .....  | 11 |
| ÍNDICE .....  | 15 |
| INTRODUCCIÓN .....  | 20 |
| 1-Vitamina D.....   | 21 |
| 1.1- Historia de la vitamina D .....  | 21 |
| 1.2- Estructuras químicas y nomenclatura de las vitaminas D.....                      | 23 |
| 1.3- Metabolismo de la vitamina D.....  | 26 |
| 1.4- Regulación del metabolismo de la vitamina D <sub>3</sub> .....                   | 30 |
| 1.5- Transporte de la vitamina D <sub>3</sub> .....                                   | 31 |
| 1.6- Mecanismos de acción del calcitriol .....  | 33 |
| 1.6.1- Características del VDR.....   | 33 |
| 1.6.2- Acciones genómicas del calcitriol.....   | 36 |
| 1.6.3- Acciones no genómicas del calcitriol.....                                      | 37 |
| 1.7- Funciones biológicas del calcitriol.....   | 38 |
| 2- Cáncer .....   | 39 |
| 2.1- Generalidades.....   | 39 |
| 2.2- Epidemiología .....  | 41 |
| 3- El sistema hormonal de la vitamina D <sub>3</sub> y su relación con el cáncer..... | 43 |
| 3.1- Efectos del calcitriol sobre los sellos distintivos del cáncer .....             | 43 |
| 3.1.1- Calcitriol y sus efectos sobre la proliferación celular .....                  | 43 |
| 3.1.2- Calcitriol y sus efectos sobre la diferenciación celular .....                 | 44 |
| 3.1.3- Calcitriol y sus efectos sobre la muerte celular .....                         | 44 |
| 3.1.4- Calcitriol y sus efectos sobre la angiogénesis y la metástasis.....            | 45 |
| 3.1.5- Calcitriol y sus efectos anti-inflamatorios e inmunomoduladores .....          | 46 |
| 3.2- Calcitriol y ensayos clínicos .....  | 46 |
| 4- Análogos del calcitriol .....  | 49 |
| 4.1- Síntesis de análogos de la vitamina D.....                                       | 51 |
| 4.2- Análogos del calcitriol y ensayos clínicos .....                                 | 53 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.3- Antecedentes sobre análogos fosfónicos del calcitriol .....   | 57  |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....   | 63  |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 66  |
| CAPÍTULO 1 .....   | 67  |
| Síntesis de análogos fosforados estructuralmente relacionados con el análogo EM1 .....   | 67  |
| 1- Planeamiento sintético .....  | 67  |
| 2- Síntesis de las subunidades de los análogos de vitamina D.....  | 70  |
| 2.1- Síntesis del diol de Inhoffen-Lythgoe.....  | 70  |
| 2.2- Síntesis de óxido de fosfina .....  | 71  |
| 2.3- Síntesis del biciclo CD del análogo EM1 .....   | 73  |
| 2.4- Modificación y funcionalización de la cadena lateral.....   | 74  |
| 2.4.1- Síntesis de vinilfosfonatos monosustituidos vía reducción parcial de alquilfosfonatos.....                                  | 75  |
| 2.4.2- Síntesis de vinilfosfonatos di y tri sustituidos a partir de alquilfosfonatos....   | 79  |
| 2.5- Síntesis de la cetona tipo Grundmann 42.....  | 91  |
| 2.6- Construcción del sistema triénico .....   | 92  |
| CAPÍTULO 2 .....   | 95  |
| Ensayos biológicos de la actividad antitumoral del análogo SG y estudios computacionales   | 95  |
| 1- Ensayos biológicos.....   | 95  |
| 1.1- Ensayos in vivo.....  | 95  |
| 1.1.1- Estudio del efecto del análogo SG sobre los niveles plasmáticos de calcio en ratones y parámetros tóxicos en animales ..... | 95  |
| 1.2- Ensayos in vitro.....   | 98  |
| 1.2.1- Estudio del efecto del análogo SG sobre la viabilidad celular.....  | 98  |
| 1.2.2- Efecto del análogo SG sobre la migración celular .....  | 101 |
| 2- Ensayos computacionales .....   | 104 |
| 2.1- Unión del análogo SG al VDR: Estudios de modelado molecular .....   | 104 |
| 2.2- Estudio de docking molecular.....   | 105 |
| CONCLUSIÓN .....   | 112 |
| PRODUCCIÓN .....   | 115 |
| SECCIÓN EXPERIMENTAL .....   | 117 |
| 1- Materiales.....   | 118 |
| 1.1- Síntesis química .....  | 118 |
| 1.1.1- Procedimientos generales para la síntesis química .....   | 118 |
| 1.1.2- Solventes y reactivos.....  | 118 |

|  |     |
|--|-----|
| 1.1.3- Cromatografía .....   | 119 |
| 1.1.4- Instrumentos y equipos .....  | 119 |
| 1.2- Ensayos biológicos.....   | 120 |
| 1.2.1- Reactivos para cultivo.....   | 120 |
| 1.2.2- Líneas Celulares.....   | 120 |
| 1.2.2.1- Línea de adenocarcinoma mamario .....   | 120 |
| 1.2.2.2- Línea de carcinoma colorrectal.....   | 120 |
| 1.2.2.3- Líneas de glioblastoma .....  | 120 |
| 1.2.2.4- Línea de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello .....  | 120 |
| 1.2.3- Cepa de ratón CF1 .....   | 120 |
| 1.3- Ensayos computacionales .....   | 121 |
| 2- Métodos .....   | 121 |
| 2.1- Síntesis química .....  | 121 |
| 2.1.1- Procedimiento general para la reducción catalítica de alquilfosfonatos .....  | 121 |
| 2.1.1.1- Reducción de (4,8-dimetil-7-nonen-1-yl)fosfonato de dietilo (21) .....  | 121 |
| 2.1.1.2- Reducción de octil fosfonato de dietilo (24).....   | 123 |
| 2.1.1.3- Reducción de (Des-A,B-8 $\beta$ -hidroxi-23-colin-24-yl)fosfonato de dietilo (27)<br>.....                                    | 123 |
| 2.1.2- Procedimiento general para las reacciones de carbocupación. Síntesis de<br>vinilfosfonatos disustituídos y trisustituídos ..... | 124 |
| 2.1.2.1- Síntesis de (Z/E)-(2-isopropil-1-octaenil)fosfonato de dietilo (Z/E-35a).....   | 126 |
| 2.1.2.2- Síntesis de (Z/E)-(2-butil-1-octaenil)fosfonato de dietilo (Z/E-35b) .....  | 127 |
| 2.1.2.3- Síntesis de (Z/E)-(2-butil-4,8-dimetil-1,7-nonadienil) fosfonato de dietilo<br>(Z/E-35c) .....                                | 129 |
| 2.1.2.4- Síntesis de (Z)-(Des-A,B-23-butil-8 $\beta$ -trietilsililoxi-23-colin-24-yl)fosfonato de<br>dietilo (39).....                 | 130 |
| 2.1.2.5- Síntesis de (E)-(2-butil-1-yodo-1-octaenil)fosfonato de dietilo (E-36a).....  | 131 |
| 2.1.2.6- Síntesis de (Z)-(2-butil-1-propenilo-1-octaenil)fosfonato de dietilo (Z-36b)<br>.....   | 132 |
| 2.1.2.7- Síntesis de (Z)-(1,2-dibutil-1-octaenil)fosfonato de dietilo (Z-36c).....   | 133 |
| 2.1.2.8- Síntesis de (E)-(Des-A,B-23-butil-8 $\beta$ -trietilsililoxi-24-yodo-23-colin-24-<br>yl)fosfonato de dietilo (40).....        | 134 |
| 2.1.3- Síntesis del biciclo CD y la cadena lateral de EM1 para modificaciones vía<br>química de cupratos [167] .....                   | 136 |
| 2.1.3.1- Síntesis de Des-A,B-23,24-dinorcolan-8 $\beta$ ,22-diol (Diol de Inhoffen-Lythgoe)<br>(8).....                                | 136 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.1.3.2- Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ ,22-di(trietilsililoxi)-23,24-dinorcolano (10).....   | 137 |
| 2.1.3.3- Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-23,24-dinorcolan-22-ol (11) .....  | 138 |
| 2.1.3.4- Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-22-tosiloxi-23,24-dinorcolano (14).....  | 139 |
| 2.1.3.5- Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-22-ciano-23,24-dinorcolano (15)...   | 140 |
| 2.1.3.6- Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-24-norcolan-23-al (16) .....   | 141 |
| 2.1.3.7- Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-24,24-dibromo-23-coleno (17) .....   | 142 |
| 2.1.3.8- Síntesis de (Des-A,B-8 $\beta$ -trietilsililoxi-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (18)<br>.....   | 143 |
| 2.1.3.9- Síntesis de (Z)-(Des-A,B-23-butyl-8 $\beta$ -trietilsililoxi-23-colin-24-il) fosfonato<br>de dietilo (39) .....   | 145 |
| 2.1.3.10- Síntesis de (Z)-(Des-A,B-23-butyl-8 $\beta$ -hidroxi-23-colin-24-il)fosfonato de<br>dietilo (41).....  | 147 |
| 2.1.3.11- Síntesis de (Z)-(Des-A,B-23-butyl-8-oxo-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo<br>(42).....   | 148 |
| 2.1.4- Síntesis del anillo A para el acoplamiento de Wittig-Horner [172].....  | 149 |
| 2.1.4.1- Síntesis de Síntesis de (2Z)-2-[(3S,5R)-3,5-Bis[[1,1-dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-2-metilidenciclohexilideno]acetato de metilo (12a).....                                  | 149 |
| 2.1.4.2- Síntesis de (2Z)-2-[(3S,5R)-3,5-Bis[[1,1-dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-2-<br>metilidenciclohexilideno]etanol (13) .....   | 150 |
| 2.1.4.3- Síntesis de óxido de [(2Z)-2-[(3S,5R)-3,5-Bis[[1,1-dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-2-<br>metilidenciclohexilideno]etil]difenilfosfina (Óxido de fosfina) (7).....             | 151 |
| 2.1.5- Síntesis del análogo SG a través del acoplamiento de Wittig-Horner .....  | 153 |
| 2.1.5.1- Síntesis de (5Z,7E,23Z)-(1S,3R)-[23- <i>n</i> -butyl-1,3bis-(1,1<br>dimetiletil)dimetilsililoxi-9,10-secocola-5,7,10(19),23-tetraen-24-il]fosfonato de<br>dietilo (43)..... | 153 |
| 2.1.5.2- Síntesis de (5Z,7E,23Z)-(1S,3R)-[1,3-dihidroxi-23- <i>n</i> -butyl-9,10-secocola-<br>5,7,10(19),23-tetraen-24-il]fosfonato de dietilo (Análogo SG) (44).....                | 155 |
| 2.2- Ensayos biológicos.....   | 157 |
| 2.2.1- Preparación de la solución stock del calcitriol y análogo SG .....  | 157 |
| 2.2.2- Evaluación del calcio plasmático en ratones.....  | 158 |
| 2.2.3- Cultivo Celular.....  | 160 |
| 2.2.3.1- Mantenimiento de los cultivos celulares .....   | 160 |
| 2.2.3.2- Preservación criogénica .....   | 160 |
| 2.2.4- Ensayos celulares .....   | 161 |
| 2.2.4.1- Ensayos de viabilidad celular: conteo en cámara de Neubauer .....   | 161 |
| 2.2.4.2- Ensayo de migración celular .....   | 162 |

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| 2.3- Análisis estadístico.....     | 162 |
| 2.4- Ensayos computacionales ..... | 163 |
| BIBLIOGRAFÍA.....                  | 165 |
| SELECCIÓN DE ESPECTROS .....       | 185 |

# **INTRODUCCIÓN**

## **1-Vitamina D**

### **1.1- Historia de la vitamina D**

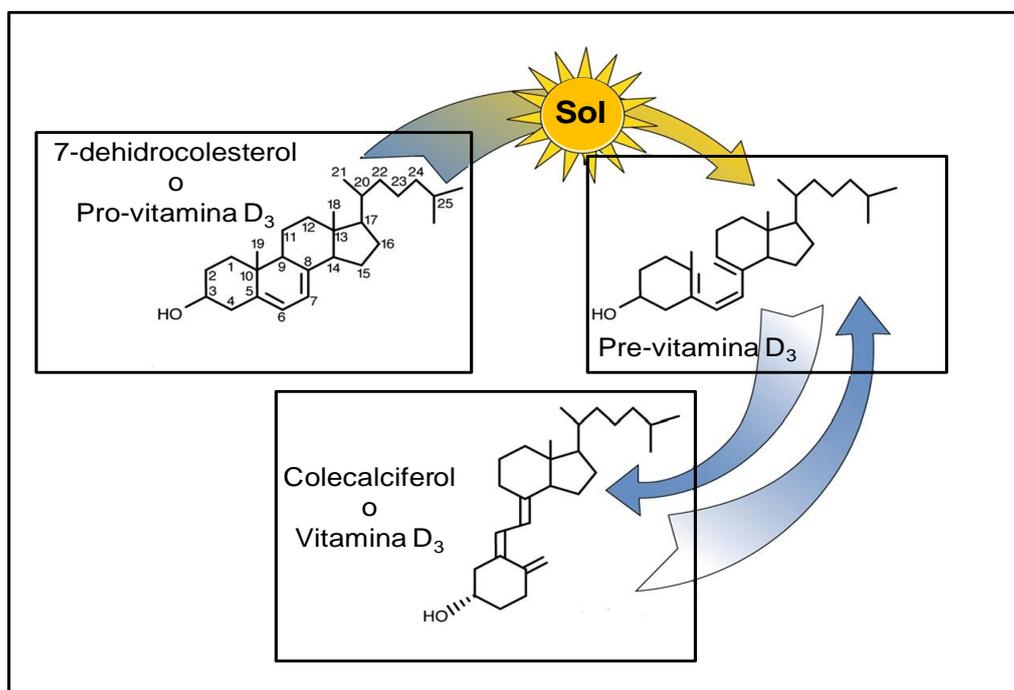
Fueron las investigaciones realizadas en procura de una terapia para el raquitismo las que condujeron al descubrimiento de la vitamina D. La enfermedad se identificó a mediados del siglo XVII en el norte de Europa en una época en que la población humana se concentró en grandes ciudades con escasa exposición a la luz solar. Fue descrita por primera vez por Whistler en 1645 [1], aunque recién en 1822 Sniadecki pudo relacionar la exposición al sol con la prevención de la enfermedad, cuando observó que esta era más frecuente en los niños de la zona céntrica de Varsovia en comparación con los niños que vivían en las granjas de las afueras de la ciudad [2].

A mediados de 1800, Bretonneau [3] encontró un tratamiento alternativo al administrar aceite de hígado de bacalao a niños con raquitismo agudo quienes experimentaron una rápida y notable mejoría. Consecuentemente, se comenzó a considerar a la patología como una deficiencia nutricional. Originalmente se pensó que dicho factor podía ser la entonces recientemente descubierta vitamina A, pero McCollum y colaboradores [4] lograron dissociar la actividad típica de esta vitamina de la actividad antirraquítica. Se establecía así la existencia de un nuevo principio liposoluble, presente en el aceite de hígado de bacalao, que por las características debía considerarse como una vitamina, la cual posteriormente se conocería con el nombre de vitamina D.

Estas conclusiones prestaban poca atención a la incidencia de la irradiación como factor terapéutico. Sin embargo, la participación de la luz fue confirmada por varios ensayos posteriores entre los cuales se encontraba el de Huldschinsky [5] quien, irradiando el brazo de un niño raquítico con una lámpara de mercurio, demostró que se recuperaba el tejido óseo. Otros trabajos posteriores en los cuales se irradiaban diferentes tipos de alimentos demostraron que esta irradiación les proporcionaba actividad antirraquítica [6].

Quedó claro entonces que los vertebrados poseían dos formas de adquirir el compuesto liposoluble: a través de la dieta, como es típico de los compuestos vitamínicos, o sintetizándolo al exponer su piel a la radiación ultravioleta proveniente del sol. Estos hallazgos estimularon la búsqueda del precursor de la vitamina D, detectándose en primer lugar el ergosterol o provitamina D<sub>2</sub> en levaduras. Luego se lo encontró en otras especies de hongos y en plantas. Más tarde se aisló la vitamina D en

forma pura y se la denominó vitamina D<sub>2</sub> o ergocalciferol. Sin embargo, varios investigadores observaron que este compuesto no era tan efectivo como la vitamina D obtenida de la piel de los mamíferos. Estas observaciones llevaron a Windaus y Bock en 1937 [7], a obtener a partir de la piel de cerdo un nuevo precursor, el 7-dehidrocolesterol o provitamina D<sub>3</sub>, que cuando era irradiado producía otra forma de la vitamina D a la que se denominó vitamina D<sub>3</sub> o colecalciferol (**Figura 1**). La vitamina D<sub>3</sub> y/o el 7-dehidrocolesterol han sido aislados de la piel de peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos [8,9].

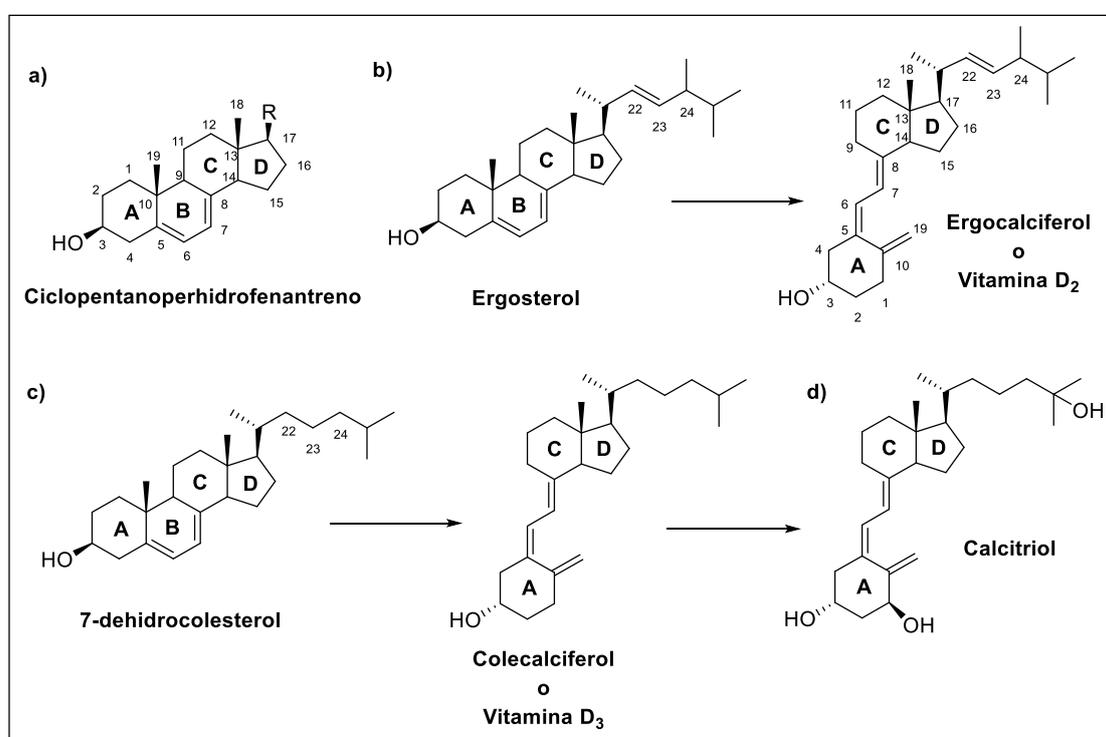


**Figura 1.** Conversión del 7-dehidrocolesterol en pre-vitamina D<sub>3</sub> por acción de la luz UV y posterior isomerización a colecalciferol por acción de la temperatura corporal. Tomado y adaptado de DeLuca, 2014 [10].

Con el tiempo se fueron dilucidando las estructuras químicas y mecanismos que conducían a la obtención de la vitamina D<sub>3</sub> en el organismo; Holick y colaboradores proporcionaron evidencia de la formación de la pre-vitamina D<sub>3</sub> por irradiación solar [11] y en 1978 el grupo de Esvelt aisló e identificó al colecalciferol por espectroscopía de masa [12]. Desde entonces se ha pensado que el ergosterol y la vitamina D<sub>2</sub> son típicos de vegetales y hongos, mientras que el 7-dehidrocolesterol y la Vitamina D<sub>3</sub> lo son de los vertebrados.

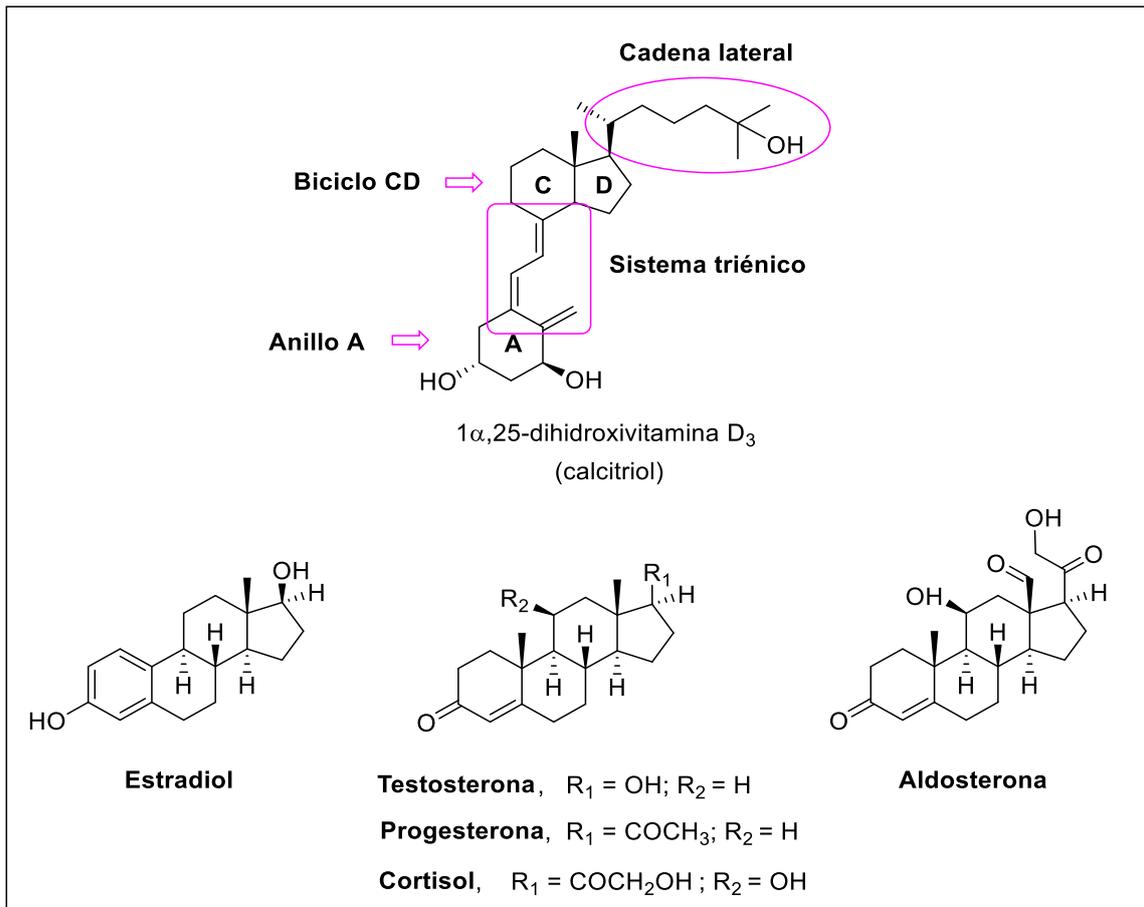
## 1.2- Estructuras químicas y nomenclatura de las vitaminas D

De acuerdo a la estructura química de la vitamina D, se identifican dos formas distintas, la vitamina D<sub>3</sub> o colecalciferol [13] y la vitamina D<sub>2</sub> o ergocalciferol [14]. Las mismas se obtuvieron al irradiar con luz ultravioleta los precursores esteroidales 7-dehidrocolesterol (**Figura 2C**) y ergosterol (**Figura 2B**), respectivamente. El ergosterol posee, a diferencia del 7-dehidrocolesterol, un doble enlace entre los carbonos 22 y 23 y un grupo metilo en el carbono 24 de la cadena lateral, diferencias que se mantienen entre el ergocalciferol y el colecalciferol. En la **Figura 2D**, se puede observar la forma activa de la vitamina D<sub>3</sub>, el calcitriol o 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitriol.



**Figura 2. Estructuras químicas de las vitaminas D y metabolitos relacionados.** a) Esqueleto esteroidal ciclopentanoperhidrofenantreno. b) Ergocalciferol y su precursor. c) Colecalciferol y su precursor. d) Forma activa de la vitamina D<sub>3</sub>.

Desde el punto de vista estructural podemos diferenciar cuatro subestructuras dentro de la vitamina D y sus metabolitos: un sistema rígido central conformado por el biciclo CD el cual se halla unido a dos partes más flexibles, la cadena lateral y el sistema triénico, quien a su vez se halla unido al anillo A, como se muestra en la **Figura 3**.



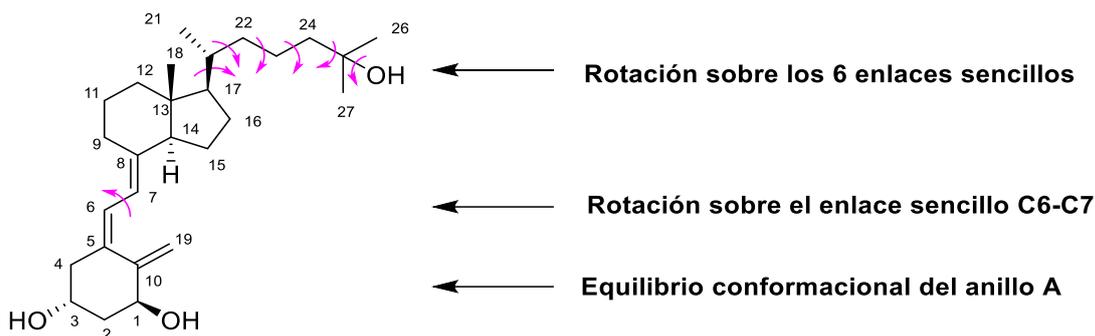
**Figura 3.** Estructura de la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> y otras hormonas esteroideas.

De acuerdo a la estructura y al modo de acción del metabolito hormonalmente activo de la vitamina D<sub>3</sub>, el calcitriol se clasifica en la misma familia que las hormonas esteroideas clásicas, tales como el estradiol, testosterona, progesterona, cortisol y aldosterona, entre otras (**Figura 3**). Sin embargo, presenta tres características estructurales que lo diferencian:

- 1) Posee una cadena lateral con 8 carbonos mientras que las hormonas esteroideas clásicas no tienen cadena lateral o, si la tienen, consta únicamente de dos carbonos.
- 2) Es un seco-esteroide, es decir, presenta uno de los anillos de la estructura cicloperhidrofenantrénica abierto (enlace C9-C10).
- 3) Presenta una flexibilidad inusual en su estructura con respecto a las hormonas esteroideas clásicas, que lo hace conformacional y constitucionalmente dinámico.

Como se puede observar en la **Figura 4**, esta flexibilidad es debido a [15,16]:

- La presencia de una cadena lateral con 8 átomos de carbono unidos por enlaces simples permite que la misma pueda adquirir 729 conformaciones posibles, de las cuales 394 se hallan cercanas al mínimo de energía.
- La rotación sobre el enlace sencillo C6-C7 permite la formación de 2 conformaciones, 6-s-cis y 6-s-trans.
- El anillo A se halla en equilibrio entre sus 2 conformaciones silla posibles.



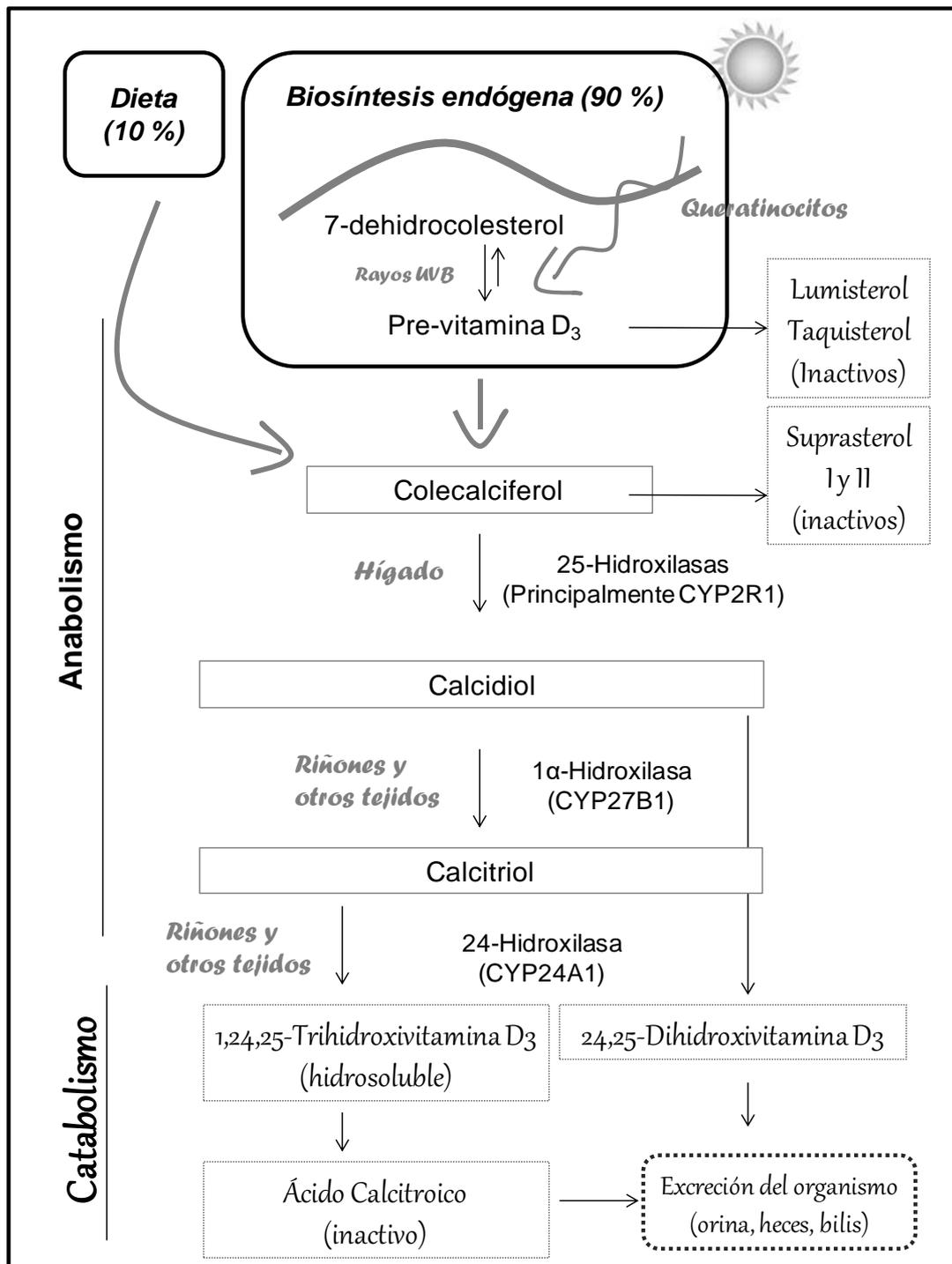
**Figura 4.** Aspectos estructurales de la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  que contribuyen a su flexibilidad conformacional.

En cuanto a su nomenclatura, las vitaminas  $D_2$  y  $D_3$  son  $\beta$ -secoesteroides, ya que su esqueleto proviene de la ruptura de un anillo del núcleo esteroidal básico, conocido como sistema ciclopentanoperhidrofenantreno (**Figura 2A**). La apertura de uno o más anillos del esqueleto esteroidal da origen al prefijo “seco”, en este caso en particular, la ruptura del enlace C9-C10 correspondiente al anillo B del esteroide precursor.

La numeración original del esteroide se mantiene en la vitamina D y sus metabolitos, conservando además la denominación  $\alpha$  ó  $\beta$  para los grupos situados por debajo y por encima del plano de los anillos, respectivamente, de acuerdo a la orientación de los mismos en el esteroide precursor [17]. Sin embargo, dado que la denominación esteroidal  $\alpha$  ó  $\beta$  puede resultar confusa, la IUPAC recomienda utilizar la convención *R/S* para indicar la estereoquímica de los sustituyentes del anillo A, así como el sistema *Z/E* para indicar la geometría de los enlaces dobles. Además, las vitaminas D y sus derivados pueden nombrarse según la nomenclatura sistemática esteroidal o utilizando nombres triviales, según lo requiera la complejidad de la estructura [18].

### 1.3- Metabolismo de la vitamina D

Como se mencionó anteriormente, la vitamina D es una pro-hormona esteroidea que se adquiere ya sea a través de la dieta o por síntesis en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol mediante la acción de los rayos ultravioleta (**Figura 5**). El proceso de biosíntesis cutánea de colecalciferol ocurre en dos pasos: los rayos solares UVB en el rango de 290-315 nm [19-21] fotoisomerizan el 7-dehidrocolesterol a pre-vitamina D<sub>3</sub>, (paso no enzimático) a nivel de la membrana plasmática de los queratinocitos [22]; luego ésta isomeriza a colecalciferol en un proceso dependiente de la temperatura de la piel, que tarda varias horas [23,24]. La producción cutánea está estrictamente regulada, de modo que cuando el nivel de colecalciferol formado es suficiente, la pre-vitamina D<sub>3</sub> puede ser fotoisomerizada a formas inertes (lumisterol o taquisterol) o puede volver a transformarse en 7-dehidrocolesterol, y el colecalciferol sintetizado puede degradarse a formas inactivas (suprasterol I y II) [25]. Por otro lado, la obtención de la vitamina por la dieta (colecalciferol (D<sub>3</sub>) de origen animal y ergocalciferol (D<sub>2</sub>) presente en los vegetales) se da a través de la ingesta de ciertos alimentos. Aquellos ricos en vitamina D<sub>3</sub> son principalmente el aceite de hígado de pescado y los pescados grasos (salmón, atún, arenque, sardinas, etc.). También se encuentra disponible en menor proporción en la leche, manteca, quesos, yema de huevo y champiñones, y actualmente muchos de estos productos se comercializan fortificados con vitamina D. Sin embargo, la escasa variedad de alimentos que contienen una significativa cantidad de vitamina D, sumado al hecho de que los alimentos representan un pequeño aporte a la cantidad total de esta vitamina en el cuerpo, hace que su biosíntesis en la piel, a partir de la exposición solar, sea considerada la principal fuente de la misma.



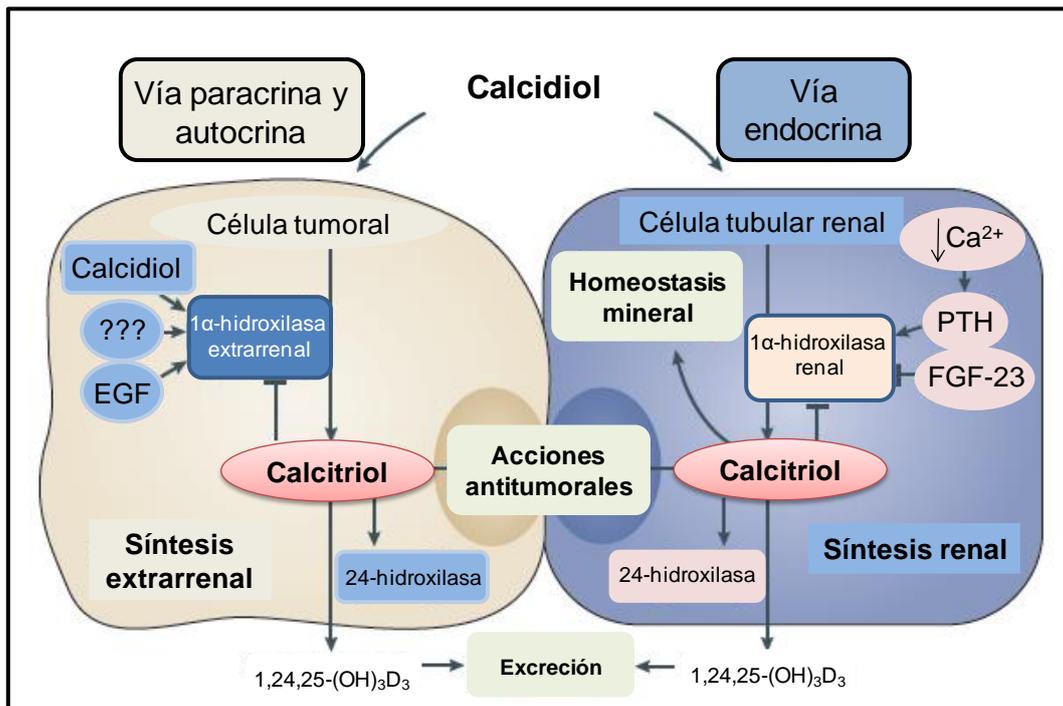
**Figura 5.** Metabolismo de la vitamina D<sub>3</sub>.

La vitamina D<sub>3</sub> sintetizada en la piel o ingerida en la dieta no tiene ninguna función biológica conocida en el organismo. Se une a una proteína específica, la proteína transportadora de vitamina D o DBP (del inglés D- Binding Protein), y así es

transportada a través del torrente sanguíneo para su almacenamiento en el tejido adiposo o hacia las células diana para su futura transformación en la forma hormonalmente activa.

Para ejercer sus efectos fisiológicos, dos reacciones de hidroxilación secuenciales son necesarias para producir la forma hormonalmente activa de la vitamina D, el  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  o calcitriol. La primera hidroxilación, sobre el carbono 25, ocurre en el hígado y este proceso es conocido como el primer paso de activación metabólica de la vitamina  $D_3$ . Este evento ocurre en los hepatocitos catalizado por varias enzimas hepáticas con función de citocromo P450 (CYP2R1, CYP27A1, CYP2D11, CYP2D25, CYP3A4 y CYP2J3) que favorecen la conversión del colecalciferol a calcidiol (25-hidroxitamina  $D_3$  o hidroxicolecalciferol) [26,27]. Se ha planteado que, de todas estas enzimas, la CYP2R1 es una enzima clave de la 25-hidroxilación puesto que los pacientes con mutaciones en su gen presentan signos clínicos y bioquímicos de deficiencia de vitamina D [28]. El calcidiol es transportado por DBP hacia el riñón, para completar su proceso de activación en el túbulo proximal. Aquí es hidroxilado en el carbono 1 del anillo A para convertirse en la forma hormonalmente activa de la vitamina  $D_3$ : el calcitriol ( $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ ), principal responsable de la mayoría de los efectos biológicos de la vitamina  $D_3$  [29-31]. Esta reacción de hidroxilación es catalizada por la enzima mitocondrial  $1\alpha$ -hidroxilasa que es el citocromo P450 27B1 (CYP27B1), codificada por el gen CYP27B1 en los seres humanos. Las mutaciones en esta enzima producen raquitismo dependiente de vitamina D tipo 1, lo cual resalta la importancia de su función en la conversión del calcidiol a su forma activa [32].

La enzima  $1\alpha$ -hidroxilasa se encuentra predominantemente en las células de los túbulos renales, pero también se expresa en sitios extrarrenales como placenta, monocitos, macrófagos, próstata, mama, colon, corazón, pulmón, cerebro, queratinocitos, células  $\beta$  pancreáticas, células endoteliales y células paratiroides [33]. Es decir, actualmente se encuentra ampliamente reconocida la producción extrarrenal del calcitriol en muchos tipos de células del cuerpo y, además, en células tumorales [34,35]. En contraste con el sistema clásico endocrino de la vitamina D, la regulación de la producción de calcitriol en los tejidos extrarrenales es independiente de la estimulación por la hormona paratiroidea (PTH) y depende, en cambio, de factores específicos del tejido en cuestión y de los niveles de calcidiol en sangre (**Figura 6**).



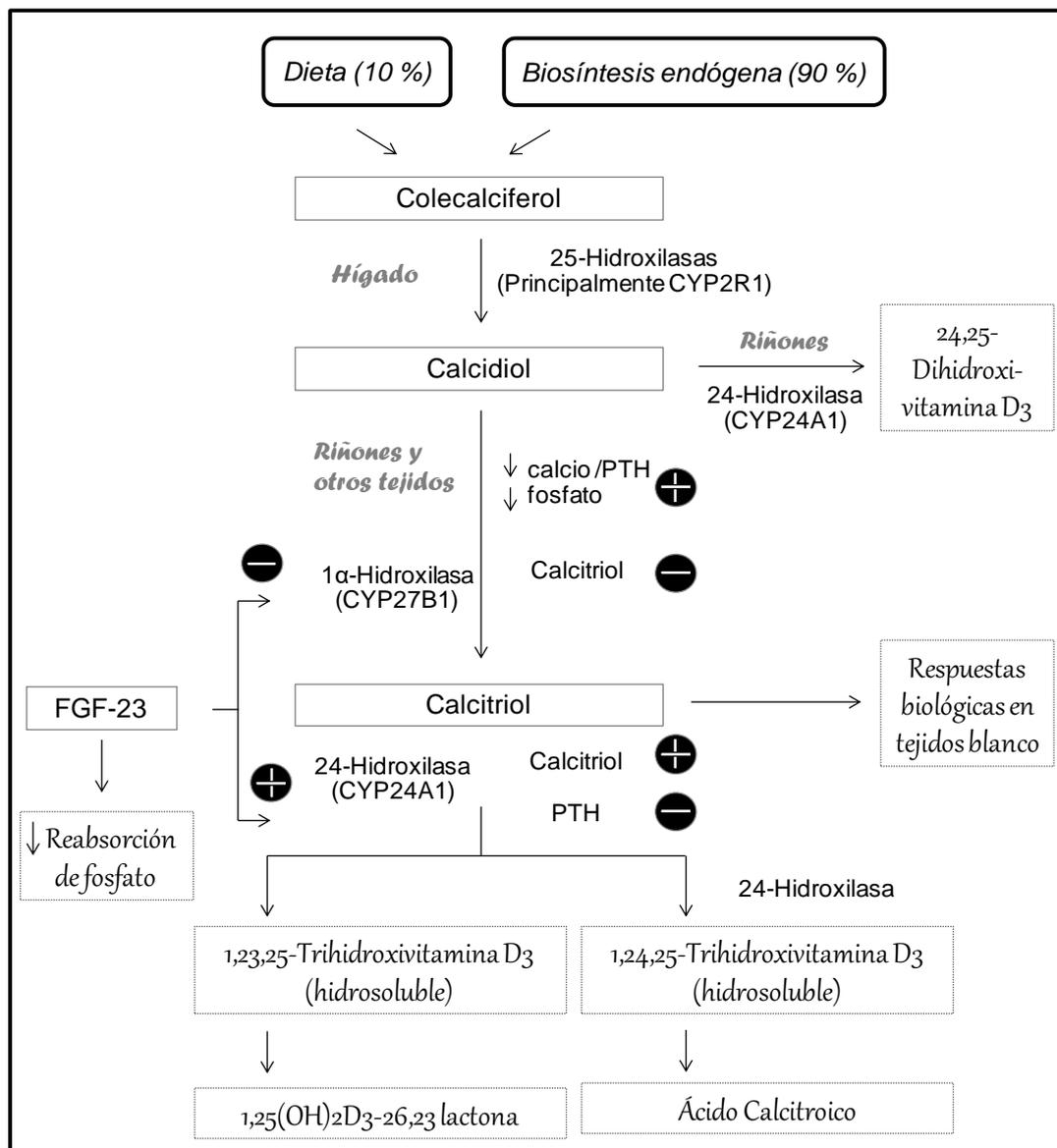
**Figura 6.** Vías de síntesis del calcitriol: renal endocrina y extrarrenal paracrina o autocrina. Tomado y adaptado de Feldman et al., 2014 [34].

El calcitriol, como fue mencionado, es transportado en sangre unido a la DBP en un 85-88%, mientras que en un 12-15% lo hace unido a la albúmina, estando en condiciones fisiológicas normales aproximadamente sólo el 0,4% libre en plasma [36]. Presenta una vida media plasmática de 4-5 h y su acción se encuentra limitada por su catabolismo. La degradación del calcitriol ocurre principalmente a través de la actividad de la 24-hidroxilasa (CYP24A1), codificada por el gen CYP24A1. Es una enzima multicatalítica perteneciente a la familia del citocromo P450 capaz de realizar oxidaciones sucesivas [37-39]. Esta enzima necesita para su acción la presencia de un grupo hidroxilo en posición 25 y puede hidroxilar la posición C24 tanto del calcidiol como del calcitriol, aunque la afinidad por este último es mayor. La acción de la 24-hidroxilasa conduce a la síntesis de  $24,25(OH)_2$  vitamina  $D_3$  y  $1,24,25(OH)_3$  vitamina  $D_3$  (ácido calcitriólico), ambos son derivados hidrosolubles que poseen menor afinidad por el receptor de vitamina D (VDR). Estos derivados pueden ser eliminados del organismo constituyendo un papel clave en la protección contra el exceso de metabolitos de vitamina D [32,40].

#### 1.4- Regulación del metabolismo de la vitamina D<sub>3</sub>

El calcitriol requiere una estricta regulación de su activación y desactivación a través de una serie de procesos de retroalimentación (positiva y negativa) que resultan en cambios en la expresión de las enzimas hidroxilasas con el fin de aumentar o disminuir las concentraciones del mismo, según el estado fisiológico [41]. La producción del calcitriol, está estrechamente regulada: principalmente por la hormona paratiroidea (PTH), el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23), el calcio, el fósforo, y el mismo calcitriol (**Figura 7**). Los niveles bajos de calcio inducen un aumento de la actividad de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa, es decir, la hipocalcemia es detectada por el receptor sensible al calcio (CaSR) de las células paratiroides, con lo que aumenta la expresión de la PTH y ésta a su vez induce la transcripción de la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa en las células tubulares proximales del riñón. De este modo, la producción de calcitriol se incrementa para regular la homeostasis del calcio y del fósforo [32]. Para controlar este ciclo, el mismo calcitriol suprime la transcripción de los genes PTH y CYP27B1 [24]. Además, el calcitriol estimula la expresión de la enzima 24-hidroxilasa que previamente estaba inhibida por los bajos niveles de calcio y por la PTH. La marcada inducción de la 24-hidroxilasa resulta en una autorregulación cuando los niveles de calcitriol requieren atenuación para proteger al organismo de la hipercalcemia [32]. Otras hormonas que ejercen regulación endocrina sobre la actividad de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa son los estrógenos, la calcitonina, la prolactina, la hormona de crecimiento y la insulina. Sus efectos estimulan la acción de esta enzima y favorecen la producción de calcitriol [42]. Esta última hormona podrá interactuar con su receptor VDR generando los efectos clásicos en la regulación de la homeostasis fosfocálcica. Al corregirse el déficit en la concentración sérica de calcio, se genera regulación negativa por parte del calcitriol sobre la PTH y las hidroxilasas y, en este mecanismo de control también interviene el FGF-23 liberado a partir del hueso [43].

El FGF-23 es un factor fosfatúrico que promueve la excreción renal de fosfato al disminuir su reabsorción en el túbulo proximal. Específicamente, el calcitriol induce la expresión de FGF-23 y a su vez el FGF-23 suprime la expresión de 1 $\alpha$ -hidroxilasa e induce la de 24-hidroxilasa en el riñón; por lo tanto, inhibe la síntesis y promueve el catabolismo del calcitriol para reducir sus niveles y dejar de estimular la producción de FGF-23, formando un ciclo de retroalimentación negativa entre FGF-23 y el calcitriol.



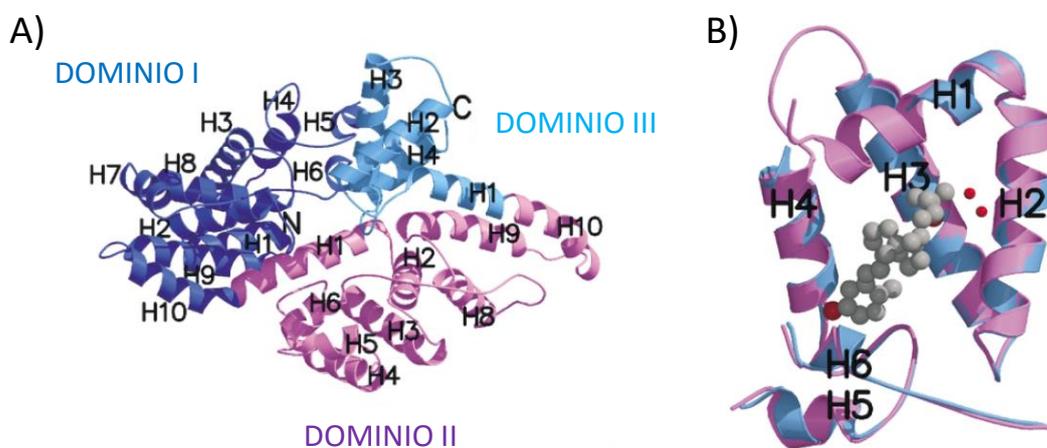
**Figura 7.** Regulación de la síntesis metabólica y degradación del calcitriol. Tomado y adaptado de Christakos et al., 2015 [32].

### 1.5- Transporte de la vitamina D<sub>3</sub>

Los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> son moléculas lipofílicas que son transportadas por el sistema circulatorio unidas a proteínas plasmáticas. La más importante de estas proteínas es la DBP que une los diferentes metabolitos con el siguiente orden de afinidad: calcidiol = 24,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub> > calcitriol > colecalciferol. Si bien la mayoría de los metabolitos se encuentran unidos a la DBP, también pueden ser transportados por lipoproteínas y por la albúmina sérica debido a la mayor abundancia de esta última (650 μM de albúmina con respecto a 5 μM de DBP) [44]. Además, en

general estos transportadores están disponibles o “libres” debido a que su concentración relativa es elevada con respecto a los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub>.

La DBP es una proteína plasmática de 458 aminoácidos (58 kDa) perteneciente a la misma familia que la albúmina, la afamina y la  $\alpha$ -fetoproteína. En su estructura tridimensional (**Figura 8a**) se pueden diferenciar 3 dominios: I, II y III; localizándose en el dominio I el sitio de unión a la vitamina D (**Figura 8b**). En esta región, concretamente entre las hélices 1 a 4, se forma una grieta donde hay predominantemente aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos que permiten una interacción favorable con la vitamina D o sus metabolitos [45].



**Figura 8.** A) Estructura cristalina de la proteína transportadora DBP. B) Sitio de unión de la vitamina D y sus metabolitos.

Los niveles plasmáticos de la DBP son 20 veces más altos que la cantidad total de metabolitos de vitamina D<sub>3</sub>, por lo que el calcitriol es transportado en sangre unido a la DBP en un 85-88 %, mientras que en un 12-15 % lo hace unido a la albúmina, estando en condiciones fisiológicas normales aproximadamente sólo el 0,4 % libre en plasma [36].

Los metabolitos de vitamina D<sub>3</sub>, tanto libres como unidos a la DBP, pueden ingresar a la célula ya sea por un mecanismo de transporte pasivo o activo. Es decir, la pequeña fracción de los metabolitos no unidos a DBP, entran pasivamente a las células blanco para ser adicionalmente metabolizados y ejercer sus efectos biológicos. En cuanto a los metabolitos unidos a la DBP, pueden ingresar a la célula mediante endocitosis [46]. La megalina (también llamado receptor endocitomegalina) pertenece a un grupo de

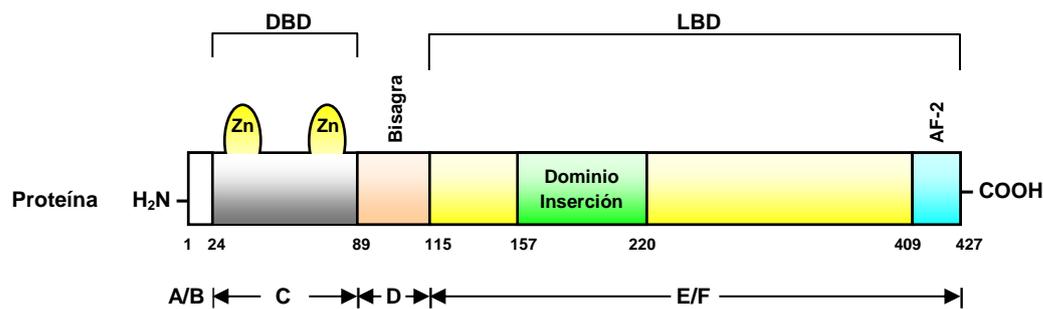
proteínas que facilitan la endocitosis del complejo calcidiol - DBP junto con la cubilina y la proteína asociada al receptor (RAP). Este mecanismo es el que ocurre en los túbulos proximales del riñón para la producción endocrina del calcitriol. Se ha reportado, que los ratones *knockout* para megalina no logran recuperar la DBP y pierden la vitamina D por vía urinaria, con el consecuente raquitismo [44]. A su vez, el calcitriol circulante unido a DBP también puede ser endocitado mediante este mecanismo y, al ser liberado en el interior de la célula, provocar sus efectos biológicos.

## **1.6- Mecanismos de acción del calcitriol**

El calcitriol actúa como una hormona esteroidal y puede inducir respuestas a nivel genómico (regulando la transcripción de genes) y no genómico (rápidas). En ambas vías de acción se ha descrito la participación del receptor VDR [34,47], el cual puede actuar como un factor de transcripción activado por ligando.

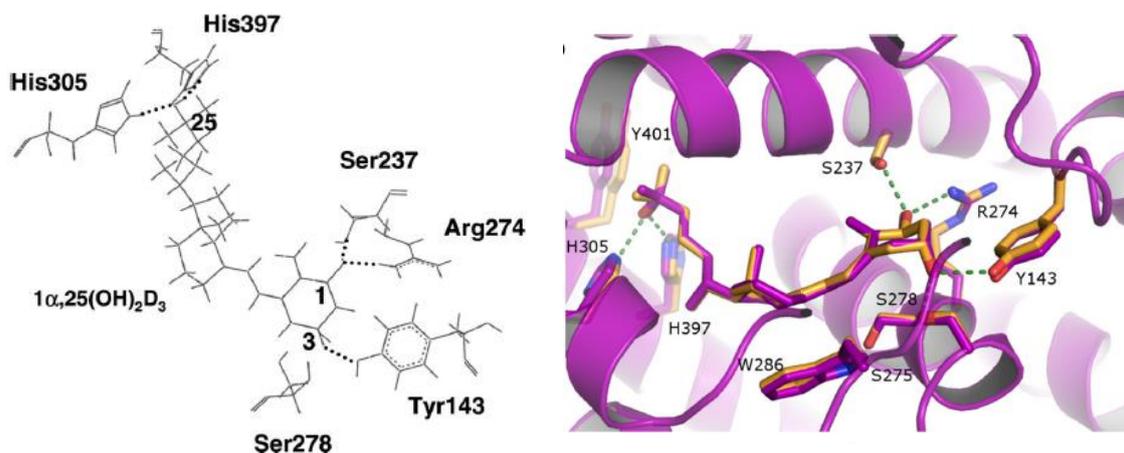
### **1.6.1- Características del VDR**

El VDR, es un factor transcripcional dependiente de ligando, que media la transcripción o represión de determinados genes que regulan la síntesis de proteínas; y mantiene una alta homología estructural y de unión de ligando entre varias especies. En particular, el receptor para la vitamina D humano pertenece a la familia de los receptores de hormonas esteroideas - tiroideas – retinoideas, y es un péptido de 427 aminoácidos (48 kDa). Al igual que otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, el VDR presenta una estructura modular en la que se pueden diferenciar seis regiones (A-F) (**Figura 9**): un dominio N-terminal (región A/B), un dominio amino-terminal, altamente conservado, de unión al ADN (región C, DBD: del inglés DNA Binding Domain), una región bisagra flexible (región D), y un dominio carboxi-terminal, de unión al ligando (región E/F, LBD: del inglés Ligand Binding Domain). Ambos dominios DBD y LBD, están conectados a través de la región bisagra. La región A/B contiene una función de activación autónoma, AF-1, que es la más divergente entre los receptores nucleares. El VDR, en particular, muestra una región A/B más bien pequeña sin la función AF-1, de modo que se lo puede considerar conformado por dos dominios funcionales: LBD y DBD.



**Figura 9.** Estructura y organización del Receptor de la vitamina D (VDR).

La estructura cristalina de LBD-VDR unido a su ligando natural, el calcitriol, ha sido reportada por Rochel y colaboradores [48]. Esta estructura muestra que este dominio se encuentra formado por 13 hélices  $\alpha$  y 3 hojas plegadas  $\beta$  [49]. La activación del VDR depende de la capacidad del ligando de producir un cambio conformacional en el sitio LBD creando un dominio funcional activado AF-2 dentro por la Hélice 12 (H12) que media la unión de co-moduladores necesarios para regular la transcripción génica [49,50]. La estructura reportada por Rochel, corresponde a la conformación activa del VDR (es decir, contiene el dominio de AF-2 activado). Las interacciones principales que se establecen entre el calcitriol y el LBD corresponden a enlaces puentes de hidrógeno con los hidroxilos de las posiciones 1 (1-OH), 3 (3-OH) y 25 (25-OH) del metabolito activo. El 1-OH forma puentes de hidrógeno con los aminoácidos Ser237 (- 9 kcal mol<sup>-1</sup>) y Arg274 (- 20 kcal mol<sup>-1</sup>), siendo más fuerte la interacción con este último residuo. El 3-OH interacciona con Tyr143 (- 10 kcal mol<sup>-1</sup>) y Ser278 (- 9 kcal mol<sup>-1</sup>), y el 25-OH establece dos puentes de hidrógeno con His305 (- 12 kcal mol<sup>-1</sup>) e His397 (- 9 kcal mol<sup>-1</sup>), respectivamente [49,51]. En la **Figura 10**, se detallan las principales interacciones descriptas.



**Figura 10.** Principales interacciones entre el calcitriol y el LBD-VDR correspondientes a los enlaces puentes de hidrógeno con los hidroxilos en posición 1-OH, 3-OH y 25-OH del metabolito activo.

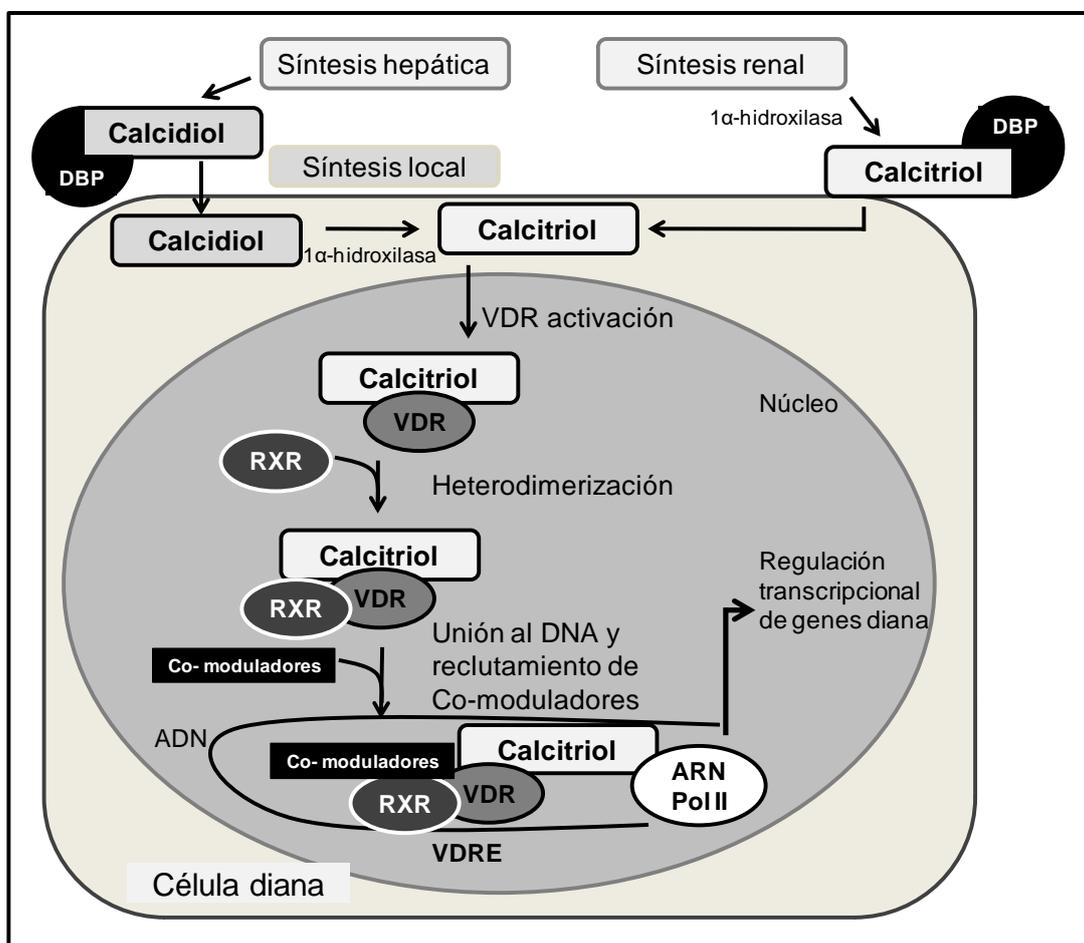
Por otra parte, como se detalla en la **Tabla 1**, el VDR se puede encontrar en una diversidad de tejidos y órganos, dónde puede actuar el calcitriol para inducir sus respuestas biológicas [42,52].

| Sistema          | Órganos, tejidos y células  |
|------------------|---|
| Endocrino        | Paratiroides - Células C tiroideas - Células $\beta$ pancreáticas - Glándulas suprarrenales - Hipófisis |
| Cardiovascular   | Células del músculo liso arterial - Cardiomiocitos - Células endoteliales                               |
| Osteomuscular    | Osteoclastos - Condrocitos - Músculo estriado esquelético   |
| Gastrointestinal | Esófago - Estómago - Intestino - Hepatocitos  |
| Renal            | Células tubulares - Aparato yuxtglomerular - Podocitos  |
| Reproductor      | Ovarios - Placenta - Útero - Testículos - Epidídimo   |
| Inmune           | Médula ósea - Timo - Linfocitos B y C   |
| Respiratorio     | Células alveolares pulmonares   |
| Epidérmico       | Queratinocitos y folículos pilosos  |
| Nervioso         | Neuronas  |
| Otros            | Retina - Tejido adiposo - Mama - Células tumorales - Parótidas  |

**Tabla 1.** Distribución tisular del VDR.

### 1.6.2- Acciones genómicas del calcitriol

El mecanismo de acción genómico del calcitriol necesita de la unión del ligando al VDR [53,54]. De este modo, el VDR activado, cumple su función de dirigir la maquinaria de la transcripción a sitios específicos del genoma. Es decir, el VDR activado por el ligando sufre un cambio conformacional que permite que el receptor sea translocado al núcleo donde forma un heterodímero con el receptor de ácido retinoico X (RXR); este complejo se une a elementos de respuesta de vitamina D (VDRE) en el promotor de los genes diana y recluta co-activadores y/o co-represores para inducir o inhibir la transcripción de esos genes [34,55] (**Figura 11**).



**Figura 11.** Mecanismo de acción genómico del calcitriol a través de VDR.. Tomado y adaptado de Feldman et al., 2014 [34].

Dentro de los principales genes blanco que se han caracterizado se incluyen transportadores de calcio y fosfato, osteocalcina (la proteína de unión de calcio), bombas iónicas en intestino y riñón y el factor de diferenciación osteoclastogénico,

sintetizado por los osteoblastos, que estimula la actividad de los osteoclastos. Además, el calcitriol suprime la expresión renal del gen CYP27B1, cuyo producto proteico es responsable de su síntesis, e induce la expresión de CYP24A1, cuyo producto, la enzima 24-hidroxilasa, es responsable de su degradación [56].

La gran distribución del VDR en diferentes tejidos y la presencia de los VDRE encontrados en más de 200 genes que modulan un gran número de procesos celulares y tisulares, justifican la variedad de efectos del calcitriol en el organismo. Estos efectos pueden comprender acciones clásicas de regulación de la homeostasis fosfocálcica y no clásicas.

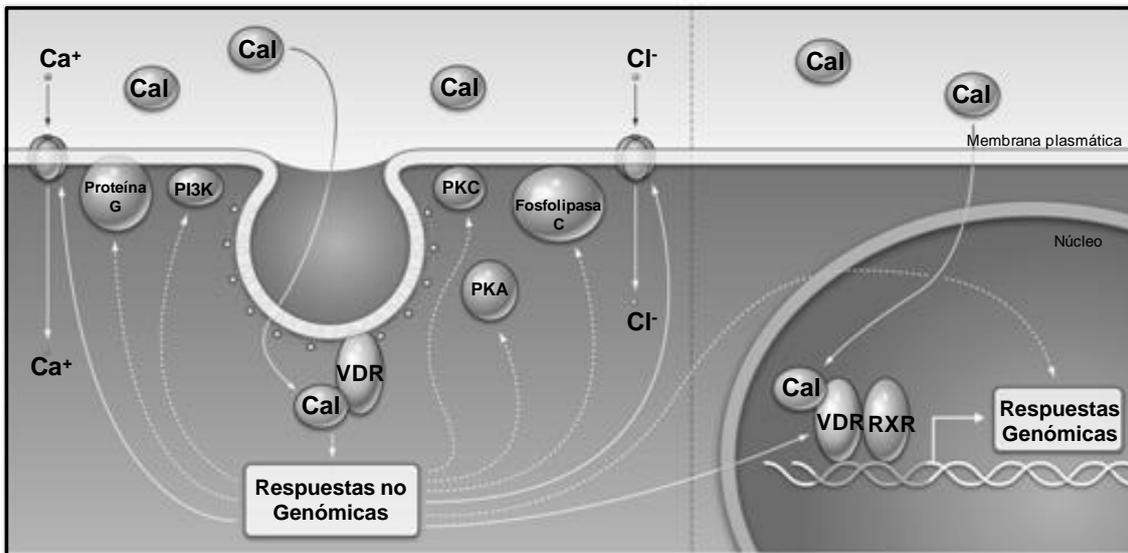
### **1.6.3- Acciones no genómicas del calcitriol**

Además de sus acciones genómicas, el calcitriol posee acciones no genómicas o efectos rápidos, los cuales ocurren en unos pocos segundos o minutos luego del agregado del mismo y son independientes de la transcripción de genes [57]. Se ha documentado la existencia de receptores de membrana para el calcitriol responsables de esta rapidez de ocurrencia de los efectos no genómicos [58]. Los dos candidatos principales para actuar como receptores de membrana son el receptor VDR y la proteína ERp57 (del inglés Endoplasmic Reticulum stress Protein 57) o conocida también como 1,25-D<sub>3</sub>-MARRS (del inglés Calcitriol Membrane Associated Rapid Response Steroid) y GRP58. ERp57 se identificó y describió por primera vez a partir del estudio de los efectos rápidos inducidos por calcitriol en membranas basolaterales del epitelio intestinal de pollo [59] y luego se halló su equivalente en mamíferos [60]. En cuanto a la participación del VDR en las respuestas rápidas, se ha descrito su presencia en las caveolas celulares, es decir, en las invaginaciones de la membrana plasmática enriquecidas con esfingolípidos y colesterol. El calcitriol al interactuar con estos receptores puede iniciar rápidamente la síntesis de segundos mensajeros tales como AMP cíclico, GMP cíclico, inositol trifosfato, diacilglicerol y calcio. Así, las señales de estas pequeñas moléculas pueden ser amplificadas por la consiguiente activación de cascadas de proteínas río abajo o efectores secundarios, tales como la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa activada por mitógenos y calmodulina, o por modulación de la vía Hedgehog/Gli [61,62].

Las múltiples respuestas rápidas del calcitriol se traducen en diversos efectos fisiológicos dentro de los que cabe citar eventos como la absorción intestinal rápida de calcio, la secreción de insulina por células  $\beta$  pancreáticas inducida por VDR, la apertura

de canales de calcio y cloro dependientes de voltaje en los osteoblastos y la migración rápida de células endoteliales [62]. Además, estos efectos no genómicos pueden cooperar con la vía genómica para transactivar el VDR nuclear e inducir otras respuestas biológicas. De este modo, ambos receptores, de membrana y nucleares, pueden participar en los efectos finales del calcitriol en los diferentes tipos de células [63-66].

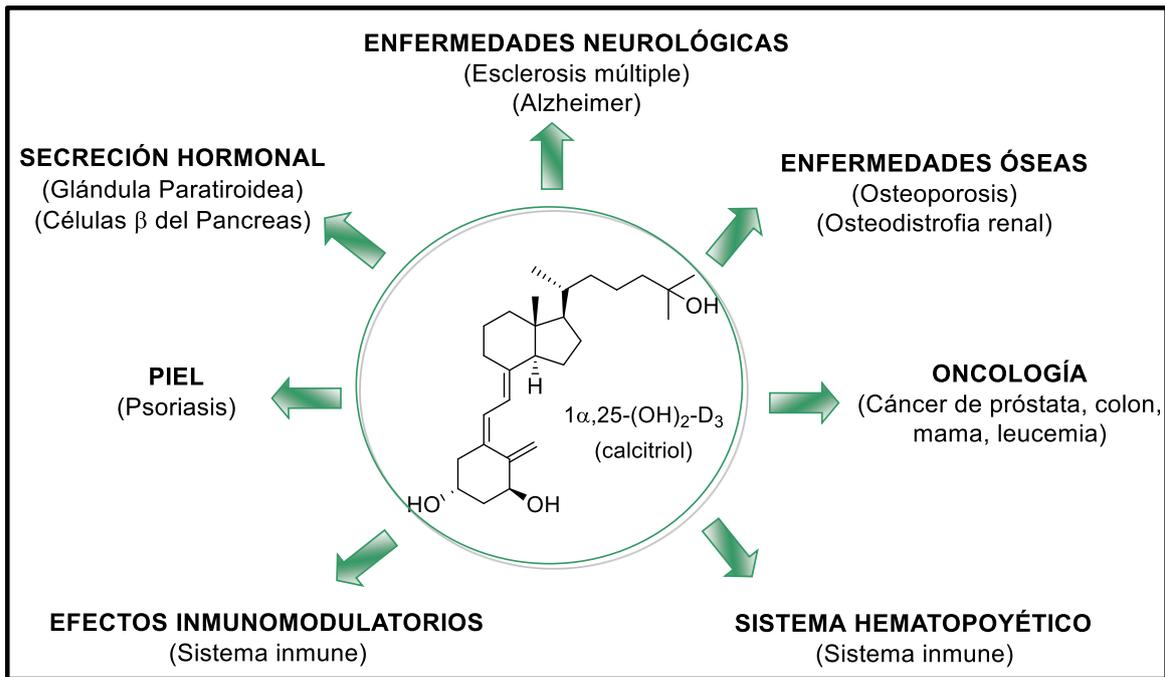
En la **Figura 12** se presenta un esquema de los mecanismos mediante los cuales el calcitriol puede inducir acciones genómicas y no genómicas.



**Figura 12.** Acciones genómica y no genómica ejercidas por el calcitriol. Tomado y adaptado de Mizwicki y Norman, 2009 [66].

### 1.7- Funciones biológicas del calcitriol

En relación a su actividad biológica, el calcitriol actúa como una hormona esteroidal en varios tejidos blanco, en lo que se conoce como el sistema endócrino de la vitamina D [67]. El calcitriol es un componente esencial de las interacciones entre los riñones, el hueso, las glándulas paratiroides y el intestino, que mantiene los niveles de calcio y fósforo dentro de límites estrechos con el fin de mantener su homeostasis. Además de estas funciones clásicas, el calcitriol presenta acciones no clásicas (**Figura 13**) que explican su relación con patologías autoinmunes, cardiovasculares, neurológicas, infecciosas, diabetes, anomalías óseas y cáncer [34,68,69].



**Figura 13.** Relación entre las múltiples funciones de la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D $_3$  y sus aplicaciones terapéuticas.

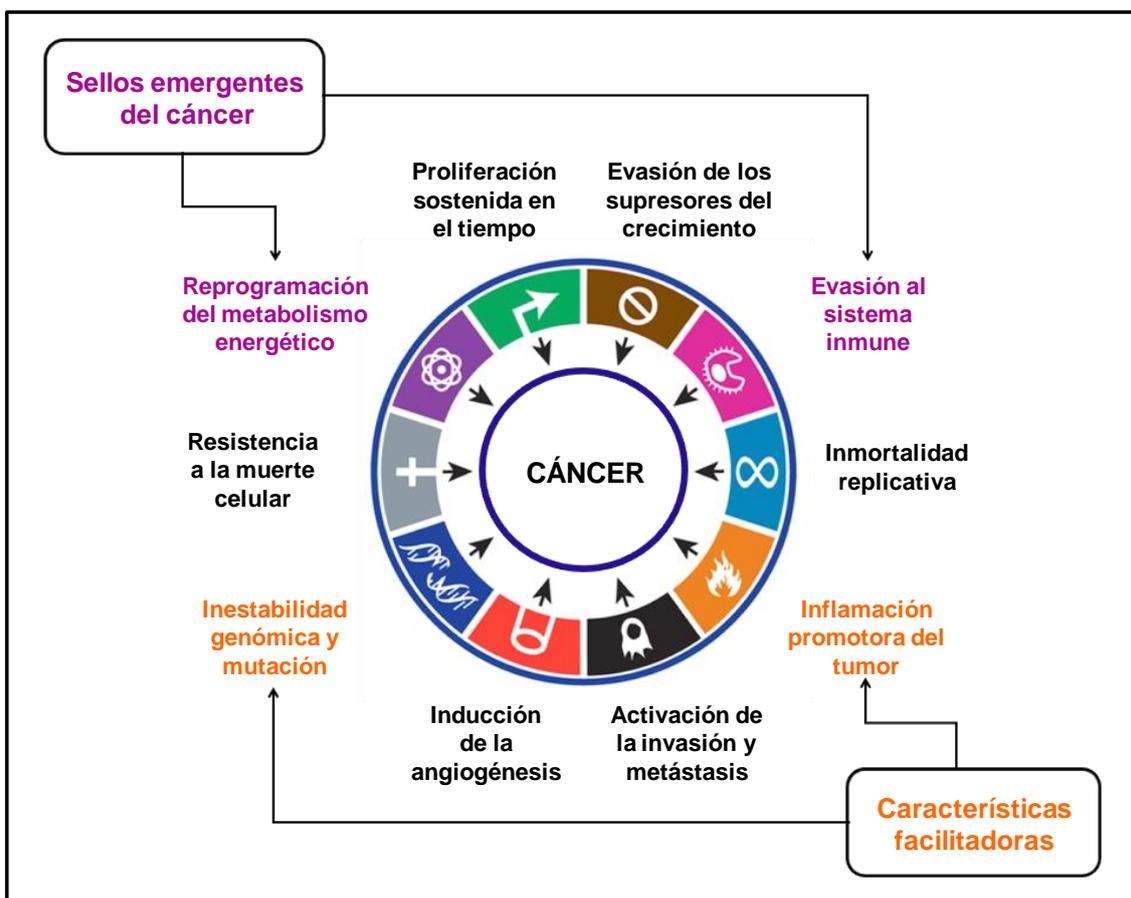
## 2- Cáncer

### 2.1- Generalidades

El término genérico “cáncer” designa un amplio y complejo grupo de enfermedades que pueden originarse prácticamente en cualquier parte del organismo. A grandes rasgos, se puede decir que el cáncer es el crecimiento anormal de células que tienden a proliferar descontroladamente y, en algunos casos, metastatizar (National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (on line), 2016).

Existen más de 100 tipos diferentes de cáncer, denominados generalmente en función al órgano o tejido en el cual se desarrollan (National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (on line), 2016). Pese a la diversidad y complejidad de esta enfermedad se han podido establecer los principios generales que gobiernan la transformación de una célula normal en una maligna. La célula va adquiriendo una serie de capacidades biológicas distintivas y complementarias, conocidas como sellos o “hallmarks” del cáncer, que le permiten establecer un tumor y diseminarse metastásicamente [70,71]. Originalmente, se describieron seis capacidades adquiridas (**Figura 14**): i) activación y mantenimiento de señales proliferativas, ii) evasión de

señales supresoras del crecimiento, iii) resistencia a la muerte celular, iv) inmortalidad replicativa, v) inducción de angiogénesis y vi) activación de mecanismos de invasión y metástasis [70]. Posteriormente, se propuso la incorporación de dos nuevas capacidades a la lista de los seis sellos del cáncer: vii) la reprogramación del metabolismo energético, necesaria para soportar la continua proliferación celular y, viii) la evasión ante el ataque y destrucción por parte del sistema inmune, mediante la activación de mecanismos de escape inmunológico [71]. Estas dos últimas capacidades se las reconoce como los sellos emergentes del cáncer dado que fueron incorporadas con posterioridad a la lista de los sellos del cáncer (**Figura 14**).



**Figura 14.** Los “sellos” del cáncer. Las seis capacidades distintivas adquiridas por las células neoplásicas originalmente propuestas en el año 2000, junto a las dos capacidades emergentes y las dos características facilitadoras propuestas en el año 2011. Tomado y adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011 [71].

Además, existen dos características facilitadoras de la adquisición de los ocho sellos del cáncer (**Figura 14**). Una de ellas es la inestabilidad genómica y la mutación de las células neoplásicas, fuente creadora de las variantes genéticas responsables de producir

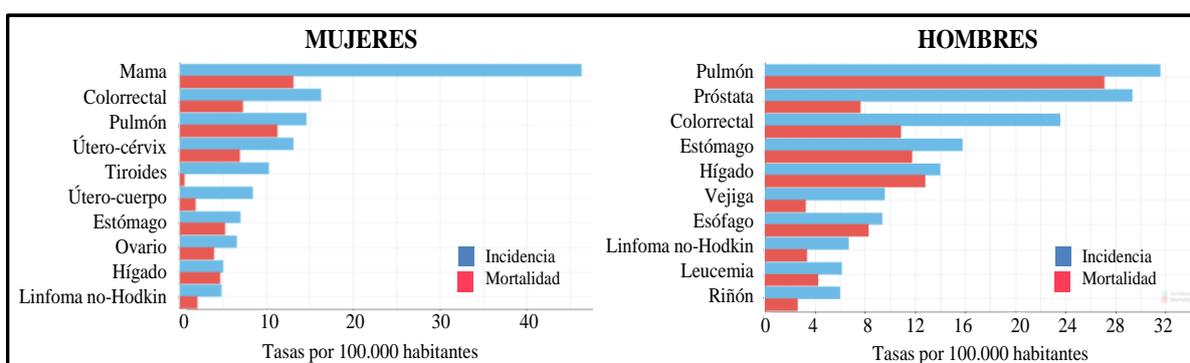
las distintas capacidades. La segunda característica facilitadora es la inflamación, estado que suplementa al microambiente tumoral con moléculas bioactivas: factores de crecimiento, de supervivencia, pro-angiogénicos, entre otros; que promueven la adquisición de los sellos del cáncer [71].

## 2.2- Epidemiología

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, del inglés International Agency for Research on Cancer) en su proyecto GLOBOCAN 2020 [72], establece una evaluación integral de la carga del cáncer en todo el mundo, basada en las estimaciones de GLOBOCAN de incidencia, mortalidad y prevalencia para el año 2020 en 185 países o territorios para 36 tipos de cáncer por sexo y grupo de edad.

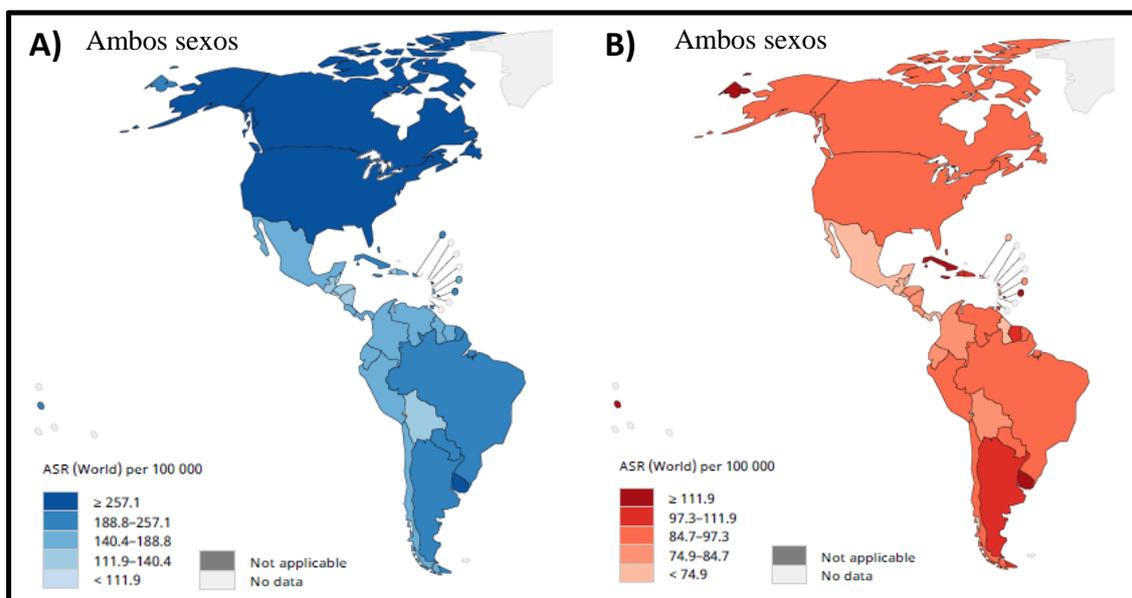
Se estima que a nivel mundial durante el año 2020 se han producido 19,3 millones de casos nuevos de cáncer; 9,95 millones de muertes por cáncer y que al menos 43,8 millones de personas viven con cáncer, dentro de los 5 años del diagnóstico de la enfermedad.

Los datos de incidencia y mortalidad que se poseen para realizar las estadísticas dependen de la disponibilidad y de la calidad de la información recogida o aportada por los diferentes países a los registros de cáncer poblacionales. Así, al evaluar la incidencia y mortalidad mundial en función a los distintos tipos de cáncer (**Figura 15**) se observa que en las mujeres, el tipo de cáncer que se diagnostica con mayor frecuencia, y que a su vez es la principal causa de muerte por cáncer, es el cáncer de mama. En el caso de los hombres, el cáncer de pulmón es el que presenta la mayor incidencia y mortalidad [72].



**Figura 15.** Tasas mundiales estimadas por la IARC de incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres y hombres ajustadas por edad. Número de nuevos casos o muertes estimadas por cada 100.000 habitantes durante el año 2020. Proyecto GLOBOCAN 2020. Tomado y adaptado de <https://gco.iarc.fr>

La Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media - alta (218,2 x 100.000 habitantes) (**Figura 16A**), y mortalidad media - alta (106,1 x 100.000 habitantes) (**Figura 16B**), de acuerdo a las estimaciones obtenidas por la IARC para el año 2020.

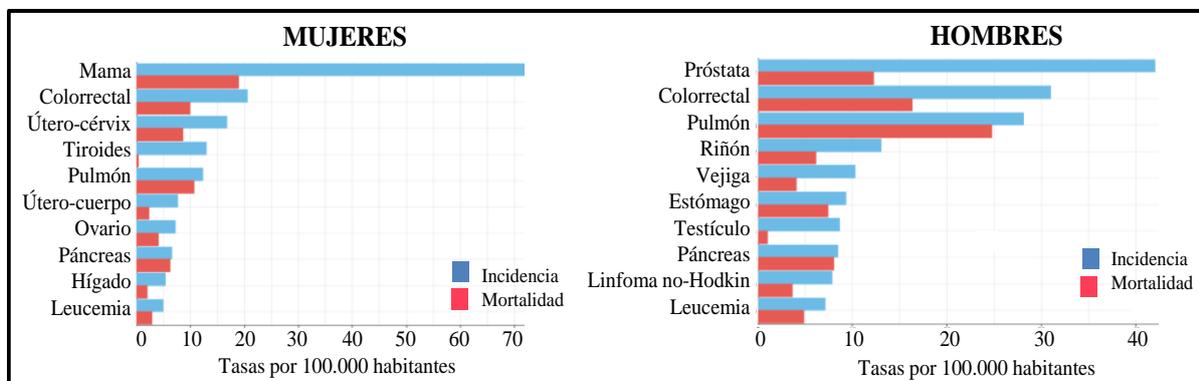


**Figura 16 A)** Incidencia y **B)** mortalidad de cáncer mundial en el año 2020. Tasas estandarizadas por cada 100.000 habitantes durante el año 2020. Proyecto GLOBOCAN 2020. Tomado y adaptado de <https://geo.iarc.fr>

Al igual que a nivel mundial, en la población femenina de Argentina el tipo de cáncer que presenta la mayor incidencia (alejándose notablemente del resto) es el cáncer de mama, con una tasa estimada de 73,1 casos nuevos por cada 100.000 mujeres durante el año 2020 (**Figura 17**). El cáncer de mama también es el principal responsable de muerte por cáncer entre las mujeres de nuestro país (18,9/100.000 habitantes). En cuanto a la incidencia, en segundo y tercer lugar lo ocupan el cáncer colorrectal (20,6/100.000 habitantes) y el cáncer de cuello de útero (16,7/100.000 habitantes), respectivamente. En relación a la mortalidad, el segundo lugar lo ocupan el cáncer de pulmón (10,7/100.000 habitantes) y el tercer lugar el cáncer colorrectal (9,9/100.000 habitantes).

En la población masculina de Argentina, la mayor tasa de incidencia corresponde al cáncer de próstata (42/100.000 habitantes), luego le siguen el cáncer colorrectal (31/100.000 habitantes) y en tercer lugar el cáncer de pulmón (28,1/100.000 habitantes). En cuanto a las tasas de mortalidad, el cáncer de pulmón es el de mayor mortalidad

(24,8/100.000 habitantes), luego se encuentra el cáncer colorrectal (16,3/100.000 habitantes) y en tercer lugar el cáncer de próstata (12,2/100.000 habitantes) [72] (**Figura 17**).



**Figura 17.** Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad para mujeres y hombres en Argentina estimadas por la IARC. Número de nuevos casos o muertes estimadas por cada 100.000 habitantes durante el año 2020. Proyecto GLOBOCAN 2020. Tomado y adaptado de <https://gco.iarc.fr>

### 3- El sistema hormonal de la vitamina D<sub>3</sub> y su relación con el cáncer

#### 3.1- Efectos del calcitriol sobre los sellos distintivos del cáncer

Ensayos preclínicos llevados a cabo en líneas celulares y modelos animales de cáncer, permitieron demostrar las diferentes acciones antitumorales del calcitriol. A continuación, se describen los principales efectos del metabolito activo sobre los sellos distintivos del cáncer.

##### 3.1.1- Calcitriol y sus efectos sobre la proliferación celular

La proliferación celular requiere el paso de las células a través de una secuencia de eventos que conducen a su replicación. Este proceso se encuentra estrictamente regulado en células normales y su descontrol puede resultar en eventos patológicos como el cáncer. De hecho, la progresión del ciclo celular está regulada por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La actividad catalítica de las CDKs, a su vez, está controlada por Inhibidores de CDKs (CKIs), tales como los miembros de la familia Cip/Kip, también conocidos como genes supresores de tumores.

El efecto del calcitriol sobre la proliferación celular fue inicialmente descrito en células de melanoma [73] y a partir de ese reporte, muchos otros trabajos han descrito efectos anti-proliferativos de la hormona, no solo en células tumorales sino también en células no malignas [32,74-77]. El calcitriol inhibe la proliferación celular utilizando diferentes mecanismos que dependen del tipo celular y su contexto [32,78-84].

### **3.1.2- Calcitriol y sus efectos sobre la diferenciación celular**

Abe y colaboradores, fueron los primeros investigadores en demostrar una relación entre el calcitriol y la inducción de la diferenciación celular, en células de leucemia mieloide [85]. Luego se estableció que el calcitriol era una hormona pro-diferenciante capaz de regular la actividad de más de 60 genes implicados en el proceso de diferenciación. Por ejemplo, el calcitriol y algunos de sus análogos no hipercalcemiantes promueven en el carcinoma de colon, la diferenciación mediante la inducción de la expresión de proteínas de adhesión, tales como E-cadherina, ocludina y vinculina [79,86]. Estos efectos son potencialmente terapéuticos ya que las proteínas de adhesión mantienen la unión celular favoreciendo la integridad del tejido mientras que su supresión se asocia con la pérdida de inhibición por contacto, la tumorigénesis y metástasis. También se determinaron los efectos pro-diferenciantes del calcitriol en células de cáncer de mama que carecen del receptor de estrógeno  $\alpha$  (RE $\alpha$ ). En este caso, el calcitriol fue capaz de inducir la expresión de un RE $\alpha$  funcional actuando a través del VDR y de este modo, estimular la diferenciación e inhibición de la proliferación celular. La inducción del RE $\alpha$  por el calcitriol restauró la respuesta a fulvestrant y tamoxifeno, lo que permitió que estos compuestos ejerzan sus acciones antitumorales como lo hacen en las células que expresan este receptor [87]. Estos resultados son prometedores, ya que sugieren una alternativa terapéutica para aquellos pacientes afectados con tumores RE-negativos, mediante la mejora de su sensibilidad a la terapia hormonal.

### **3.1.3- Calcitriol y sus efectos sobre la muerte celular**

Además de los efectos sobre la proliferación y diferenciación celular, el calcitriol puede inducir apoptosis (muerte celular genéticamente programada) en células de distintos tumores [88-90].

El calcitriol es capaz de modular los mediadores de la apoptosis por diversos mecanismos que favorecen la eliminación de las células malignas. De hecho, el

calcitriol reprime la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (del inglés B-cell lymphoma 2) y Bcl-X<sub>L</sub> (del inglés B-cell lymphoma extra large), y estimula la de las proteínas pro-apoptóticas Bax, Bak y Bad en diversas células del cáncer [77,91,92]. Específicamente, se ha descrito que la proteína antiapoptótica Bcl-2 disminuye en respuesta al tratamiento con la hormona en cáncer de próstata [90], leucemias B crónicas [88], células de retinoblastoma [89] y en la línea MCF-7 de adenocarcinoma mamario [93], conduciendo a un incremento de la apoptosis. En líneas de cáncer de mama invasivo la reducción de Bcl-2 se acompaña de un incremento de Bax y de la liberación del citocromo c seguido del clivaje de PARP [94]. Además, el calcitriol induce la activación directa de las caspasas efectoras [58], ya sea solo o en combinación con fármacos quimioterapéuticos convencionales, tales como la gemcitabina, comúnmente utilizado para tratar el cáncer de páncreas [95]. En el mismo sentido, en cáncer de mama con expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), se demostró un efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico sinérgico entre el gefitinib y el calcitriol o algunos de sus análogos sintéticos. La inducción de la apoptosis fue mediada por la estimulación de las proteínas pro-apoptóticas BIM y la activación de la caspasa 3 [96].

El calcitriol también puede inducir apoptosis por aumento de la concentración de calcio intracelular, la liberación del citocromo c mitocondrial y la reducción de glutatión intracelular [97-99]. Como es sabido, el glutatión es un antioxidante que protege a las células de las ROS (del inglés Reactive Oxygen Species), por lo tanto, la reducción de glutatión producida por calcitriol favorece la apoptosis.

Además, los efectos del calcitriol pueden ser potenciados cuando se combina este metabolito con otras hormonas. En este sentido, se observó que la incubación de células de cáncer de endometrio con progesterona y calcitriol produjo una sobre-expresión de Bax y otras proteínas pro-apoptóticas, conduciendo a inhibición del crecimiento de las células mediante la inducción de la apoptosis y arresto en el ciclo celular [100].

### **3.1.4- Calcitriol y sus efectos sobre la angiogénesis y la metástasis**

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente, evento crucial para el continuo crecimiento, progresión y metástasis de los tumores [71]. Las células tumorales adquieren la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos con el objeto de garantizarse un adecuado suministro de nutrientes y oxígeno, poder invadir el sistema circulatorio y metastatizar en lugares

distantes. La neoangiogénesis es una de las características menos deseables en el paciente con cáncer ya que sugiere un mal pronóstico. Este proceso se activa cuando los factores pro-angiogénicos superan a los factores anti-angiogénicos, cuya producción puede estar regulada por oncogenes y genes supresores de tumores. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), quien a su vez estimula a las células endoteliales de los vasos adyacentes, es considerado como el principal factor pro-angiogénico, mientras la trombospondina-1 (TSP-1) es reconocida como una importante molécula anti-angiogénica [101,102]. Se han descrito múltiples trabajos que evidencian al calcitriol como inhibidor de la angiogénesis tanto en líneas celulares como modelos animales de cáncer [103-106].

### **3.1.5- Calcitriol y sus efectos anti-inflamatorios e inmunomoduladores**

La inflamación crónica de los tejidos contribuye al desarrollo y a la progresión de muchos tipos de cáncer [107-109], y se ha descrito como una de las características facilitadoras de la progresión tumoral que favorece a que las células tumorales adquieran los sellos distintivos del cáncer [71].

Los mediadores de la inflamación tales como las citoquinas, quemoquinas, prostaglandinas (PGs), ROS y especies reactivas de nitrógeno favorecen la tumorigénesis a través de la activación de múltiples vías de señalización [107,108]. Como es sabido, el funcionamiento del sistema inmune está estrechamente relacionado con el proceso inflamatorio. En este sentido, varios componentes celulares de la respuesta inflamatoria como los macrófagos, especialmente los asociados al tumor, y los linfocitos T y B intervienen en la progresión tumoral. Se ha demostrado que el calcitriol ejerce efectos inmunosupresores al inhibir la activación de los linfocitos T efectores, la producción de citoquinas por parte de estos y al estimular a los linfocitos T reguladores [110].

### **3.2- Calcitriol y ensayos clínicos**

Tal como se describió anteriormente, el cáncer es una enfermedad heterogénea y la heterogeneidad puede deberse a variaciones en el tipo de célula o distribución metabólica. Estos atributos intensifican su complejidad, desafían el tratamiento del cáncer con un único método terapéutico y allanan el camino para el desarrollo de terapias combinadas [111].

De acuerdo a la evidencia ya mencionada, los numerosos ensayos preclínicos realizados llevaron a demostrar que la vitamina D y sus análogos tienen importantes efectos sobre la progresión del cáncer, al modular los procesos críticos de proliferación, muerte celular, diferenciación, inflamación, angiogénesis y metástasis. De este modo, en base a la abundante evidencia de la acción antitumoral de la vitamina D y sus metabolitos, y desde que el calcitriol fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) para el tratamiento de la enfermedad renal crónica y del hipoparatiroidismo, se han llevado a cabo diferentes ensayos clínicos para evaluar los efectos de estos compuestos, ya sea solos o en combinación con otras drogas, en la prevención o tratamiento de distintos tipos de cáncer [34,112].

Los primeros estudios clínicos fueron realizados en pacientes con síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda [113,114]. Un régimen diario de calcitriol combinado con otras drogas logró los efectos pro-diferenciantes buscados sobre las células sanguíneas y una remisión prolongada de la enfermedad, aunque también se observó hipercalcemia como efecto secundario en el 10-30 % de los pacientes. Otros ensayos clínicos realizados mostraron ausencia de efecto [115] mientras que otros tuvieron un éxito limitado [116,117]. En base a esto último, en un ensayo piloto se administró una dosis diaria de calcitriol por vía oral de 1,5 - 2,5 µg y si bien se observó que los niveles de antígeno prostático específico (PSA) de los pacientes se estabilizaron, no se logró una reducción de los mismos [118]. Teniendo en cuenta este antecedente, se realizaron ensayos clínicos posteriores administrándose dosis orales más elevadas e intermitentes de calcitriol en combinación con docetaxel y dexametasona en pacientes con cáncer de próstata metastático, utilizando la composición de calcitriol DN-101 de Novacea. Tampoco en este caso se obtuvieron los efectos esperados: el ensayo clínico de fase III con 1.200 pacientes (ASCENT-2) resultó en una disminución de la sobrevida total con respecto al grupo control, detectándose además hipercalcemia [112,119]. Por otro lado, un estudio reciente demostró que aquellos pacientes con cáncer colorrectal en estadio II o III que se les administraba por vía oral, una co-suplementación de vitamina D (50.000 UI/semanales) y ácidos grasos omega-3 (660 mg/diarios) durante 8 semanas tuvieron efectos beneficiosos sobre los marcadores del estado inflamatorio y nutricional [120].

Las formulaciones farmacéuticas del calcitriol han demostrado ser inadecuadas para el tratamiento contra el cáncer dado que no poseen una buena biodisponibilidad, presentan una gran variabilidad en cuanto a los niveles séricos alcanzados entre los

distintos pacientes [112,121] y provocan efectos secundarios tóxicos [122-124]. Además, los resultados obtenidos en los ensayos clínicos en los que se ha testeado el efecto terapéutico de la vitamina D y sus metabolitos en pacientes con cáncer han sido analizados por diferentes autores y muchos de estos estudios han sido criticados por presentar fallas en el diseño de los mismos. Asimismo, se han generado preguntas que aún continúan sin respuesta, tales como, ¿Cuál es la forma óptima de administración de la vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol o calcitriol)?, ¿Cuál es la concentración de calcidiol o calcitriol sanguínea necesaria para obtener los efectos terapéuticos?, ¿Cuál es el mejor régimen de tratamiento (continuo o intermitente)?, ¿Cuál es la combinación óptima de drogas a utilizar?, ¿En qué momento de la enfermedad comenzar el tratamiento?, ¿Cuáles son las características necesarias de la población en estudio? Estas cuestiones todavía no resueltas y que por lo tanto requieren continuar con las investigaciones no permiten descartar totalmente al calcitriol como agente terapéutico en al menos algunos tipos particulares de cáncer.

Para tratar de evitar los efectos colaterales del tratamiento del cáncer con calcitriol, especialmente la hipercalcemia, se están desarrollado dos estrategias: 1) la combinación de acciones del calcitriol con otras drogas y, 2) la síntesis de análogos de calcitriol con capacidad terapéutica comparable o superior, pero con menores efectos tóxicos secundarios.

En cuanto a la primera estrategia, algunos de los ensayos clínicos que se están realizando con calcitriol pueden encontrarse en la página web del Instituto Nacional del Cáncer (Institutos Nacionales de Salud, USA):

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&term=calcitriol&cntry=&state=&city=&dist=>

Estos ensayos clínicos combinados de calcitriol y compuestos no citotóxicos, tales como glucocorticoides o taxanos [125], han demostrado lograr mejores resultados al disminuir la hipercalcemia. Por ejemplo, un ensayo clínico de fase II con pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas tratados con calcitriol, dexametasona y cisplatino mostró una estabilización de la enfermedad sin observarse hipercalcemia como efecto colateral [126].

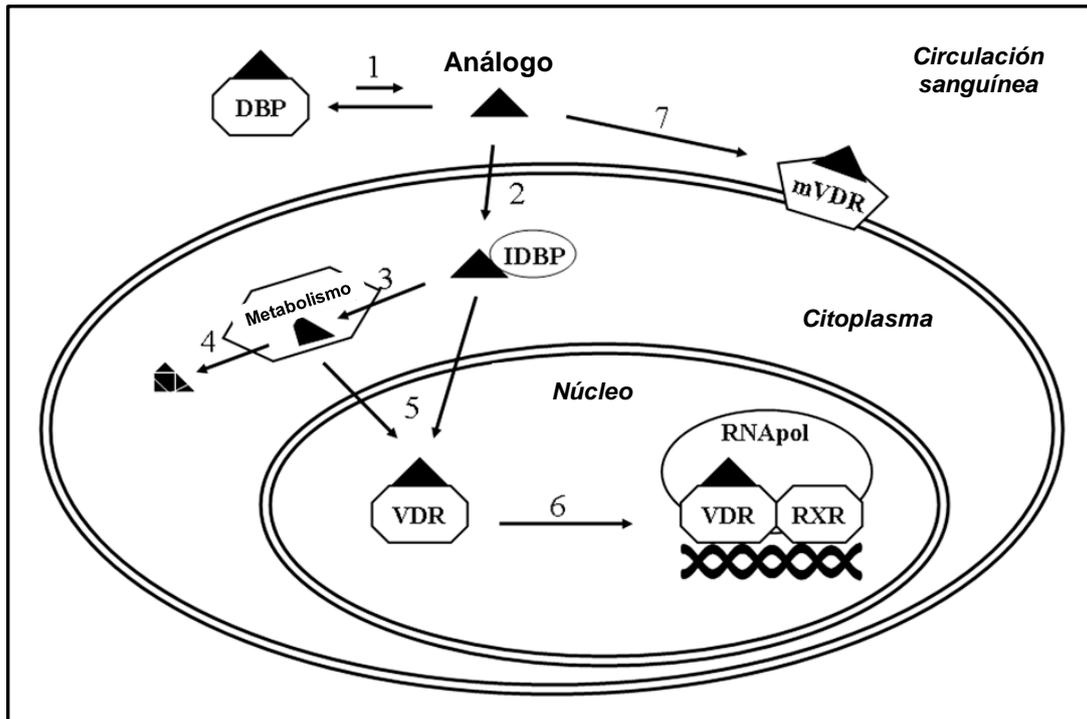
A continuación, se describe la segunda estrategia, es decir, aquella que plantea la síntesis y utilización de análogos del calcitriol con fines antitumorales, y algunos de los resultados obtenidos hasta el momento.

#### 4- Análogos del calcitriol

La búsqueda racional de compuestos que conserven o aumenten las características antitumorales del calcitriol pero que carezcan de la actividad hipercalcemiente, ha sido objeto de numerosas investigaciones desde hace décadas. Tal es así, que el metabolito natural ha sufrido modificaciones en cada una de las partes de la molécula, siendo la cadena lateral, y en menor medida el anillo A, los principales sitios donde se han realizado estas modificaciones.

Varios de estos análogos han sido probados en ensayos preclínicos obteniéndose, en ciertos casos, resultados promisorios [124,127-129]. Sin embargo, la respuesta antitumoral varía considerablemente de acuerdo al análogo, al tipo celular y al tipo de cáncer. Se han sugerido diversas explicaciones para estas respuestas diferenciales: una interacción diferente de cada análogo con la proteína transportadora DBP, o con el receptor VDR nuclear y de membrana, un reclutamiento de diferentes co-moduladores transcripcionales que lleven a reprimir o estimular la expresión de los genes diana en forma particular, o diferencias en el catabolismo de los compuestos.

Las modificaciones estructurales en los análogos del calcitriol pueden afectar esas interacciones y, en última instancia, la actividad biológica de dichos compuestos, explicando en algunos casos los efectos diferenciales observados. La **Figura 18** ilustra los potenciales eventos por los cuales se podría explicar la variabilidad de respuestas producidas por los análogos de vitamina D.



**Figura 18.** Esta figura muestra etapas del mecanismo de acción del calcitriol que pueden ser responsables de la variabilidad observada en la acción biológica de sus análogos. 1) Unión del análogo a la DBP sérica, 2) Ingreso a la célula, 3) Interacción con proteínas de unión a calcitriol intracelulares (IDBPs), 4) Conversión mitocondrial a metabolitos activos o inactivación catabólica, 5) Interacción con el VDR nuclear, 6) Cambios conformacionales que promueven la interacción con el RXR, DNA y co-moduladores que regulan la transcripción génica, 7) Vía de activación no genómica a través del VDR de membrana. Tomado de Brown y Slatopolsky, 2008 [130].

Se ha reportado que la afinidad de los análogos por la proteína DBP puede influir en su actividad biológica. Los compuestos con mayor afinidad por la DBP que el calcitriol presentan una mayor vida media circulante. Se ha descrito que análogos con baja afinidad por la DBP y alta por el VDR presentan propiedades antitumorales con menores efectos sobre la homeostasis del calcio, debido en parte, a una alteración en la farmacocinética del compuesto [131,132]. Además, dado que la actividad biológica de los derivados de la vitamina D se encuentra frecuentemente mediada por el VDR, un requerimiento fundamental es que los análogos retengan una significativa afinidad por el mismo [129]. A su vez, dicha interacción con el VDR puede conducir al reclutamiento de un conjunto particular de cofactores transcripcionales que conduzcan a reprimir o estimular la expresión de los genes diana en forma diferencial. Los estudios computacionales de las diferentes conformaciones adoptadas por el VDR unido a estos

ligandos permitieron dilucidar que el LBD-VDR puede acomodar a gran cantidad de moléculas, dando lugar a ligeras diferencias en la conformación de VDR, que a su vez pueden influir en la interacción con los co-activadores y co-represores que median la transcripción por el VDR activado [133,134].

Asimismo, el catabolismo diferencial de los análogos también puede jugar un papel muy importante en la variabilidad de la actividad biológica presentada por los mismos. En este sentido, se han diseñado racionalmente algunos análogos que poseen insaturaciones dobles y/o triples, y presentan resistencia a su catabolismo [135-137], el cual ocurre principalmente por la acción de la enzima 24-hidroxilasa [138]. Es por ello, que la síntesis de nuevos análogos con estas características resulta fundamental para su utilización en tipos celulares que poseen una alta expresión de la enzima 24-hidroxilasa.

#### **4.1- Síntesis de análogos de la vitamina D**

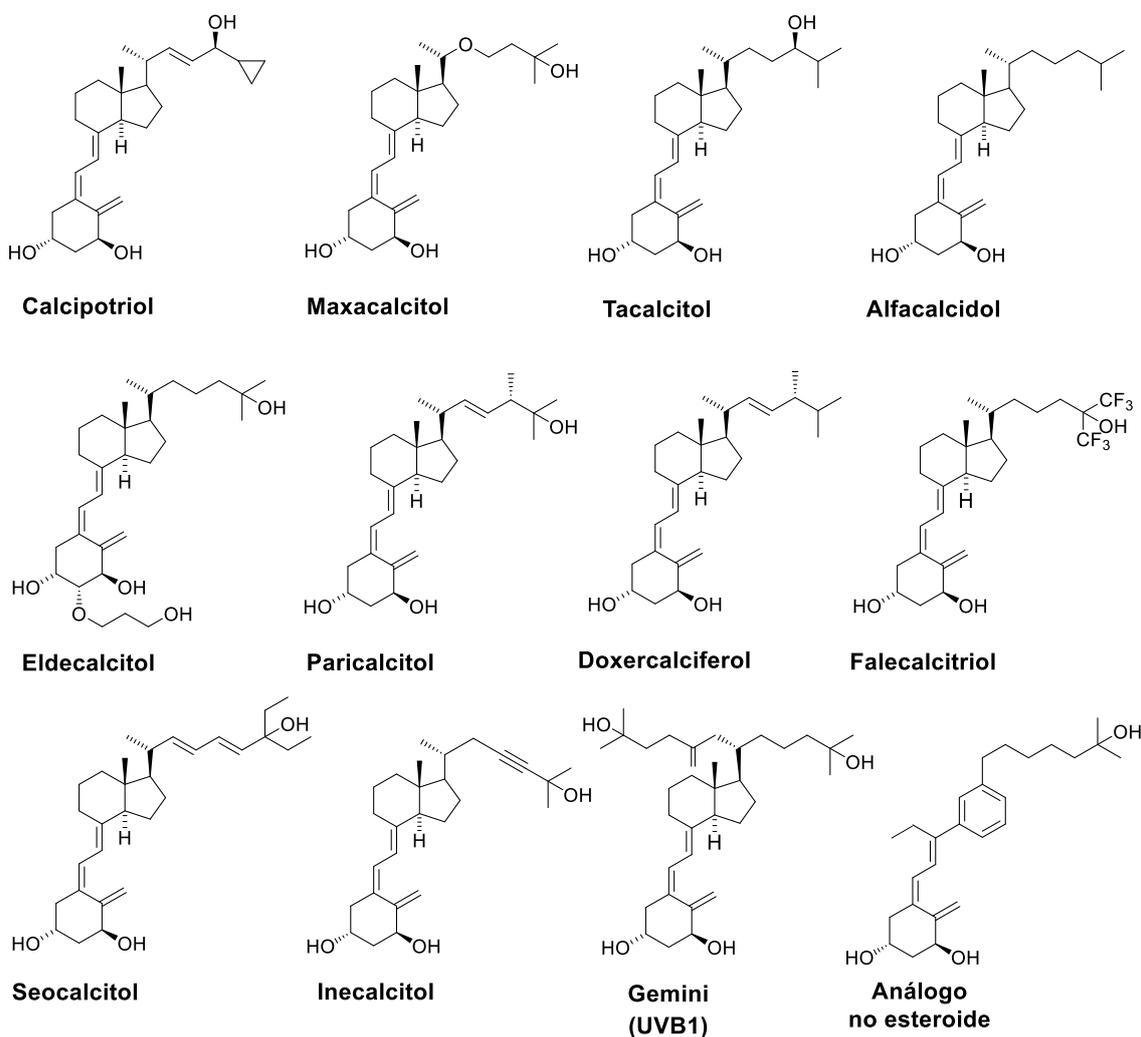
Como se describió anteriormente, el uso terapéutico del calcitriol a las dosis efectivas se ha visto limitado por sus efectos hipercalcemiantes. El descubrimiento de las funciones no clásicas de la hormona, estimuló la síntesis de nuevos análogos de vitamina D que presenten iguales o mayores efectos biológicos pero que carezcan de la actividad hipercalcemiante [139,140].

La historia de la búsqueda de análogos de la vitamina D y su uso como productos farmacéuticos puede dividirse en tres generaciones (**Figura 19**):

- 1) La primera generación de análogos de vitamina D, son los que se usan como agentes calcémicos que evitan la hipocalcemia y las anomalías óseas. Inicialmente se utilizaron para paliar los efectos causados por estados carenciales de vitamina D. Entre los análogos que más destacan se encuentran: Doxercalciferol ( $1\alpha$ -hidroxi-vitamina  $D_2$ ), Alfacalcidol ( $1\alpha$ -hidroxi vitamina  $D_3$ ), Tacalcitol ( $1\alpha,24$ -dihidroxitamina  $D_3$ ) y Falecalcitriol ( $1\alpha,25$ -(OH) $_2$ -26,27-F $_6$ -vitamina  $D_3$ ).
- 2) La segunda generación surge a partir de la modificación de la estructura del calcitriol ( $1\alpha,25$ (OH) $_2$ -vitamina  $D_3$ ) con el fin de encontrar análogos que posean una elevada capacidad de diferenciación celular y una baja acción calciotrópica. En esta línea se incluyen el Calcipotriol o MC903 (PRI-2201; 22-ene-26,27-dehidro- $1\alpha,25$ (OH) $_2D_3$ ), Maxacalcitol ( $1\alpha,25$ -dihidroxi-22-oxacalcitriol) y Tacalcitriol que se utilizan para el tratamiento de la psoriasis. El Alfacalcidol y Eldecalcitol o ED-71 ( $2\beta$ -(3-hidroxiopropoxi)- $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ ) para el tratamiento de la osteoporosis. El Paricalcitol ( $19$ -nor- $1\alpha$  -25-dihidroxitamina  $D_2$ ), Doxercalciferol y Falecalcitriol para

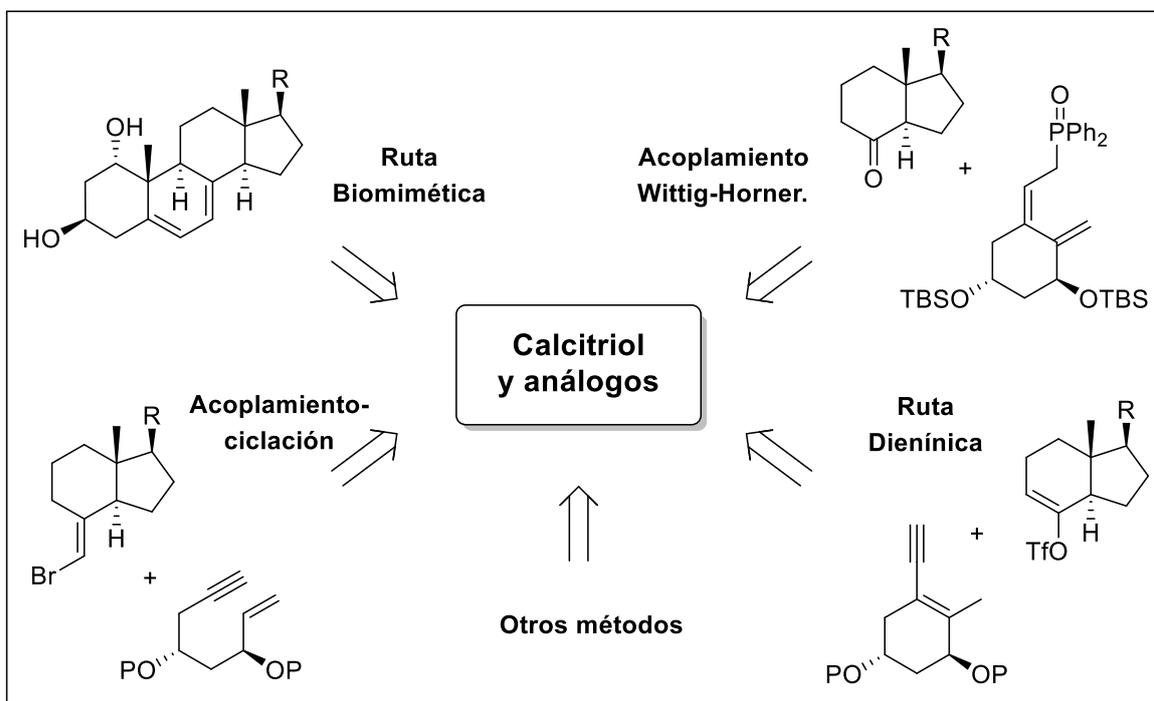
el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario. Y por último, el Seocalcitol o EB1089 (22,24-dieno-24,26,27-trishomo-1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ ), Inecalcitol o TX-522 (19-nor-14-epi-23-yne-1,25-(OH) $_2$ D $_3$ ) y Calcipotriol para el tratamiento del cáncer, entre otros.

3) La tercera generación de análogos surgió más recientemente y son compuestos que se diferencian notablemente en su estructura respecto a la de la hormona 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -vitamina D $_3$ . Así, surgen los análogos Gemini, que presentan una segunda cadena lateral unida a C20 y los análogos no esteroideos, entre los que se incluyen aquellos con modificaciones drásticas del biciclo CD.



**Figura 19.** Ejemplos de análogos de vitamina D en distintas generaciones de productos farmacéuticos.

Con el objetivo de acceder de un modo rápido y versátil, tanto a los metabolitos de la vitamina D, como a una gran variedad de análogos, se han desarrollado diversas rutas sintéticas [141-143].



**Figura 20.** Principales rutas sintéticas utilizadas para acceder al calcitriol y sus análogos.

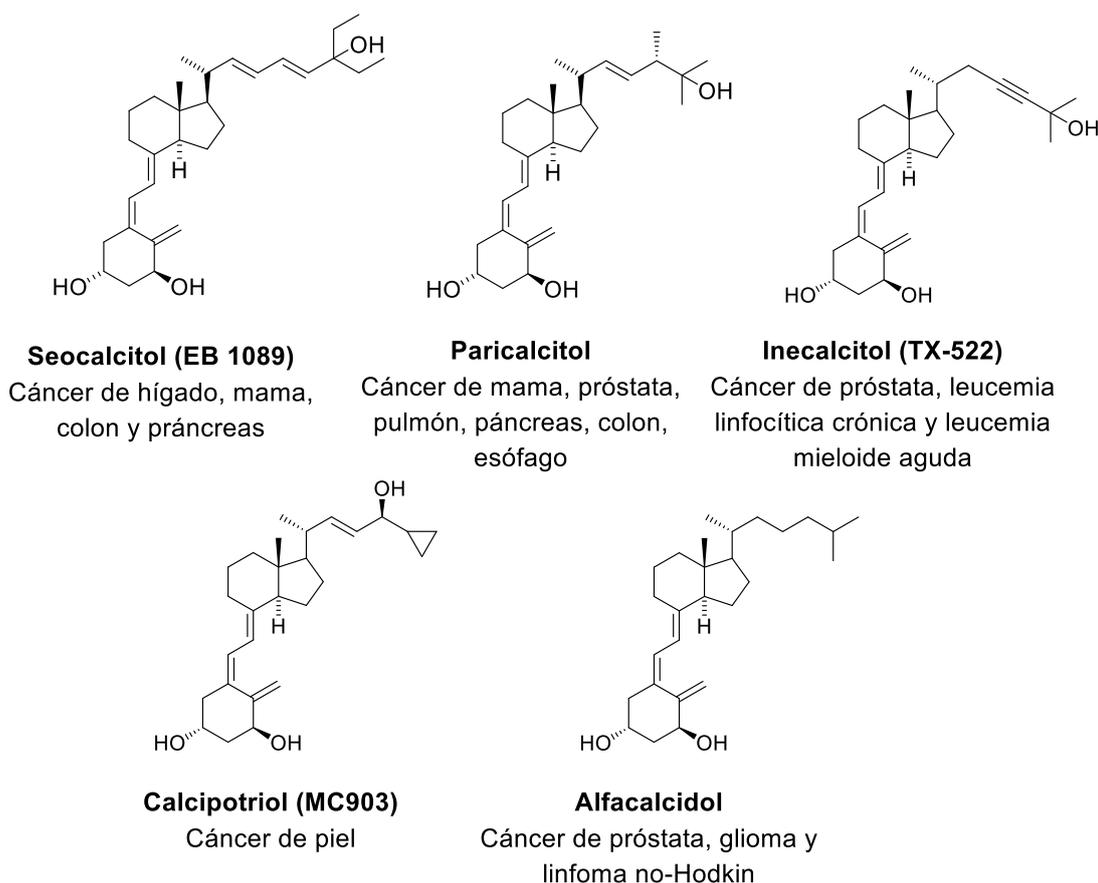
En la **Figura 20** se muestran las principales estrategias utilizadas para la obtención de los mismos. La mayoría de estas metodologías se caracterizan por ser rutas convergentes que permiten introducir las modificaciones mencionadas, y finalmente abordar la construcción del sistema triénico en las últimas etapas de síntesis, mediante el acoplamiento de las subunidades funcionalizadas: biciclo CD-cadena lateral con el anillo A. Esto permite obtener una amplia variedad de análogos de la vitamina D y sus metabolitos.

#### 4.2- Análogos del calcitriol y ensayos clínicos

Varios análogos del calcitriol han sido evaluados en ensayos preclínicos demostrando resultados prometedores. Además, algunos de ellos han sido evaluados en ensayos clínicos, ya sea en forma individual o en combinación con los tratamientos terapéuticos establecidos para cada paciente (quimioterapia, radioterapia, etc.). Sin

embargo, un mismo análogo puede tener efectos diversos en distintos tipos de cáncer y es necesario realizar los estudios en cada caso para poder definir su utilidad terapéutica.

En la **Figura 21** se muestran los análogos evaluados en ensayos clínicos con pacientes. Sin embargo, en algunos casos se encontraron efectos secundarios adversos, principalmente hipercalcemia.



**Figura 21.** Análogos del calcitriol empleados en tratamientos clínicos de cáncer.

El análogo seocalcitol o EB1089 (22,24-dieno-24,26,27-trishomo-1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ ), fue testeado en estudios de fase I y II, y los resultados fueron variados. El análogo presentó resultados alentadores en estudios de fase II en pacientes con carcinoma hepatocelular [115,144]; sin embargo, no logró reproducir la respuesta antitumoral en estudios de fase I en pacientes con cáncer de mama, colorrectal y pancreático [144-146]. En ambos estudios, se observó hipercalcemia en todos los pacientes que recibieron la dosis más alta de EB1089 (tratamiento prolongado con > 17,5  $\mu$ g m $^{-2}$  por día). Sin

embargo, la hipercalcemia era reversible mediante la interrupción o disminución de la dosis del fármaco. La mayoría de los pacientes, toleraron una dosis de 10 µg/día [144].

El paricalcitol (19-nor-1-alfa-25-dihidroxitamina D<sub>2</sub>), fue testeado en estudios de fase I y II en pacientes con cáncer de próstata avanzado. Se demostró que a pesar de que la droga fue bien tolerada, no hubo una respuesta antitumoral significativa [147]. Este mismo análogo administrado en forma oral en pacientes de carcinoma mamario metastásico también demostró ser bien tolerado [148]. Sin embargo, un estudio reciente de fase I, demostró que el paricalcitol se puede combinar de forma segura con gemcitabina vía intravenosa, en pacientes con distinto tipo de cáncer avanzado, en dosis de hasta 7 µg/kg semanalmente. En términos de eficacia antitumoral, la combinación resultó en una estabilización de la enfermedad en aproximadamente el 44% de los pacientes evaluados.

El inecalcitol o TX-522 (19-nor-14-epi-23-yne-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), fue evaluado en un estudio de fase I. El mismo, se administró por vía oral en combinación con docetaxel, a pacientes con cáncer de próstata avanzado. La combinación de tratamientos fue bien tolerada. Sin embargo, 2 de los 4 de pacientes que recibieron las concentraciones más altas (8 mg/día) presentaron hipercalcemia. A pesar de ello, los niveles de calcio volvieron a la normalidad después de suspender el tratamiento, y se encontró que la dosis máxima tolerada fue de 4000 µg/día. Este estudio produjo una tasa de respuesta del 85 % basado en una disminución del PSA a partir de los 3 meses de tratamiento, lo que sugiere una disminución en la carga tumoral [144,149]. Este compuesto también ha sido probado con éxito en un estudio de fase II en pacientes con leucemia linfocítica crónica en una dosis de 2 mg/día y como resultado, el 52 % de los pacientes experimentaron una estabilización o disminución del recuento de linfocitos leucémicos en sangre. En base a estos antecedentes prometedores, el inecalcitol en combinación con el fármaco citotóxico decitabina (5-aza-2'-desoxicidina) fue evaluado en un ensayo clínico de fase II en pacientes con leucemia mieloide aguda que no son aptos para recibir quimioterapia estándar (NCT02802267). Tanto la Agencia Europea de Medicamentos como la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos, otorgaron recientemente la designación del inecalcitol para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfocítica crónica [144].

El calcipotriol o MC903 (PRI-2201; 22-ene-26,27-dehidro-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) fue probado en pacientes con cáncer de mama avanzado con lesiones metastásicas en piel; 15 de 19 pacientes bajo tratamiento tópico en las lesiones cutáneas metastásicas (100

mg/día durante 6 semanas) tuvieron una reducción de 65%, 3 pacientes una reducción del 50%, mientras que una paciente mostró una respuesta mínima [150]. Cabe señalar que sólo 2 pacientes desarrollaron hipercalcemia durante el tratamiento. Por otra parte, un estudio reciente realizado en modelos animales con calcipotriol 0,005% en combinación con 5-fluorouracil (5-FU) 5% como un tratamiento tópico durante 2 veces por día y por un período de 4 días, demostró efectos sinérgicos y altamente eficaces de estas drogas en carcinogénesis cutánea [151]. En base a estos resultados prometedores, se realizaron estudios de calcipotriol en combinación con 5-fluorouracil (5-FU) como un tratamiento tópico corto en 64 pacientes con cáncer de piel durante 4 días [150,151]. Se demostró que se logró generar una reducción del 87,8% [156] y, además, los efectos sinérgicos de estas drogas redujeron el riesgo de padecer carcinoma celular escamoso 3 años después del tratamiento. Aun así, se necesitan más estudios para determinar la duración óptima del tratamiento para inducir un efecto quimiopreventivo [152].

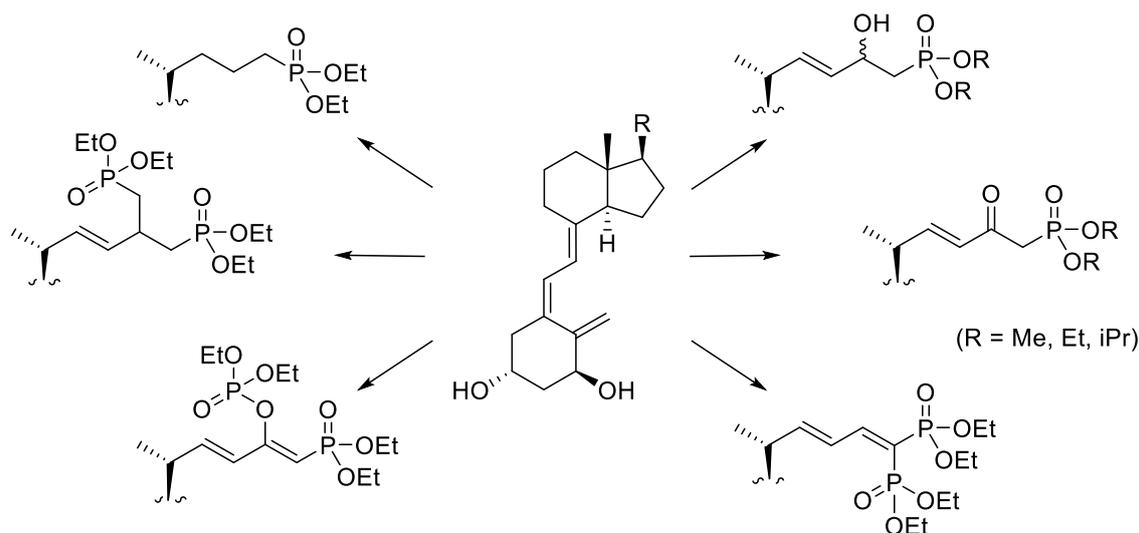
El alfacalcidol (1 $\alpha$ -hidroxi vitamina D<sub>3</sub>) ha sido probado en ensayos de fase I y II en pacientes con cáncer de próstata, ya sea solo o en combinación con docetaxel, habiéndose demostrado solo una limitada respuesta antitumoral [153-155]. Este análogo también ha sido probado en ensayos de fase II en glioma, observándose una respuesta en el 20% de los pacientes [156]; y por otra parte, fue evaluado en ensayos de fase I en pacientes con linfoma no-Hodgkin. Los pacientes fueron tratados vía oral con dosis 1  $\mu$ g/día en distintos períodos de tiempo (3 y 8 semanas). La remisión parcial del tumor fue del 13%-30%, la remisión completa fue del 10%-13%, y se logró estabilización de la enfermedad en el 31% de los pacientes [69].

Como conclusión, los análogos del calcitriol han demostrado poseer potentes efectos biológicos, ya sea en estudios *in vivo* como *in vitro*, y muchos de ellos están siendo evaluados en ensayos clínicos con resultados diversos. En cuanto a los efectos antitumorales, a diferencia de otras drogas empleadas en la quimioterapia, los análogos de la vitamina D no son citotóxicos y por lo tanto, pueden ser adecuados para combinarse con otras terapias contra el cáncer. Sin embargo, los resultados alentadores de algunos de los ensayos clínicos indican la necesidad de seguir explorando la posibilidad de utilización terapéutica de los mismos.

### 4.3- Antecedentes sobre análogos fosfónicos del calcitriol

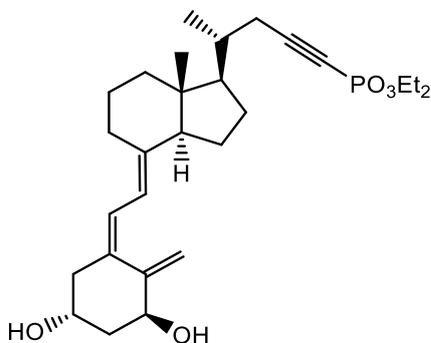
El interés en los compuestos organofosforados se ha expandido tan rápidamente que constituye ahora una rama importante de la química orgánica. Estas moléculas ofrecen posibilidades fascinantes para el estudio estructural, sintético y mecanístico [157]. En particular, los compuestos con enlace C-P presentan características químicas y estructurales interesantes, cuyas acciones biológicas condujeron al desarrollo de una amplia variedad de compuestos para su uso en la medicina y la agricultura [158]. Entre estos compuestos, los vinilfosfonatos han recibido un creciente interés en las últimas décadas, debido a la presencia de un doble enlace activado [159]. Estos compuestos tienen una amplia gama de aplicaciones en muchas áreas, tales como copolímeros, aditivos de polímeros y combustibles, retardantes de llama, productos intermedios para medicamentos, agroquímicos, lubricantes y compuestos biológicamente activos [157,159,160]. En este último caso, se ha verificado que alguno de ellos juega un papel crucial en los procesos metabólicos, y han dado lugar al desarrollo de fármacos antivirales, inmunosupresores, insecticidas, antibacterianos, antifúngicos y anticancerígenos [157,161-163].

Dentro del campo de estudio de la vitamina D, los primeros análogos con átomos de fósforo en la cadena lateral fueron sintetizados por Dauben y colaboradores. Los fármacos sintetizados, tenían un efecto similar al calcitriol, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* [164]. Posteriormente, un grupo de investigación llevó a cabo un estudio más profundo sobre este tipo de derivados, al incorporar fosfonatos y bisfosfonatos en la cadena lateral de la vitamina D [165]. De esta manera, sintetizaron una variedad de análogos como se muestran en la **Figura 22**. La evaluación biológica de estos compuestos demostró considerables efectos significativos en ensayos *in vitro*, además de carecer de actividad hipercalcemiantes *in vivo* en comparación con el calcitriol [165]. Estos resultados prometedores y el interés en este tipo de análogos, motivaron el patentamiento de los mismos [166].



**Figura 22.** Análogos del calcitriol con fosfonatos y bisfosfonatos sintetizados por Steinmeyer.

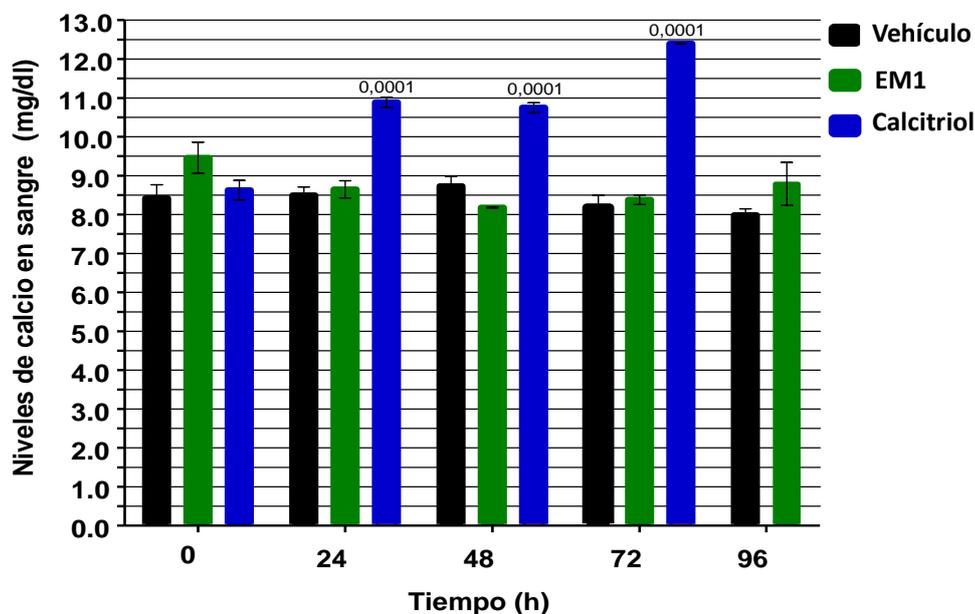
Por otra parte, en el grupo de investigación donde se desarrolló esta tesis, se diseñó y sintetizó un análogo del calcitriol, denominado EM1 (**Figura 23**) [137,167]. El mismo presenta un grupo alquínilfosfonato en su cadena lateral.



**Figura 23.** Estructura del análogo sintético EM1.

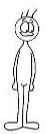
La actividad biológica del análogo EM1, se evaluó comparativamente con la hormona natural (calcitriol), determinándose los efectos calcémicos *in vivo*, el efecto antiproliferativo *in vitro* en varias líneas celulares de cáncer humanas y de ratón, y ensayos *in vivo*, en modelo animal. En cuanto a la actividad calcémica, el análogo fue evaluado en función de las dosis necesarias para la actividad antitumoral *in vivo*. Como se observa en la **Figura 24**, los resultados de este estudio muestran que el tratamiento con EM1, los niveles de calcio en plasma se mantuvieron dentro de los valores

fisiológicos normales para dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , mientras que el calcitriol aumentó los niveles de calcio plasmático, llegando a causar la muerte de los ratones luego de 3 días de tratamiento [137]. Resultados similares con el análogo EM1, se obtuvieron a dosis de 20  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  [168,169].



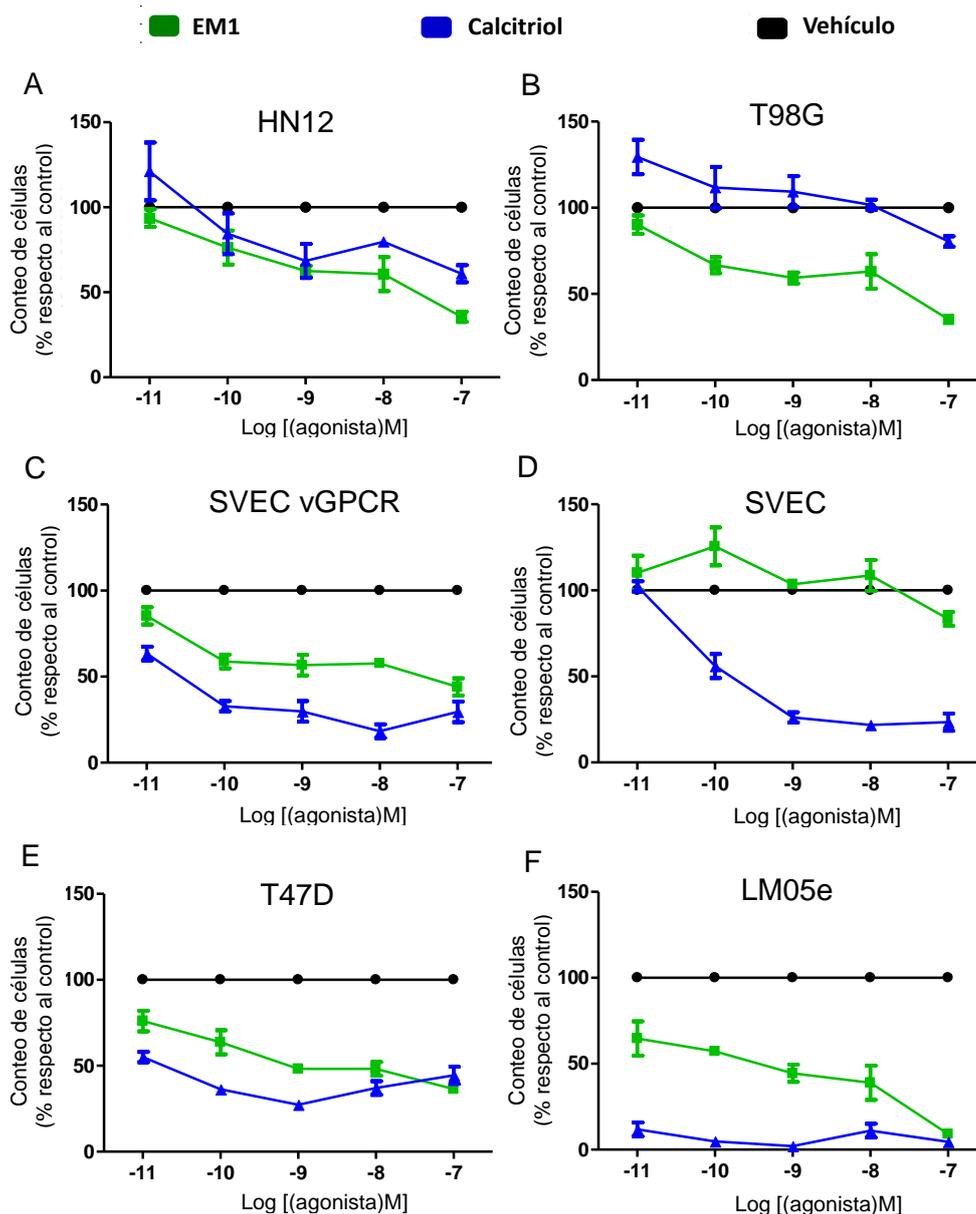
**Figura 24.** Niveles de calcio plasmático en ratones como respuesta al tratamiento con el vehículo (isopropanol), EM1 o calcitriol (5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso).

Respecto al efecto antiproliferativo *in vitro*, se evaluaron distintas líneas celulares de cáncer (Tabla 2).

| Especie  | Línea celular | Tipo de cáncer                                |
|--|---------------|---|
| <br>HUMANAS | T98G          | Glioma  |
|  | HN12          | Carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello |
|  | T47D          | Adenocarcinoma mamario                        |
|  | HCT116        | Carcinoma colorrectal                         |
| <br>MURINAS | SVEC vGPCR    | Sarcoma de Kaposi                             |
|  | LM3           | Adenocarcinoma mamario                        |
|  | LM05e         | Adenocarcinoma mamario                        |

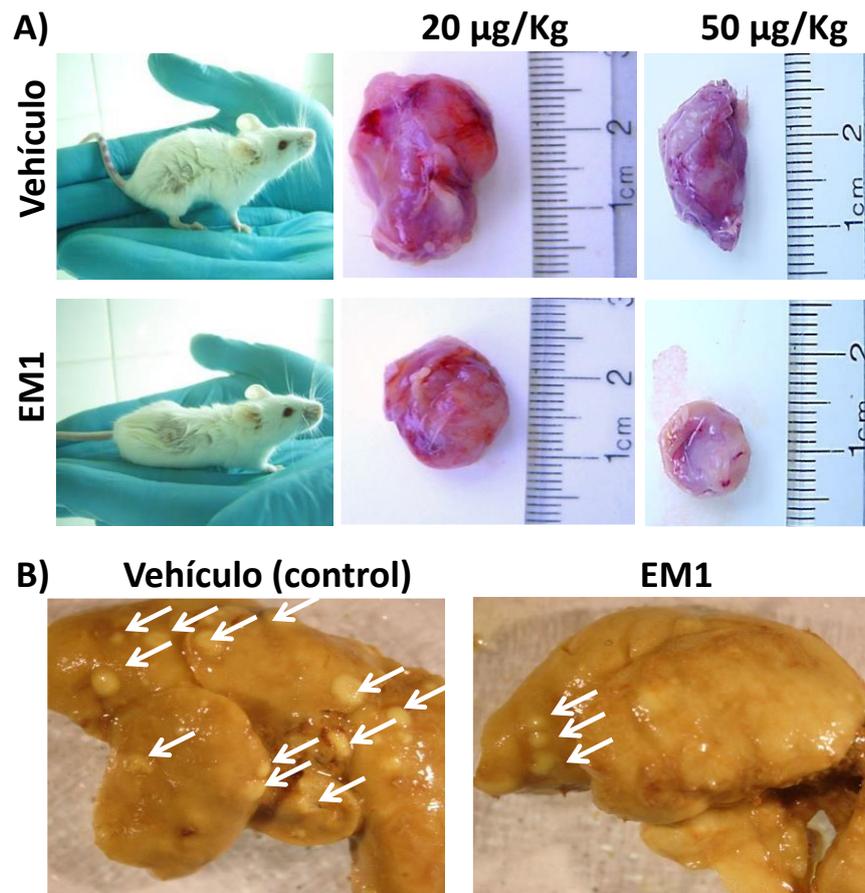
**Tabla 2.** Líneas celulares cancerosas humanas y murinas sobre las que se evaluó EM1.

Se demostró que las líneas de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello (HN12), glioma (T98G), Sarcoma de Kaposi (SVEC vGPCR), y las de adenocarcinoma mamario (T47D y LM05e), responden considerablemente al tratamiento con EM1, disminuyendo la viabilidad celular (**Figura 25**). Por el contrario, las líneas de carcinoma colorectal (HCT116) y de adenocarcinoma mamario (LM3) no respondieron al tratamiento [137]. Además, es de destacar que EM1 disminuyó el crecimiento celular de la línea de Sarcoma de Kaposi (SVEC vGPCR); en cambio, en el caso de la misma línea celular no cancerosa (SVEC), esta no respondió al tratamiento con el análogo, lo cual demuestra un efecto selectivo por parte del mismo [137]. Por otro lado, los resultados de los ensayos antiproliferativos alentaron el interés por estudiar los mecanismos moleculares de acción del análogo EM1, y se descubrió que el análogo ejerce un importante efecto antiproliferativo, antimigratorio y antiinvasivo en la actividad biológica de las células T98G [169].



**Figura 25.** Ensayo dosis-respuesta del análogo EM1 y el calcitriol evaluando la viabilidad celular. (A) HN12 (B) T98G (C) SVEC vGPCR (D) SVEC (E) T47D (F) LM05e.

En cuanto a los ensayos *in vivo*, se realizaron sobre un modelo animal de adenocarcinoma mamario (LM3) de ratón (**Figura 26**), a dos dosis diferentes (20 y 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ). Los resultados preliminares son alentadores, ya que este análogo demostró reducir el tamaño del tumor (**Figura 26A**), aumentar la tasa de supervivencia, y además, reducir el número de metástasis en pulmón (**Figura 26B**) y la invasividad [168].



**Figura 26.** Efecto del análogo EM1 en un modelo de cáncer de mama de ratón. A) Tamaño del tumor. B) Metástasis en pulmón.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, EM1 ha demostrado que es un buen candidato para el tratamiento de algunos tipos de cáncer [137,144,168,169]. Es por ello, que surge como hipótesis de trabajo para esta Tesis Doctoral, introducir modificaciones en la cadena lateral de EM1 y evaluar su actividad biológica, con el propósito de valorar como estos cambios afectan su bioactividad. Así mismo, se realizarán estudios *in silico* comparando calcitriol, EM1 y nuevos análogos de EM1, de manera tal de racionalizar los resultados obtenidos.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

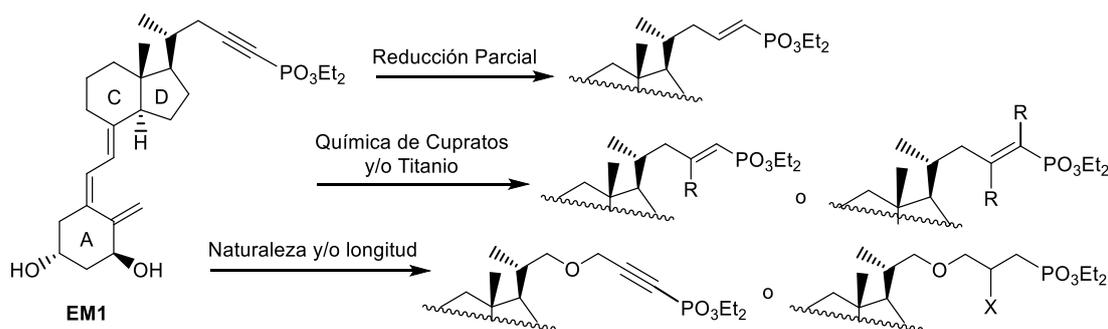
## Hipótesis

La hipótesis de trabajo es que la síntesis de nuevos análogos derivados del alquini fosfonato EM1, o estructuralmente relacionados, podría aportar compuestos con actividad antitumoral más potente que el análogo del calcitriol fósforo-funcionalizado sintetizado anteriormente por nuestro grupo de trabajo, el cual demostró ser un promisorio agente quimioterapéutico en algunos tipos de cáncer.

Para comenzar a contrastar esta hipótesis, el plan de trabajo se divide en dos partes bien diferenciadas, una primera etapa (capítulo 1) de síntesis de análogos de vitamina D, para la realización de estudios estructura-actividad sobre el análogo EM1, y una segunda etapa (capítulo 2), donde realizaremos ensayos preclínicos, evaluando el efecto antineoplásico en cultivos de líneas celulares tumorales, así como su toxicidad y acciones calcemiantes en modelos animales. Los resultados obtenidos de la comparación de los efectos antitumorales observados para EM1 y sus nuevos análogos, nos permitirá obtener información estructura-función valiosa, relacionada de forma directa con el objetivo de maximizar o potenciar su perfil de acción y convertirse en buenos candidatos, con posibilidades de ser terapéuticamente efectivos en el tratamiento del cáncer.

## Objetivos

El **objetivo general** de este trabajo de Tesis Doctoral es sintetizar una serie de análogos fosforados de la vitamina D<sub>3</sub>, introduciendo modificaciones en la cadena lateral del análogo EM1; y posteriormente evaluar la actividad hipercalcemiante y acción antitumoral de los mismos. Los resultados de este trabajo permitirán establecer relaciones estructura-actividad que, por un lado, guíen y orienten los esfuerzos sintéticos para potenciar, optimizar o ampliar el rango de acción del análogo mencionado, y por otro, reunir evidencias que permitan comprender su mecanismo de acción.



### **Objetivos Específicos**

1. Evaluar y optimizar metodologías, sobre sustratos modelo, que permitan modificar la cadena lateral de EM1 en su longitud, geometría o naturaleza.
2. Sintetizar análogos fosforados modificando la cadena lateral de EM1 en base a las metodologías estudiadas.
3. Evaluar la actividad biológica de los análogos sintetizados con ensayos preclínicos *in vitro* e *in vivo*.
4. Analizar con modelado molecular aspectos de la farmacodinámica de los análogos EM1, SG y calcitriol para racionalizar las diferencias observadas en la actividad biológica de los mismos.

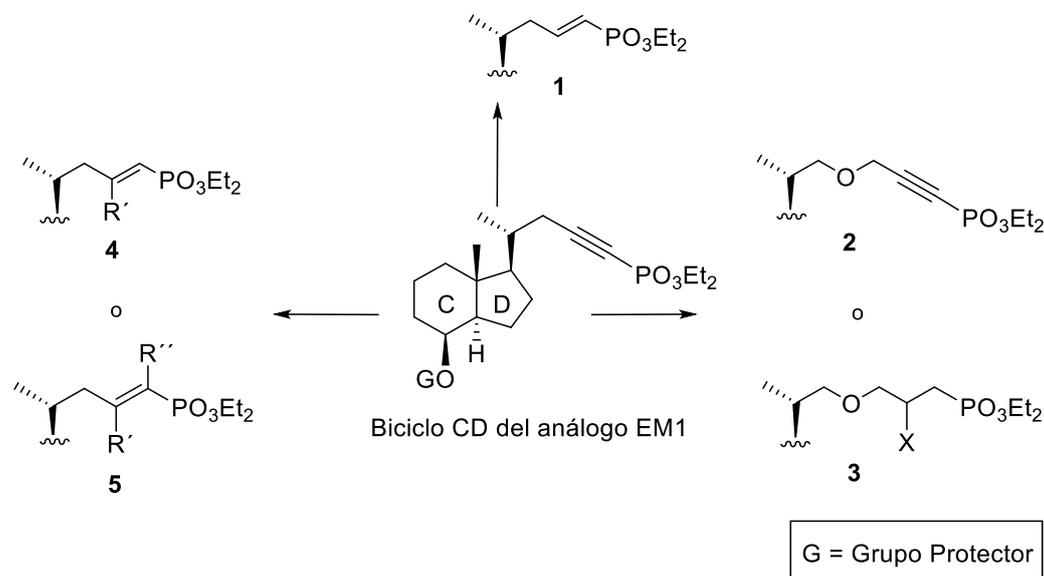
# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

# CAPÍTULO 1

## Síntesis de análogos fosforados estructuralmente relacionados con el análogo EM1

### 1- Planeamiento sintético

Dada la evidencia previa sobre los efectos antineoplásicos de los análogos del calcitriol y en nuestro caso particular del análogo EM1, nos propusimos desarrollar una estrategia de síntesis versátil, que nos permita obtener una serie de derivados fosforados introduciendo modificaciones en la cadena lateral del biciclo CD del análogo EM1 a partir de reducciones parciales (**Figura 27, compuesto 1**), síntesis de oxanálogos (**Figura 27, compuestos 2 y 3**), así como también síntesis de vinilfosfonatos vía química de cupratos y/o complejos de titanio, adición con pentacloruro de fósforo o clorofosfato de dietilo (**Figura 27, compuestos 4 y 5**), con el objetivo de obtener nuevos análogos fosforados del calcitriol, y de este modo, establecer estudios de relación estructura-actividad entre los mismos.

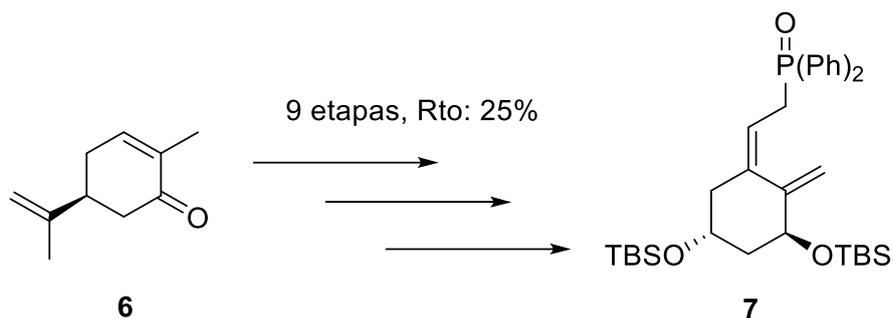


**Figura 27.** Modificaciones estructurales de la cadena lateral del análogo EM1.

Teniendo en cuenta los objetivos sintéticos planteados, en el presente trabajo de Tesis Doctoral, se optó por una ruta sintética convergente, que por un lado permitiera trabajar sobre el biciclo CD, realizando las modificaciones necesarias en la cadena

lateral, para después construir el sistema triénico a través de acoplamientos de Wittig-Horner y dar lugar a los análogos correspondientes.

En 1975, Lythgoe y colaboradores desarrollaron esta ruta, que luego, fue optimizada por el grupo Hoffmann-La Roche, quienes consiguieron realizar la primera síntesis total del calcitriol, empleando un óxido de fosfina obtenido a partir del producto natural (S)-(+)-Carvona **6** (**Esquema 1**) [170]. En esta Tesis Doctoral, el óxido de fosfina **7**, se preparó tomando como referencia la optimización de la síntesis de Daniewski [171], realizada por Yagamare Fall [172].

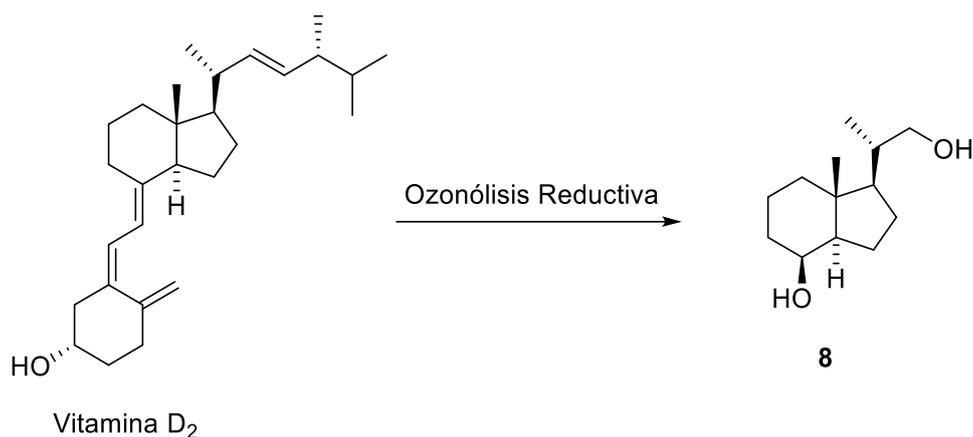


**Esquema 1.** Síntesis de óxido de fosfina **7**.

Por otro lado, la síntesis de cetonas de tipo Grundmann **9** implica la obtención del biciclo CD con la cadena lateral modificada. La síntesis de este fragmento presenta ciertas dificultades dados los requerimientos estructurales que presenta:

- ❖ Una disposición *trans*-hidrindánica del biciclo;
- ❖ La configuración de los estereocentros C17 y C20;
- ❖ Y una funcionalidad adecuada en C8 que permita el acoplamiento del sistema triénico.

La estrategia utilizada en el presente trabajo resulta corta y eficiente. Se basa en la degradación de vitamina D<sub>2</sub> para obtener el diol de Inhoffen-Lythgoe **8** (**Esquema 2**):

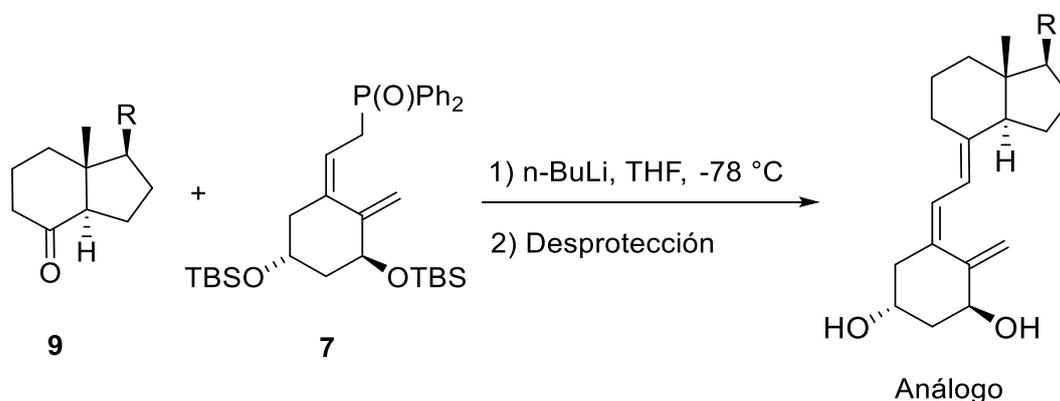


**Esquema 2.** Obtención del diol de Inhoffen-Lythgoe **8** por ozonólisis reductora de la vitamina D<sub>2</sub>.

Para generar la hormona natural o los análogos, la cadena lateral puede introducirse fácilmente siguiendo distintas rutas sintéticas [173]. En este caso, se optimizarán los procedimientos empleados en síntesis previas de EM1, y una vez construida su cadena lateral, introducir las modificaciones resumidas en la **Figura 27** para generar cadenas laterales estructuralmente relacionadas con las de EM1.

Por último, una vez obtenido el óxido de fosfina **7** y las cetonas de tipo Grundmann **9** (**Esquema 3**) con las modificaciones deseadas, se procederá a realizar el acoplamiento de Wittig-Horner [174]. Esta reacción presenta las siguientes ventajas:

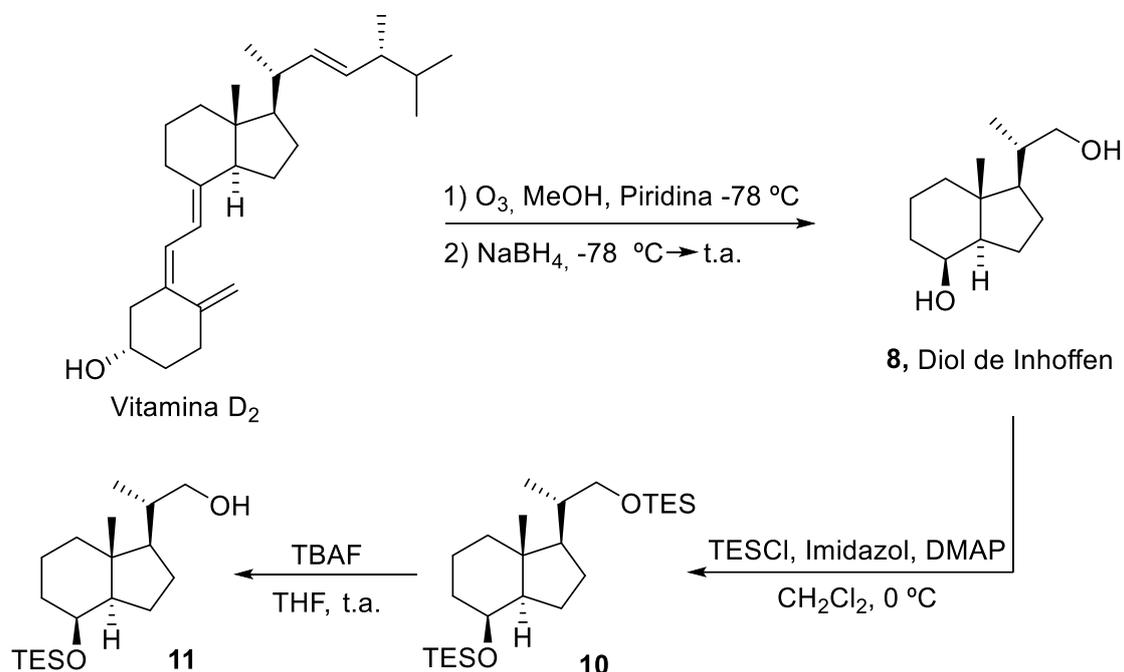
- ❖ Procede rápidamente, en condiciones suaves y con buenos rendimientos.
- ❖ Permite construir el sistema triénico de manera estereoselectiva en un solo paso.
- ❖ El doble enlace C7-C8 adopta exclusivamente la geometría natural E, mientras que el doble enlace C5-C6 retiene la configuración Z del precursor.



**Esquema 3.** Síntesis de análogos del calcitriol.

## 2- Síntesis de las subunidades de los análogos de vitamina D

### 2.1- Síntesis del diol de Inhoffen-Lythgoe



**Esquema 4.** Obtención del diol de Inhoffen-Lythgoe por ozonólisis reductora de la vitamina D<sub>2</sub>.

La estrategia más corta y eficiente para obtener el diol de Inhoffen-Lythgoe es a partir de la degradación de la vitamina D<sub>2</sub> comercial, por ozonólisis reductora directa (**Esquema 4**).

Para llevar a cabo la ozonólisis de la vitamina D<sub>2</sub> se utilizó una unidad de generación de ozono marca UNITEK modelo UTK-O-4, para desinfección de aguas. En primer término, se procedió a la optimización de las condiciones de operación, consiguiendo los mejores resultados empleando una presión de alimentación de 0,62 bar de oxígeno y una potencia media de generación de ozono, regulando un burbujeo continuo en el medio de reacción. Se ensayó la reacción de ozonización completa, seguida de la etapa reductiva por tratamiento con NaBH<sub>4</sub>, escalando las cantidades de la vitamina D<sub>2</sub> (100 mg a 2 gr). Fue necesario corregir las cantidades de NaBH<sub>4</sub> en la etapa reductiva, empleando un exceso mucho mayor que el informado en la bibliografía, debido al cambio de escala de mg a gramos. El progreso de la reacción fue monitoreado por CCF

hasta observar la reducción completa del compuesto dicarbonílico correspondiente al biciclo CD. En la etapa de elaboración de la reacción se optimizó el proceso de extracción, empleando un equipo de extracción continua con Et<sub>2</sub>O durante 24 h. Luego de purificar en columna se obtuvo el diol de Inhoffen esperado con un rendimiento del 40%.

Finalmente se ozonizaron 3,57 g de vitamina D<sub>2</sub> empleando las condiciones establecidas previamente, para obtener las cantidades necesarias de sustrato de partida para la realización del plan de trabajo. En este caso la etapa de extracción continua no fue eficiente, a pesar de trabajar por lotes y emplear periodos prolongados de extracción (48 horas), se verificaba que aún había diol de Inhoffen en la fase metanólica. Se concentraron las fases orgánicas, y a continuación se realizó, primero una percolación o filtración rápida a través de silicagel en una placa filtrante, con el propósito de eliminar los subproductos del tratamiento con el hidruro, seguida de una purificación por cromatografía en columna con sílica gel (30-40% AcOEt/Hex), obteniéndose de esa manera 0,70 g de diol esperado (Rto: 47%). Posteriormente, se protegieron los grupos hidroxilos del C8 y C22 del biciclo CD, mediante el agregado de imidazol, una cantidad catalítica de DMAP y TESI a 0 °C para obtener el compuesto **10**. Finalmente, se desprotegió el C22 de la cadena lateral con una solución de TBAF en THF a t.a., y se obtuvo el diol de Inhoffen protegido en C8 **11** con 91% de rendimiento.

## 2.2- Síntesis de óxido de fosfina

Como ya mencionamos, para realizar la síntesis convergente de los análogos de vitamina D, es necesario en la etapa final, el acoplamiento entre el diol de Inhoffen y el óxido de fosfina para la construcción del sistema triénico. Teniendo en cuenta los objetivos sintéticos planteados para este trabajo de Tesis Doctoral, se procedió a la preparación de dicha subunidad portadora del anillo A.

Como puede observarse en el **Esquema 5**, se partió de una mezcla de ésteres **12a/b** (relación *E/Z* 3:1), precursor habitual en la síntesis de óxido de fosfina [172], que fue sometida a una isomerización irradiando con luz UV en presencia de 9-fluorenona como sensibilizador, obteniéndose el isómero (*Z*) **12a** con presencia de trazas del isómero (*E*), **12b** que fue purificado por cromatografía en columna con rendimientos excelentes (95%). Posteriormente se redujo el éster **12a** mediante el agregado de una solución de DIBAL-H en hexano seco a -78°C. Luego de 1 h, bajo agitación a la misma

temperatura, la reacción finalizó, obteniéndose el alcohol **13** (**Esquema 5**, paso b) con un rendimiento del 95%.

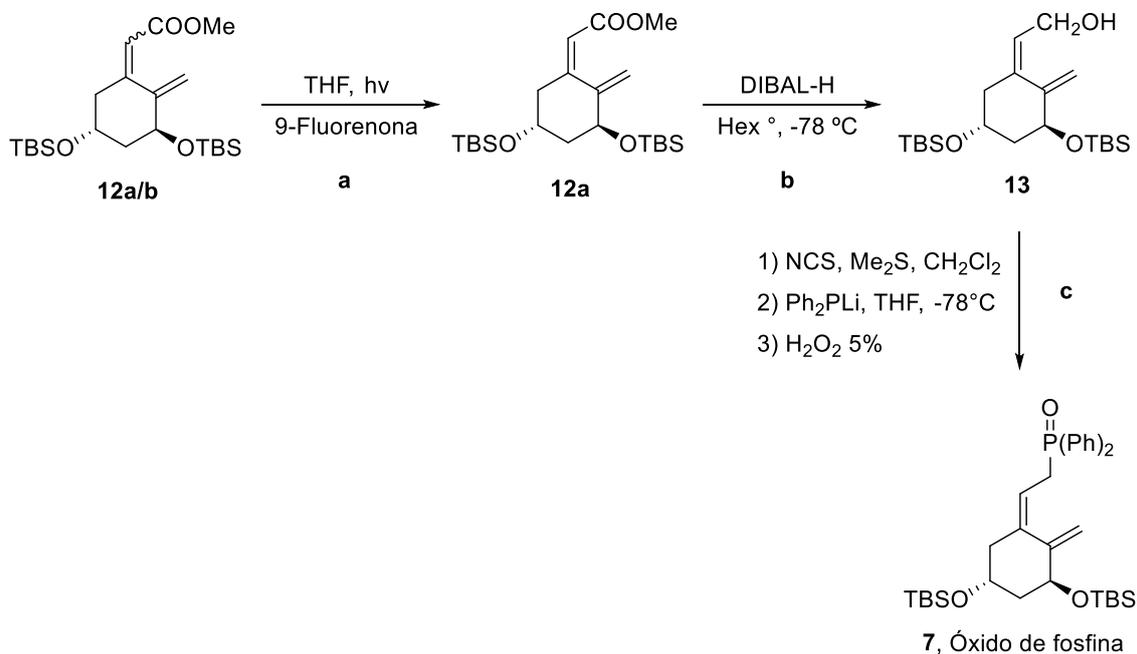
Por último, el óxido de fosfina **7** se obtuvo a partir del alcohol **13**, a través de una serie de reacciones en 3 etapas (**Esquema 5**, paso c), que no requirieron de purificaciones de los crudos de reacción. Estas transformaciones se resumen a continuación:

1) Sobre una solución de NCS y Me<sub>2</sub>S en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se agregó el alcohol **13**, una vez finalizada la reacción de sustitución radicalaria, se aisló el cloruro intermediario reservándolo para la próxima etapa.

2) Una solución del anión generado a partir del agregado de *n*-BuLi sobre HP(Ph)<sub>2</sub> en THF a -78°C, se adicionó vía canula sobre una solución del cloruro precedente en THF, rindiendo la fosfina correspondiente.

3) Una vez finalizada la reacción de sustitución nucleofílica, la fosfina intermediaria se óxido por el agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, obteniéndose de esta manera el producto deseado.

Luego de la elaboración se obtuvo el óxido de fosfina **7** con un rendimiento global del 77%, para las tres etapas mencionadas.



**Esquema 5.** Síntesis del óxido de fosfina **7**.

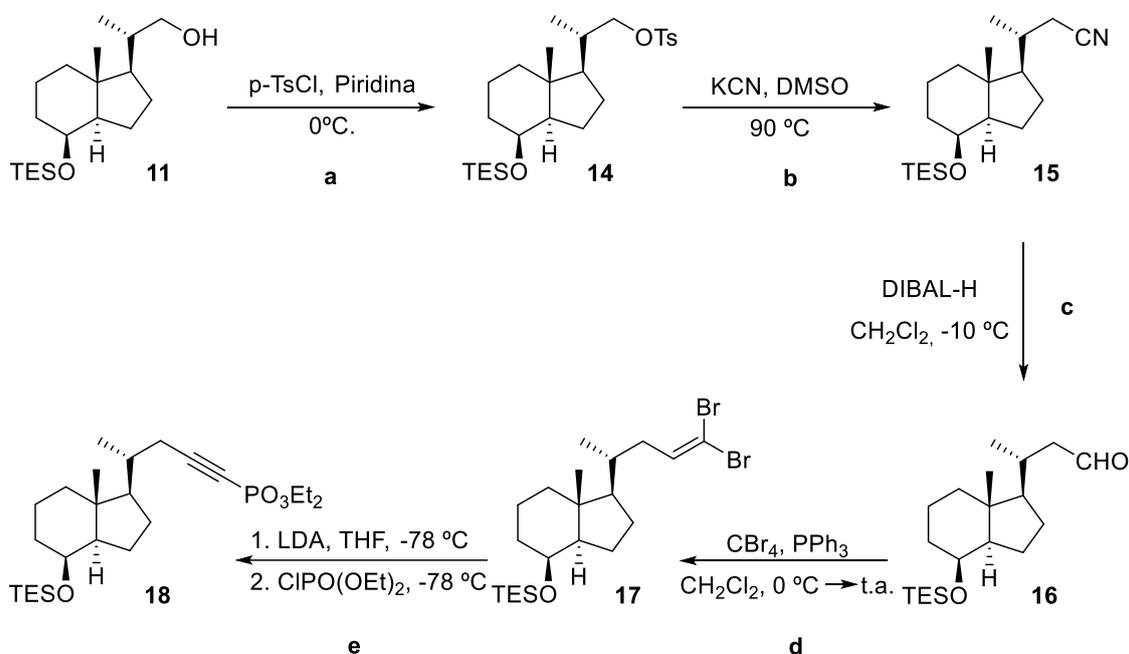
### 2.3- Síntesis del biciclo CD del análogo EM1

Para evaluar modificaciones en la cadena lateral del biciclo CD del análogo EM1 [167], procedimos a construir la misma (**Esquema 6**) a partir del diol de Inhoffen protegido **11**, obtenido previamente (**Esquema 4, pág. 69**). La experiencia previa en la obtención del análogo EM1, contemplaba purificaciones de numerosas etapas de su síntesis. En esta oportunidad, y en orden de comparar el rendimiento global de la primera etapa de la estrategia convergente, es decir la preparación del biciclo CD de EM1; se llevó a cabo una serie de transformaciones, empleando los crudos de reacción obtenidos en las condiciones de elaboración, para finalmente abordar la purificación final del producto, una vez construida la cadena lateral en el biciclo CD. Esta simplificación de los procedimientos permitiría, por un lado, minimizar tiempos y recursos, y por otro, maximizar el rendimiento global, a la hora de preparar tanto el análogo EM1 como otros derivados de su estructura.

Tratamiento del alcohol **11** con cloruro de p-toluensulfonilo en presencia de piridina, rindió el correspondiente tosilato **14**, que no requirió de purificación (**Esquema 6, paso a**). La posterior sustitución nucleofílica por reacción con cianuro de potasio, calentando a reflujo durante 3 h, dio lugar al nitrilo **15** (**Esquema 6, paso b**), el cual por reducción con DIBAL-H generó el correspondiente aldehído **16** (**Esquema 6, paso c**). Las reacciones se monitorearon por CCF, verificándose las modificaciones mencionadas por la conversión total de los sustratos de partida.

Asimismo, el análisis por  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$  de los productos crudos obtenidos en cada paso, muestra que los mismos se obtienen prácticamente puros, de manera tal que las tres reacciones se llevaron a cabo sucesivamente sin previa purificación. Una vez obtenido el aldehído **16**, la incorporación de la funcionalidad de fósforo se realizó a través de la reacción de Corey-Fuchs. De este modo, el dibromoalqueno **17** (**Esquema 6, paso d**) se obtuvo por reacción del aldehído **16** con trifenilfosfina y tetrabromuro de carbono, utilizando un 50% de exceso de ambos reactivos. La reacción se siguió por CCF y luego de 40 min se completó, tras lo cual, el compuesto **17** se aisló simplemente por filtración de la mezcla de reacción a través de sílica gel, lavando con hexano para arrastrar el producto. A continuación, el dibromoalqueno se trató con 3 equivalentes de LDA a  $-78^\circ\text{C}$ . Transcurrida 1 h aproximadamente, se observó la conversión total del sustrato de partida por CCF. Luego se agregó sobre la mezcla de reacción 2 equivalentes de clorofosfato de dietilo. Finalizada la reacción, se procedió a su elaboración, con posterior purificación del producto por cromatografía en columna,

obteniéndose de este modo el alquínilfosfonato **18** (Esquema 6, paso e), con un rendimiento global del 40% para las cinco etapas. Si comparamos con la misma etapa de síntesis correspondiente al análogo EM1, verificamos que el rendimiento global con la nueva estrategia asumida ha mejorado, ya que en la síntesis original fue del 31%.



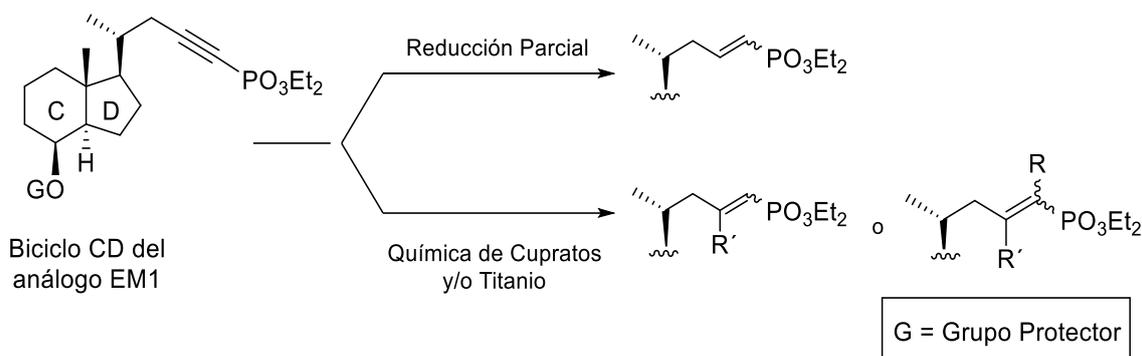
**Esquema 6.** Síntesis del bicyclo CD del análogo EM1 **18**.

## 2.4- Modificación y funcionalización de la cadena lateral

Con el fin de evaluar el efecto de cambios estructurales en la actividad del análogo EM1, abordamos la modificación de su cadena lateral, enfocándonos en la obtención de vinilfosfonatos. De acuerdo a la bibliografía, la síntesis de vinilfosfonatos es muy diversa, y con numerosos métodos. Algunos de ellos son:

- ❖ Métodos basados en la reducción parcial del alquínilfosfonato, por hidrogenación catalítica con paladio [160].
- ❖ Métodos basados en reacciones promovidas por metales de transición [159,175]. Entre estos últimos métodos se destaca la síntesis estereoselectiva de alquénilfosfonatos mono, di y trisustituidos, a partir de la adición al triple enlace de alquínilfosfonatos. Estos diversos métodos pueden realizarse a través de reacciones con titanio [176-180], zirconio [176,177,181,182] o cobre [160,183].

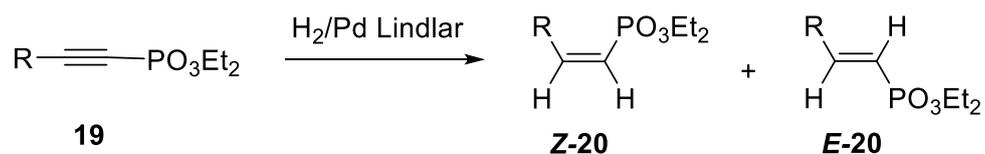
En principio estas estrategias permitirían sintetizar análogos que contengan un alquénilfosfonato en la cadena lateral, y evaluar posteriormente la relación estructura-actividad de los cambios introducidos. En el esquema siguiente (**Esquema 7**), se encuentran resumidas las estrategias elegidas para abordar algunos de los objetivos sintéticos planteados.



**Esquema 7.** Modificaciones estructurales propuestas a partir del biciclo CD del análogo EM1.

#### 2.4.1- Síntesis de vinilfosfonatos monosustituídos vía reducción parcial de alquénilfosfonatos

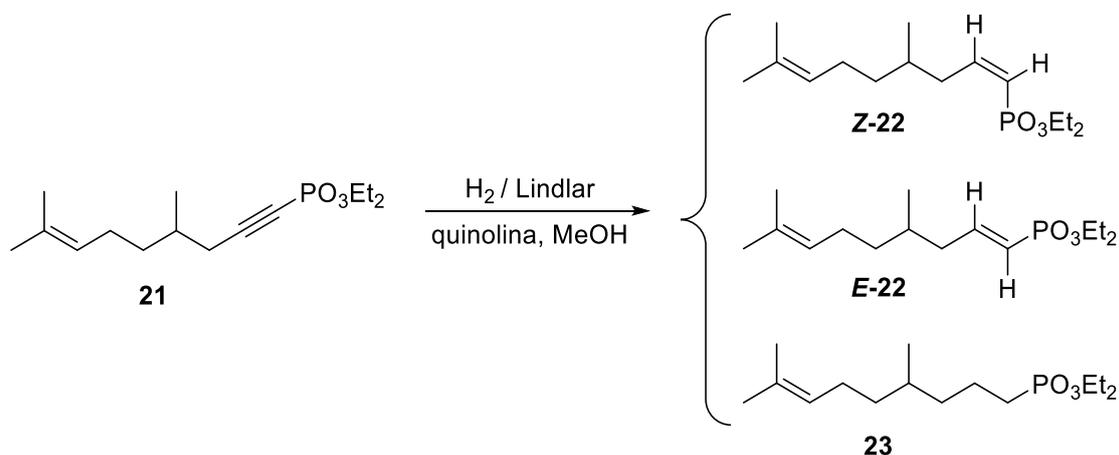
En primera instancia, comenzamos trabajando con la síntesis de vinilfosfonatos por reducción de alquénilfosfonatos. La hidrogenación catalítica del triple enlace carbono-carbono de 1-alquénilfosfonatos por medio del catalizador de Lindlar, permite la obtención de mezclas de los isómeros geométricos *E/Z* del vinilfosfonato (**Esquema 8**). Ambos isómeros pueden ser fácilmente separados por cromatografía en columna, obteniéndose como isómero mayoritario el de geometría *Z* con muy buenos rendimientos, los cuales oscilan entre el 70-80% [160].



**Esquema 8.** Hidrogenación catalítica de 1-alquénilfosfonatos para la síntesis de 1-alquénilfosfonatos monosustituídos.

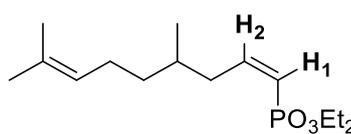
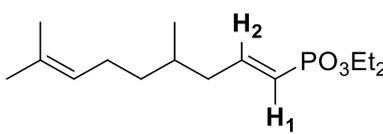
A fin de ensayar y optimizar las condiciones de hidrogenación, comenzamos trabajando con sustratos modelos sencillos. En primera instancia, utilizamos los 1-alquiniolfosfonatos **21** y **24**, los cuales fueron hidrogenados en presencia del catalizador Pd-Lindlar y quinolina, en metanol como solvente. El progreso de la reacción se siguió cuidadosamente por CCF, y luego de 3 h se dieron por finalizadas. Una vez elaborados los crudos de reacción y purificados por cromatografía en columna, se procedió a identificar los productos por  $^{31}\text{P}$ -RMN y  $^1\text{H}$ -RMN.

En el caso del alquiniolfosfonato **21** (**Esquema 9**), se aislaron tres productos por cromatografía. El análisis por  $^{31}\text{P}$ -RMN y  $^1\text{H}$ -RMN permitió identificar el alqueniolfosfonato **Z-22** con un rendimiento moderado del 41%, junto con un 15% del isómero **E-22** y un 10% del alquiliolfosfonato **23**, producto de la hidrogenación completa de **21**.



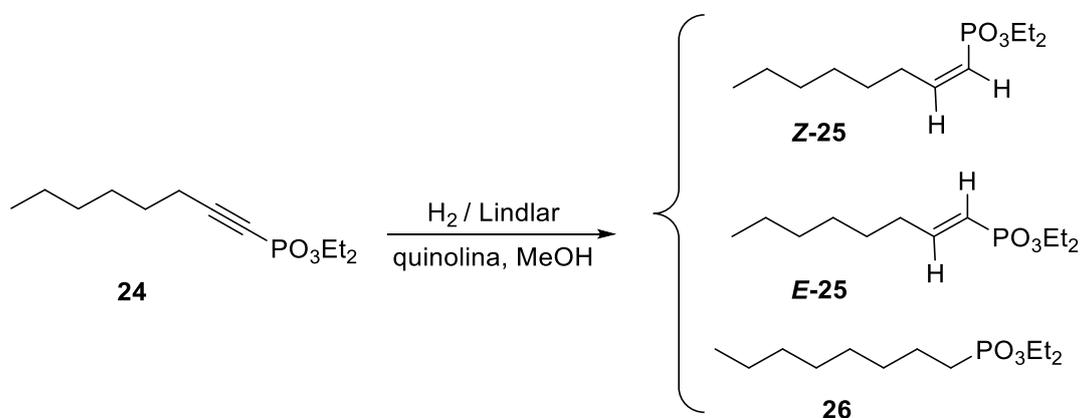
**Esquema 9.** Hidrogenación catalítica de 1-alquiniolfosfonato **21**.

La estereoquímica de los productos se determinó por  $^{31}\text{P}$ -RMN, teniendo en cuenta los desplazamientos de  $^{31}\text{P}$  para cada compuesto, y a partir de las constantes de acoplamiento vecinales  $^3J_{\text{P-H}}$  y  $^3J_{\text{H-H}}$  en  $^1\text{H}$ -RMN (**Tabla 3**). Las constantes de acoplamiento  $^3J_{\text{P-H}}$  asociadas a dobles enlaces *cis* se encuentran en el rango de 45-55 Hz [160,184].

|            |                                |  |                                |  |                                |                                 |
|------------|--------------------------------|---|--------------------------------|--|--------------------------------|---------------------------------|
|            |                                | <b>Z-22</b>   |                                | <b>E-22</b>  |                                |                                 |
| <b>22</b>  | <sup>31</sup> P-RMN<br>δ (ppm) | <sup>1</sup> H-RMN δ (ppm) - J (Hz)   |                                |  |                                |                                 |
|            |                                | H <sub>1</sub>  | <sup>2</sup> J <sub>P-H1</sub> | H <sub>2</sub>   | <sup>3</sup> J <sub>P-H2</sub> | <sup>3</sup> J <sub>H1-H2</sub> |
| <b>(Z)</b> | 17,28                          | 5,61  | 19,8                           | 6,48   | 53,2                           | 13,1                            |
| <b>(E)</b> | 18,66                          | 5,66  | 21,5                           | 6,78   | 21,9                           | 17,1                            |

**Tabla 3.** Señales espectroscópicas correspondientes a la asignación estereoquímica de los isómeros **Z-22** y **E-22**.

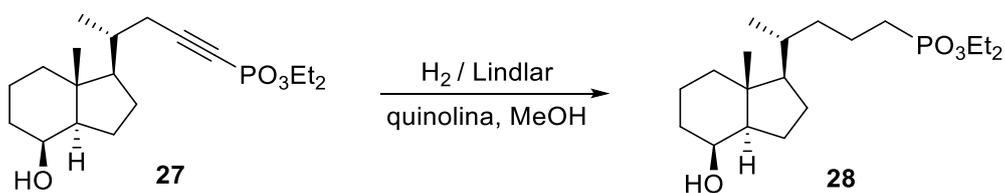
El ensayo se repitió con el 1-alquínilfosfonato **24** (**Esquema 10**), no consideramos necesario realizar la purificación, evaluando de manera directa la proporción de productos con el espectro <sup>31</sup>P-RMN del crudo de reacción. Se identificaron los isómeros **E/Z-25** y el alquínilfosfonato **26**, producto de la hidrogenación completa de **24**. Teniendo en cuenta la integración de las señales en el espectro de <sup>31</sup>P-RMN, la proporción de los productos fue la siguiente: 77% para el isómero **Z-25**, 7% para el isómero **E-25**, y un 11% del compuesto **26**. El desplazamiento de las señales de <sup>31</sup>P-RMN para cada compuesto fue: 17,32 ppm (**Z-25**), 18,95 ppm (**E-25**) y 32,65 ppm (**26**). La señal correspondiente al <sup>31</sup>P en los isómeros **Z** aparece a mayores campos en comparación con la de los isómeros **E** [160].



**Esquema 10.** Hidrogenación catalítica de 1-alquínilfosfonato **24**.

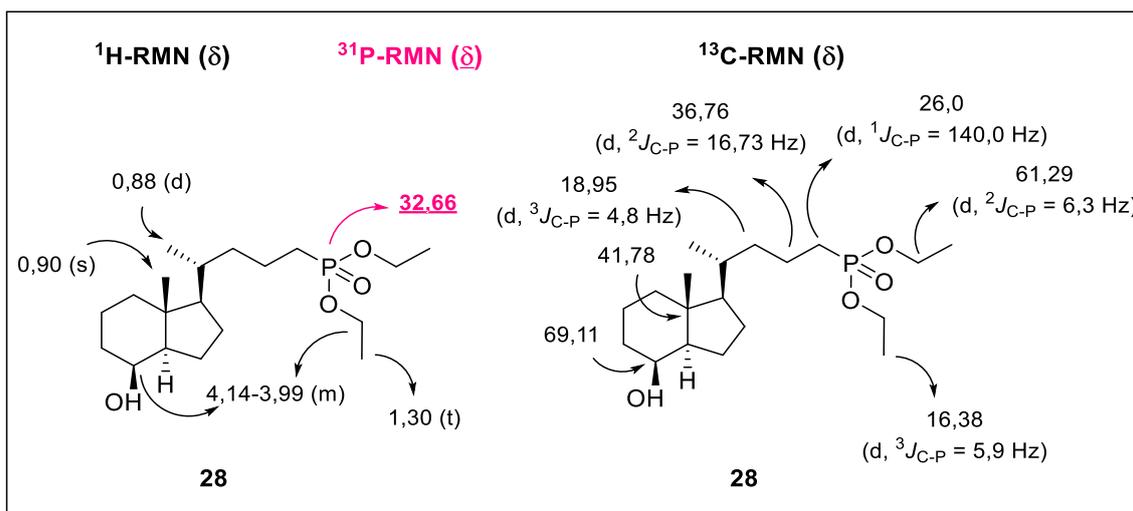
De acuerdo a los resultados obtenidos con los sustratos modelos **21** y **24**, se decidió llevar a cabo la hidrogenación de **27**, aun cuando se obtuviera una mezcla de los isómeros geométricos correspondientes. La separación de ambos isómeros permitiría obtener, en última instancia, dos vinilfosfonatos con una geometría diferente en su cadena lateral.

Desafortunadamente, durante la hidrogenación del 1-alkinilfosfonato **27**, en las condiciones establecidas precedentemente, se presentaron inconvenientes al evaluar el progreso de la reacción. El grado de avance de la reducción por CCF resultó más dificultosa, ya que el alquinilfosfonato **27** y los vinilfosfonatos *Z/E* tienen valores de  $R_f$  muy próximos, debido a la presencia del esqueleto carbonado del biciclo CD. A diferencia de los sustratos modelo, no fue posible advertir el momento en el cual se debía detener la reacción para evitar la hidrogenación total de los vinilfosfonatos observada. Ante esta imposibilidad, realizamos un último ensayo empleando menores tiempos reacción, sin poder aislar los vinilfosfonatos deseados, obteniendo el alquilfosfonato **28** en un 89% (**Esquema 11**).



**Esquema 11.** Hidrogenación catalítica de 1-alkinilfosfonato **27**.

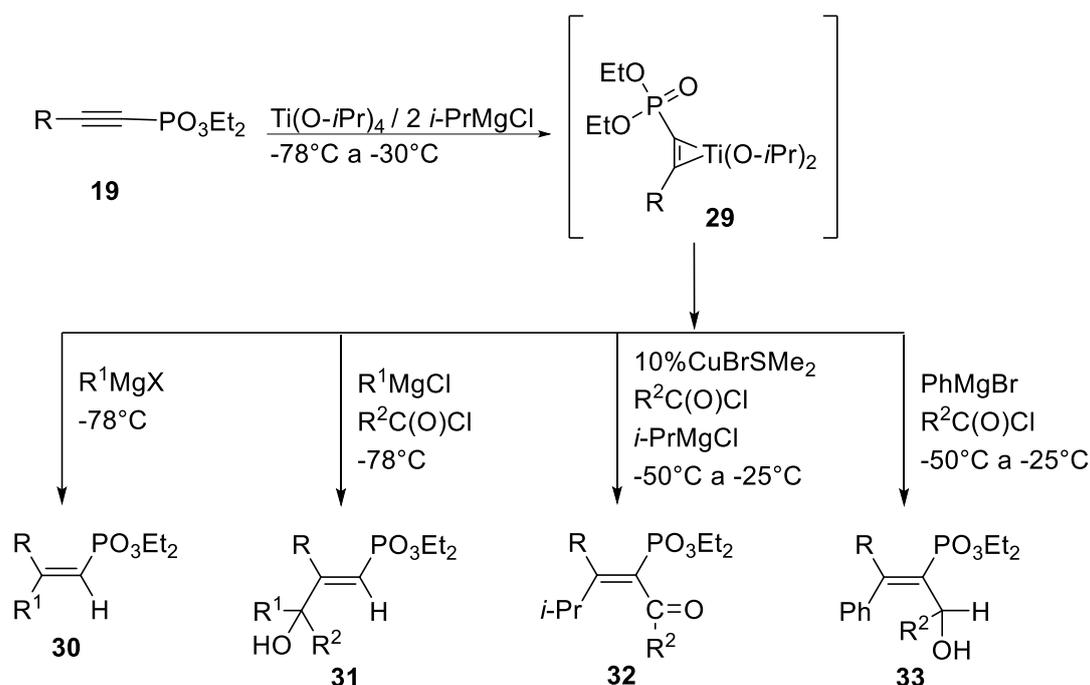
En la **Figura 28** se presentan las señales de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN y <sup>31</sup>P-RMN más representativas del compuesto **28**.



**Figura 28.** Señales más representativas de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{31}\text{P}$  de **28**.

#### 2.4.2- Síntesis de vinilfosfonatos di y tri sustituidos a partir de alquinilfosfonatos

Como ya mencionamos, hemos considerado dos alternativas para la síntesis regio y estereoselectiva de vinilfosfonatos di y trisustituidos a partir de 1-alquinilfosfonatos, vía química de cupratos o titanio. La química con complejos de titanio [176-180] (**Esquema 12**), requiere la formación de un complejo intermediario de titanio **29** generado *in situ*, que fuera inicialmente reportado por Kulinkovitch [185,186]. El mismo se prepara a partir de materiales de partida accesibles, como son el  $\text{Ti}(\text{O}-i\text{Pr})_4$  y reactivos de Grignard. La posibilidad de seleccionar y combinar diferentes reactivos de Grignard y cloruros de acilo, en diferentes condiciones con el intermediario mencionado, brinda la posibilidad de obtener distintos tipos de vinilfosfonatos.



**Esquema 12.** Síntesis de vinilfosfonatos a partir de complejos de titanio.

Por otra parte, la síntesis de vinilfosfonatos di y trisustituidos a partir de reacciones de carbocupración de alquinos, es un procedimiento atractivo y ventajoso para introducir modificaciones estructurales, que ha sido ampliamente utilizado, y se puede llevar a cabo con sustratos de partida accesibles y económicos.

De acuerdo a la bibliografía, los reactivos organocúpricos, sintetizados a partir de sales de cobre con compuestos organomagnesianos u organolíticos, reaccionan con 1-alkinilfosfonatos de manera regio y estereoselectiva, dando lugar a los correspondientes vinilfosfonatos con excelentes rendimientos de entre 60-97 % [160,183,187].

En todos los casos, se ha observado que el reactivo organocúprico se adiciona al triple enlace alquilando exclusivamente el carbono  $\beta$  con respecto al grupo fosfónico (**Esquema 13**) sin reacciones secundarias, asumiendo la formación del fosfonoalquenilcuprato intermediario **34** [160,183,188]. En todas las reacciones que involucren la posible formación de isómeros geométricos, los espectros de RMN mostraron la formación estereoespecífica de un solo isómero. Se ha observado la formación del producto de adición *syn* cuando  $\text{R} = \text{H}$ , *n*-Pr, *n*-Bu, *n*-Hex,  $\text{CH}_2\text{OBn}$  y Ph, en cambio, se ha obtenido exclusivamente el producto de adición *anti* cuando  $\text{R} = t\text{-Bu}$



EM1, a pesar de no contener el bicyclo CD. En la **Tabla 4**, se resumen las condiciones de reacción y resultados obtenidos para la síntesis de vinilfosfonatos 2,2-disustituidos.

M= Li, MgCl

[ R = 21: , 24: ]

| Entrada <sup>a</sup> | Sustrato | R'           | Reac. Organomet. | Sal de cobre | Cuprato (equiv.) | T (°C)/ t (h) | Producto   | Rend. (%) <sup>b</sup> |
|----------------------|----------|--------------|------------------|--------------|------------------|---------------|------------|------------------------|
| 1                    | 24       | <i>i</i> -Pr | <i>i</i> -PrMgCl | CuCl         | 1                | -30 / 6       | <b>35a</b> | 63 (1 / 3)             |
| 2                    | 24       | <i>n</i> -Bu | <i>n</i> -BuLi   | CuI          | 1                | -78 a -25 / 5 | —          | —                      |
| 3                    | 24       | <i>n</i> -Bu | <i>n</i> -BuLi   | CuI          | 5                | -78 a -25 / 3 | <b>35b</b> | 71 (1 / 2,5)           |
| 4                    | 21       | <i>n</i> -Bu | <i>n</i> -BuLi   | CuI          | 1                | -78 a -25 / 5 | —          | —                      |
| 5                    | 21       | <i>n</i> -Bu | <i>n</i> -BuLi   | CuI          | 5                | -78 a -25 / 3 | <b>35c</b> | 30 (1,3 / 1)           |

<sup>a</sup> Et<sub>2</sub>O como solvente. <sup>b</sup> Rendimiento de la reacción. En paréntesis se puede observar la relación de los isómeros *Z/E*.

**Tabla 4.** Reacción de carbocupración sobre 1-alkinilfosfonatos para la síntesis de vinilfosfonatos disustituidos.

De dicho estudio pudimos concluir, en primera instancia, que la síntesis de vinilfosfonatos disustituidos a partir de carbocupración, empleando reactivos de Grignard, procedió con rendimientos buenos del 63% (**Tabla 4, entrada 1**). Las condiciones de reacciones ensayadas, fueron las mismas que las descriptas en la bibliografía [160]. De este modo, utilizamos Et<sub>2</sub>O como solvente y 1 equivalente de exceso de reactivo organocúprico, preparado en una relación 5:1 de exceso de reactivo de Grignard con respecto a la sal de cobre, y controlando que la temperatura no sobrepase los -30°C. La temperatura a la cual transcurre el proceso ha sido reportada como uno de los factores que permiten controlar la estereoquímica de la reacción, favoreciendo la adición *syn* cuando se trabaja a temperaturas inferiores a -30°C. Un aumento de la temperatura por encima de este registro conduce a una pérdida del control

de la estereoquímica de la adición, dando lugar a la mezcla de isómeros *Z/E*, verificándose la adición *anti* en la misma [160]. A pesar del control de la temperatura ejercido, se obtuvo una mezcla 1:3 de los isómeros *Z/E*, que, si bien en principio evidencia una falta del control en la estereoquímica de la reacción, el hecho de que estos isómeros puedan separarse por cromatografía, nos permitiría obtener dos alternativas a la hora de preparar cadenas laterales con distinta orientación.

Por otra parte, ensayamos las reacciones de carbocupración generando el cuprato con compuestos organolíticos. En este caso, elegimos trabajar con *n*-BuLi, que ha sido empleado en este tipo de sistemas con excelentes rendimientos, cuando el reactivo organocúprico se prepara con soluciones del organolítico recientemente preparada [160,188,189]. A diferencia del cuprato preparado a partir de organomagnesianos, trabajando con 1 equivalente de cuprato preparado a partir de CuI y *n*-BuLi a temperaturas de -78°C y con Et<sub>2</sub>O como solvente, no se verificó la formación del producto de adición (**Tabla 4, entradas 2 y 4**). Asumiendo que generalmente este tipo de reacciones requieren de excesos de cuprato, repetimos la reacción utilizando 5 equivalentes de exceso de reactivo organocúprico, preparado en una relación 2:1 de exceso del compuesto organolítico con respecto a la sal de cobre. De este modo, obtuvimos el producto deseado con un rendimiento del 71% (**Tabla 4, entrada 3**). Por otra parte, al aumentar la cantidad de cuprato, el tiempo de reacción disminuyó, dándose la misma por finalizada a las 3 h. A pesar de que las reacciones a partir del cuprato organolítico, se ensayaron en un rango de temperaturas inferiores de -78°C a -25°C, intentando favorecer la estereoquímica *syn* en la adición, se obtuvo una mezcla 1:2,5 de isómeros *Z/E*.

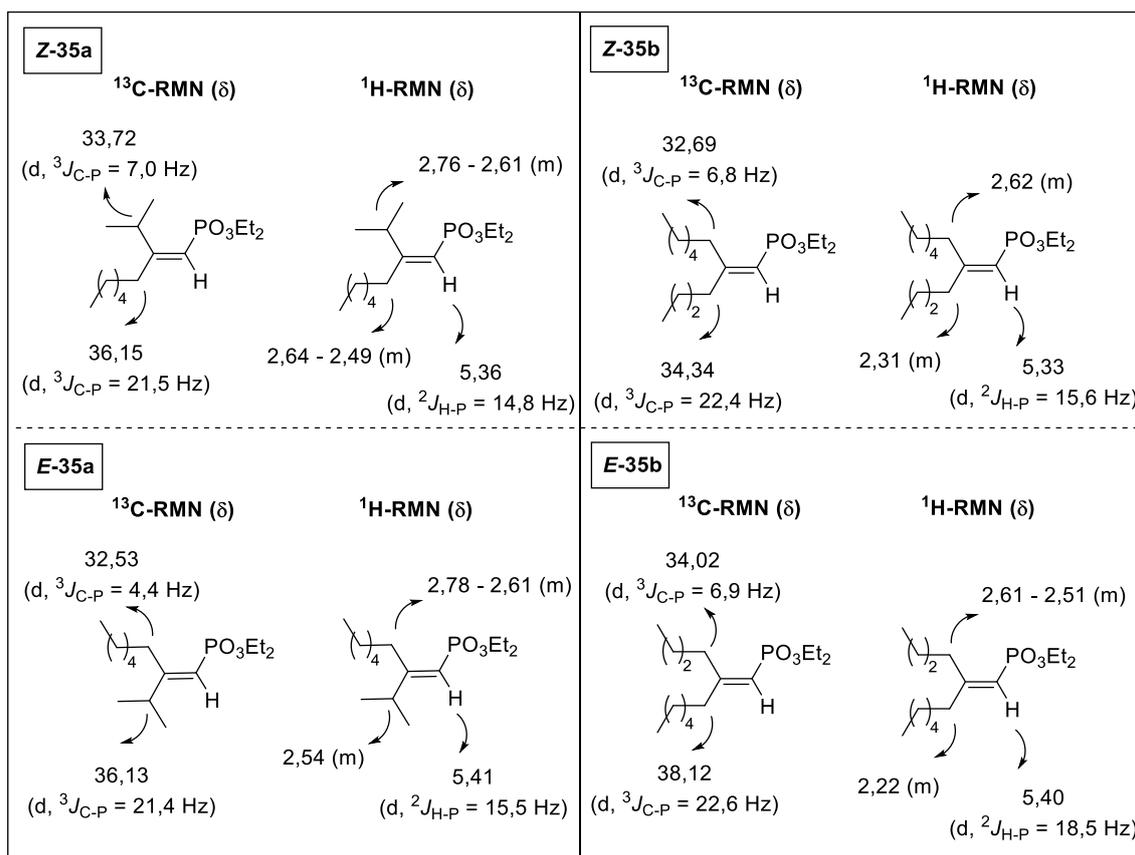
En el caso del sustrato modelo **21**, que emula en cierta medida el grado de sustitución en β de la cadena lateral de EM1, se repitieron nuevamente estas pruebas para corroborar la necesidad de utilizar un exceso del organocuprato correspondiente, y verificar la estereoquímica *syn/anti* de la reacción. Al igual que en el caso anterior se requirió un exceso de 5 equivalentes del cuprato, y al cabo de 3 horas de reacción, se verificó un rendimiento regular de un 30%, recuperando sustrato de partida sin reaccionar. Presumiblemente, las restricciones estéricas del sustrato requieran de mayores tiempos de reacción. En lo que se refiere a la estereoquímica de la reacción, también se obtuvo una mezcla de isómeros *Z/E*, pero en esta oportunidad en una relación 1,3:1, favoreciendo ligeramente en este caso la adición *syn* para obtener una mayor proporción del isómero *Z* (**Tabla 4, entrada 5**).

Las reacciones de carbocupración tipo Michael sobre el sistema conjugado se monitorearon por CCF. Las mezclas de isómeros *Z/E* fueron separadas por cromatografía en columna y caracterizadas a partir de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{31}\text{P}$  (**Tabla 5**). En el caso de la mezcla de compuestos *Z/E-35c*, dado el bajo rendimiento de la reacción, no se realizó la purificación y separación de los isómeros, calculando la relación de productos integrando las señales en el espectro de  $^{31}\text{P}$ -RMN. El desplazamiento químico de la señal de  $^{31}\text{P}$ -RMN del vinilfosfonato varía de acuerdo a los cambios estructurares en el carbono unido a fósforo. Para los productos de carbocupración *Z/E-35a*, *Z/E-35b* y *Z/E-35c* la señal de  $^{31}\text{P}$ -RMN aparece en 18,57 / 17,90 ppm (**Tabla 5, entradas 1 y 2**); 21,31 / 18,72 ppm (**Tabla 5, entradas 3 y 4**) y 21,40 / 17,50 ppm (**Tabla 5, entradas 5 y 6**) respectivamente, indicando que el fósforo está unido a un carbono  $\text{sp}^2$ . Además, cuando el fósforo está unido a un carbono  $\text{sp}$  la señal se encuentra a campos mayores en el rango de 0 a -9 ppm, mientras que cuando está unido a un carbono  $\text{sp}^3$  de una cadena alquílica la señal se desplaza a campos menores, en el rango de 30 a 38 ppm [184]. Por otra parte, el desplazamiento de  $^{31}\text{P}$ -RMN de los isómeros *Z/E* se correlaciona con los datos bibliográficos [160,177-180].

| Entrada | Compuesto    | R | R'           | $^{31}\text{P}$ -RMN<br>$\delta$ (ppm) | $^1\text{H}$ -RMN<br>$\delta$ (ppm) | $^{13}\text{C}$ -RMN $\delta$ (ppm) - $J_{\text{C-P}}$ (Hz) |                |                    |                      |
|---------|--------------|---|--------------|--|-------------------------------------|---|----------------|--------------------|----------------------|
|         |              |   |              |  |                                     | C <sub>1</sub>  | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> cis | C <sub>4</sub> trans |
| 1       | <b>Z-35a</b> | a | <i>i</i> -Pr | 18,57                                  | 5,36                                | 111,03  | 170,79         | 32,53              | 36,13                |
| 2       | <b>E-35a</b> | a | <i>i</i> -Pr | 17,90                                  | 5,41                                | 110,42  | 172,33         | 33,72              | 36,15                |
| 3       | <b>Z-35b</b> | a | <i>n</i> -Bu | 21,31                                  | 5,33                                | 124,39  | 158,30         | 32,69              | 34,34                |
| 4       | <b>E-35b</b> | a | <i>n</i> -Bu | 18,72                                  | 5,40                                | 111,11  | 167,88         | 34,02              | 38,12                |
| 5       | <b>Z-35c</b> | b | <i>n</i> -Bu | 21,40                                  |                                     |   |                |                    |                      |
| 6       | <b>E-35c</b> | b | <i>n</i> -Bu | 17,50                                  |                                     |   |                |                    |                      |

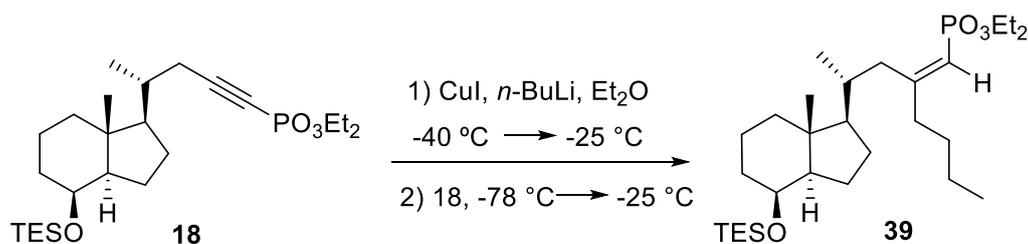
**Tabla 5.** Señales espectroscópicas correspondientes a la asignación estereoquímica de los isómeros *Z/E* de los compuestos **35a**, **35b** y **35c**.

En los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, los protones olefínicos aparecen entre 5,33 – 5,41 ppm como dobletes, con una constante de acoplamiento en el rango de 14,80 a 18,50 Hz; que se corresponden con la  $^2J_{\text{H-P}}$ , confirmando la regioquímica de la adición (**Tabla 5** y **Figura 29**). La estereoquímica de los compuestos **Z/E-35a** y **Z/E-35b**, se estableció teniendo en cuenta los valores de desplazamientos informados para los protones alílicos; los cuales aparecen a campos menores cuando se encuentran en posición *cis* con respecto al grupo fosfónico, en cambio, los que se encuentran en posición *trans*, aparecen a campos mayores (**Figura 29**) [160,190,191]. Además, la estereoquímica de los isómeros *Z/E* se confirmó por  $^{13}\text{C}$ -RMN, teniendo en cuenta los valores de la constante de acoplamiento  $^3J_{\text{C-P}}$  [160,178-180,183,192], ya que la constante  $^3J_{\text{C-P}}$  *trans* aparece en el rango de 21,40 - 22,60 Hz, y es mucho mayor que la constante  $^3J_{\text{C-P}}$  *cis* que aparece en el rango de 4,4 - 7 Hz (**Figura 29**).



**Figura 29.** Señales espectroscópicas correspondientes a la asignación estereoquímica de los isómeros *Z/E* de los compuestos **35a** y **35b**.

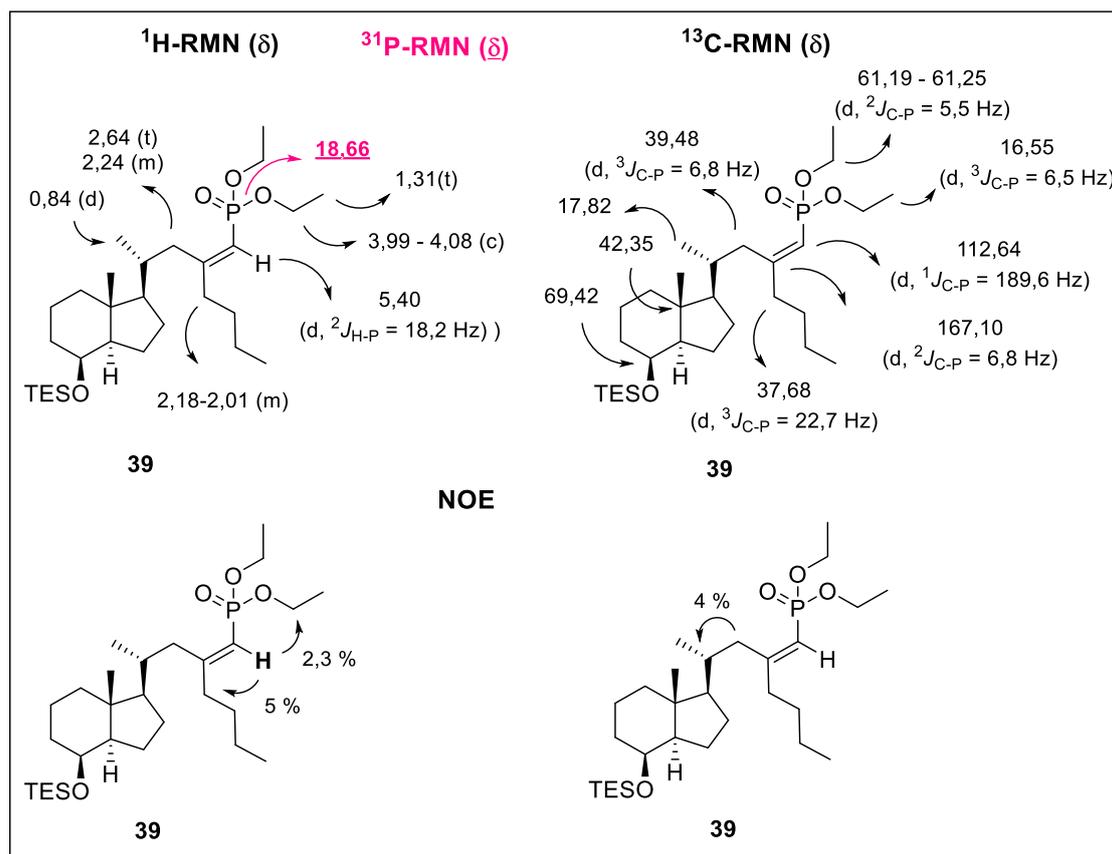
Teniendo en cuenta la experiencia adquirida con los sustratos modelo, nos propusimos realizar la reacción de carbocupación sobre el biciclo CD del análogo EM1 (**Esquema 14**). La reacción de adición del cuprato sobre **18** se llevó a cabo repitiendo el mismo procedimiento que **21** y **24** (**Tabla 4, entrada 3 y 5**). De acuerdo a las condiciones de reacción previamente optimizadas, utilizamos un exceso de 5 equivalentes de cuprato, controlando que la temperatura no sobrepase los  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego de 3 h se elaboró la reacción, verificándose la obtención del vinilfosfonato esperado **39**. El progreso de la reacción se monitoreo por CCF y el producto deseado se purificó por cromatografía en columna. El mismo fue caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{31}\text{P}$ ; y se obtuvo con un rendimiento del 40%, recuperándose un 15% del sustrato de partida. Así mismo, identificamos una cantidad adicional del biciclo CD con la cadena lateral finalizando en el alquino, poniendo en evidencia que, en el transcurso de la reacción, se promueve la ruptura del enlace C-P del alquinilfosfonato.



**Esquema 14.** Carbocupación de 1-alquinilfosfonato **18**.

En la **Figura 30**, se muestran los datos espectroscópicos más representativos del vinilfosfonato **39**, los cuales se establecieron mediante RMN monodimensional ( $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT) y bidimensional de correlación C-H (HSQC) y H-H (COSY). La estereoquímica *Z* del compuesto se estableció por  $^{13}\text{C}$ -RMN a partir de los valores de la constante de acoplamiento  $^3J_{\text{P-C}}$ , y se corroboró mediante estudios NOE.

En cuanto a la estereoquímica de la reacción, verificamos para este caso que la reacción procede con adición *syn*, obteniendo únicamente el isómero *Z*. Esta evidencia, se correlaciona con lo observado en el caso de los sustratos modelo, donde las restricciones estéricas, influían en la relación de isómeros *Z/E*, a medida que son mayores se favorece la formación del isómero *Z*. En el caso particular de EM1, la presencia del biciclo CD en posición  $\beta$  respecto del triple enlace, contribuye a ello.



**Figura 30.** Señales más representativas RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$  y NOE de **39**.

### Síntesis de vinilfosfonatos 1,2,2- trisustituidos

La adición de Michael de nucleófilos seguida por el tratamiento del producto intermedio con distintos electrófilos, permite obtener vinilfosfonatos trisustituidos. Para ello, realizamos ensayos con sustratos modelos para optimizar las condiciones de reacción y así, posteriormente trabajar sobre el biciclo CD del análogo EM1. De este modo, respetamos las condiciones optimizadas para la síntesis de vinilfosfonatos disustituidos. Trabajamos con  $\text{Et}_2\text{O}$  como solvente, bajas temperaturas y 5 equivalentes de exceso del organocuprato formado con respecto al 1-alquiniilfosfonato, preparado en una relación 2:1 de exceso del compuesto organolítico con respecto a la sal de cobre. Transcurridas 3 h de la primera etapa de reacción, se agregó el electrófilo correspondiente, con un exceso de 2 equivalentes respecto del cuprato, y se trabajó a bajas temperaturas hasta llegar a t.a. durante 3 h más, dando la reacción por finalizada (CCF). Los tiempos de reacción fueron mucho menores, a diferencia de lo reportado en la bibliografía. Como se puede observar en la **Tabla 6**, se utilizaron diferentes electrófilos con resultados dispares. En el caso de  $\text{I}_2$ , bromuro de alilo y cloruro de

butilo la reacción fue exitosa, obteniendo los productos deseados con rendimientos buenos del 70% (**Tabla 6, entrada 1**) y 75% (**Tabla 6, entrada 4**), a bajos del 30% (**Tabla 6, entrada 5**). En el caso del yoduro de metilo (**Tabla 6, entrada 2**), acetona (**Tabla 6, entrada 3**) y yoduro de isopropilo (**Tabla 6, entrada 6**), no se verificó la formación de productos recuperando la mayor parte del sustrato de partida.

| $  \begin{array}{ccc}  \text{R}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{PO}_3\text{Et}_2 & \xrightarrow[2) \text{R}''\text{X}]{1) \text{R}'_2\text{CuM}} & \begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{C}=\text{C} \\   \quad   \\ \text{R}' \quad \text{R}'' \end{array} \text{PO}_3\text{Et}_2 \\  \mathbf{24} & & \mathbf{36}  \end{array}  $ <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content; margin-left: auto; margin-right: 0;"> M= Li<br/> X= Cl, Br, I </div> |               |              |  |                  |              |                  |               |               |                       |
|---|---------------|--------------|--|------------------|--------------|------------------|---------------|---------------|-----------------------|
| Entrada <sup>a</sup>  | R             | R'           | R''X   | Reac. Organomet. | Sal de cobre | Cuprato (equiv.) | T (°C)/ t (h) | Producto      | Rend.(%) <sup>b</sup> |
| 1   | <i>n</i> -Hex | <i>n</i> -Bu | I <sub>2</sub>   | <i>n</i> -BuLi   | CuI          | 5                | -78 a -25 / 6 | <i>E</i> -36a | 70                    |
| 2   | <i>n</i> -Hex | <i>n</i> -Bu | MeI  | <i>n</i> -BuLi   | CuI          | 5                | -78 a -25 / 6 | —             | —                     |
| 3   | <i>n</i> -Hex | <i>n</i> -Bu | $\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3\text{CCH}_3 \end{array}$ | <i>n</i> -BuLi   | CuI          | 5                | -78 a -25 / 6 | —             | —                     |
| 4   | <i>n</i> -Hex | <i>n</i> -Bu | H <sub>2</sub> C=CHCH <sub>2</sub> Br                                    | <i>n</i> -BuLi   | CuI          | 5                | -78 a -25 / 6 | <i>Z</i> -36b | 75                    |
| 5   | <i>n</i> -Hex | <i>n</i> -Bu | CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl                       | <i>n</i> -BuLi   | CuI          | 5                | -78 a -25 / 6 | <i>Z</i> -36c | 30                    |
| 6   | <i>n</i> -Hex | <i>n</i> -Bu | (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHI                                      | <i>n</i> -BuLi   | CuI          | 5                | -78 a -25 / 6 | —             | —                     |

<sup>a</sup> Et<sub>2</sub>O como solvente. <sup>b</sup> Rendimiento de la reacción.

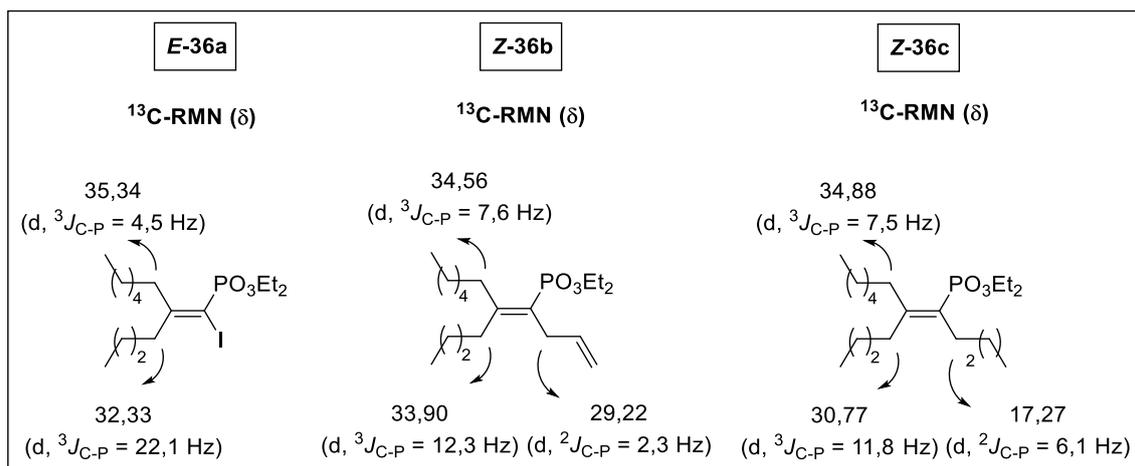
**Tabla 6.** Reacción de carbocupración sobre 1-alquiniulfosfonato para la síntesis de vinilfosfonatos trisustituídos.

Los productos de reacción fueron separados por cromatografía en columna y caracterizados a partir de los espectros de RMN de <sup>13</sup>C y <sup>31</sup>P (**Tabla 7**). El desplazamiento químico de la señal de <sup>31</sup>P-RMN aparece en 9,08 ppm para el compuesto ***E*-36a** (**Tabla 7, entrada 1**); 21,32 ppm para el compuesto ***Z*-36b** (**Tabla 7, entrada 2**) y 21,37 ppm para el compuesto ***Z*-36c** (**Tabla 7, entrada 3**) respectivamente.

| Entrada | Compuesto    | R             | R'           | R''   | <sup>31</sup> P-RMN<br>δ (ppm) | <sup>13</sup> C-RMN δ (ppm) - J <sub>C-P</sub> (Hz) |                |                    |                      |
|---------|--------------|---------------|--------------|---|--------------------------------|---|----------------|--------------------|----------------------|
|         |              |               |              |   |                                | C <sub>1</sub>                                      | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> cis | C <sub>4</sub> trans |
| 1       | <b>E-36a</b> | <i>n</i> -Hex | <i>n</i> -Bu | I   | 9,08                           | -2,56   | 169,68         | 35,34              | 32,33                |
| 2       | <b>Z-36b</b> | <i>n</i> -Hex | <i>n</i> -Bu | H <sub>2</sub> C=CHCH <sub>2</sub>              | 21,32                          | 120,28  | 161,82         | 34,56              | 33,90                |
| 3       | <b>Z-36c</b> | <i>n</i> -Hex | <i>n</i> -Bu | CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> | 21,37                          | 125,01  | 158,82         | 34,88              | 30,77                |

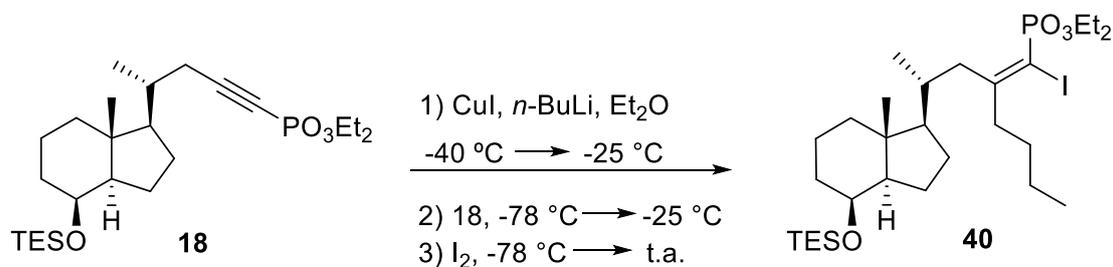
**Tabla 7.** Señales espectroscópicas correspondientes a la asignación estereoquímica de los compuestos **E-36a**, **Z-36b** y **Z-36c**.

La estereoquímica de los compuestos **E-36a**, **Z-36b** y **Z-36c**, se estableció teniendo en cuenta los valores de desplazamientos informados para los carbonos alílicos; que para nuestro caso aparecen entre 29 y 35 ppm. Señales que aparecen a campos mayores (29 ppm), corresponden a carbonos que se encuentran en posición *gem* con respecto al grupo fosfónico, en cambio, aquellos que se encuentran en posición *cis*, aparecen a campos menores (>34 ppm), mientras que las señales correspondientes a carbonos en posición *trans*, aparecen a campos ligeramente menores a las señales del C<sub>cis</sub> respectivo (**Figura 31**). Además, la estereoquímica se corroboró con los valores correspondiente a las <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> en <sup>13</sup>C-RMN, ya que la constante <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> *trans* aparece en el rango de 22,10 - 11,80 Hz, y es mucho mayor que la constante <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> *cis* que aparece en el rango de 4,50 - 7,50 Hz; y la <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> *gem* que aparece en el rango de 2,30 - 6,10 Hz (**Figura 31**).

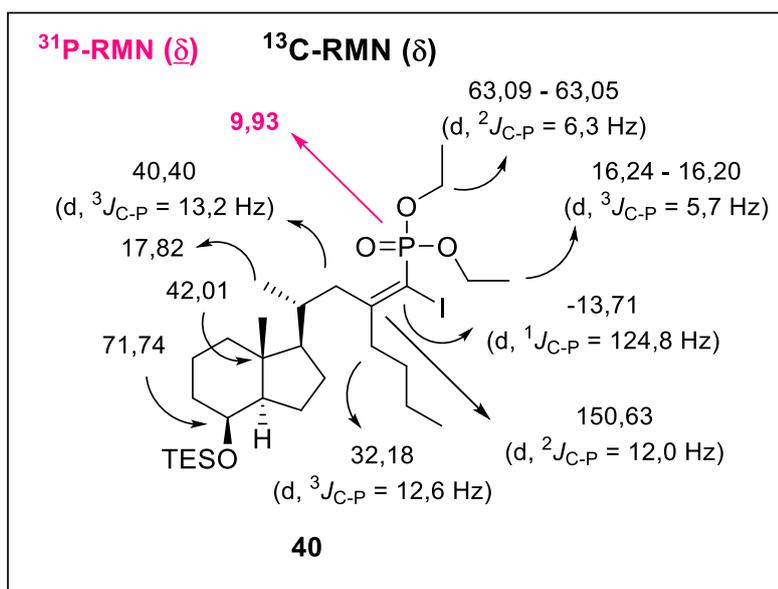


**Figura 31.** Señales de  $^{13}\text{C-RMN}$  correspondientes a la asignación estereoquímica de los compuestos **E-36a**, **Z-36b** y **Z-36c**.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, nos propusimos realizar la reacción de carbocupración sobre el bicyclo CD del análogo EM1 con  $\text{I}_2$  como electrófilo (**Esquema 15**). La reacción de adición del cuprato sobre **18** se llevó a cabo repitiendo el mismo procedimiento que **E-36a** (**Tabla 7**, **entrada 1**). De acuerdo a las condiciones de reacción previamente optimizadas, utilizando un exceso de 5 equivalentes de cuprato y controlando que la temperatura no sobrepase los  $-25\text{ }^\circ\text{C}$ , Luego de 6 h se elaboró la reacción, verificándose la obtención del vinilfosfonato esperado **40**. La misma, fue monitoreada por CCF y el producto deseado, se determinó a partir de la intensidad y el desplazamiento de la señal de  $^{31}\text{P-RMN}$  del crudo de reacción, obteniéndose un rendimiento 48% y un desplazamiento de fósforo de 9,93 ppm. En la **Figura 32**, se muestran los datos espectroscópicos más representativos del vinilfosfonato **40** ( $^{13}\text{C-RMN}$ ,  $^{31}\text{P-RMN}$ ).



**Esquema 15.** Carbocupración de 1-alquínifosfonato **18**.

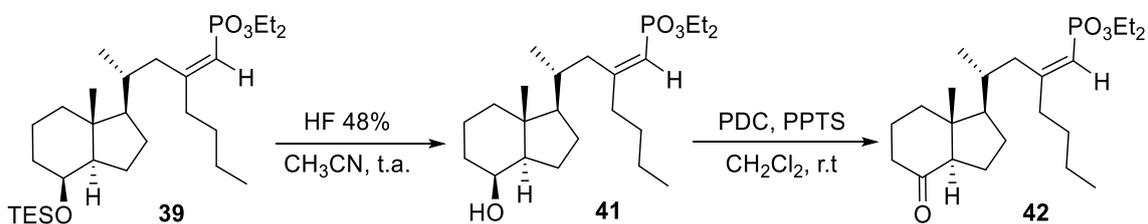


**Figura 32.** Señales más representativas RMN de  $^{31}\text{P}$  y  $^{13}\text{C}$  de **40**.

Llegados a este punto, y atendiendo al hecho de abordar los objetivos planteados en el capítulo 2, decidimos avanzar con la síntesis de un análogo, que incorpore un vinilfosfonato 2,2-disustituido en su cadena lateral.

## 2.5- Síntesis de la cetona tipo Grundmann **42**.

De acuerdo a los resultados descriptos anteriormente (**Esquema 14** y **Figura 30**), procedimos a la desprotección del compuesto **39** para luego sintetizar la cetona de Grundmann **42** (**Esquema 16**).

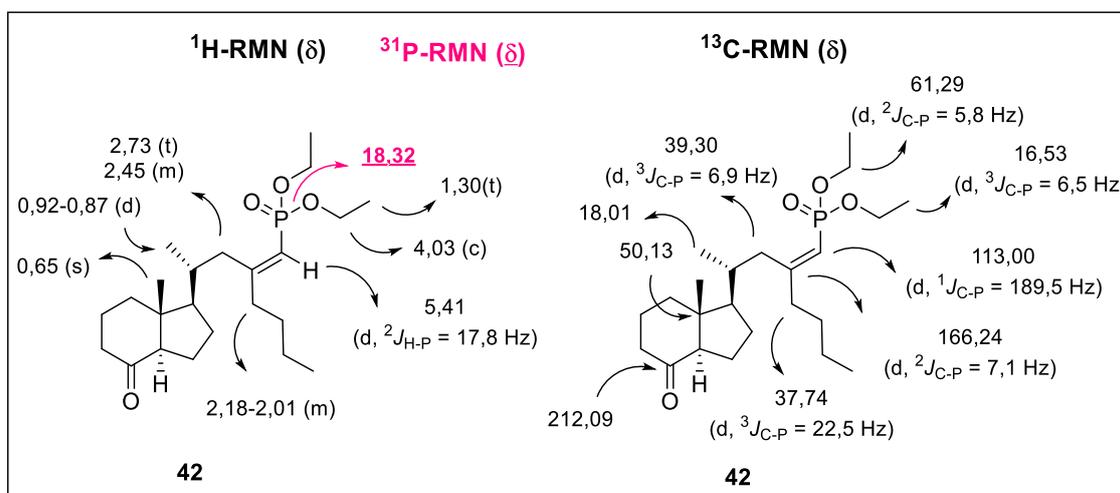


**Esquema 16.** Síntesis de la cetona tipo Grundmann **42**.

Para llevar a cabo este proceso, se realizó la desprotección del grupo silil éter en condiciones ácidas, utilizando HF 48% a temperatura ambiente y acetonitrilo como

solvente. Esta reacción demanda tiempos cortos y procede con excelentes rendimientos. De este modo, se obtuvo el alcohol esperado **41** con un 95% de rendimiento. Posteriormente, y sin previa purificación, se oxidó el alcohol **41** utilizando PDC y cantidades catalíticas de PPTS. La cetona tipo Grundmann **42**, con la cadena lateral fosforada, se obtuvo con un 67% de rendimiento, luego de su purificación por cromatografía en columna.

En la **Figura 33**, se muestran las señales más representativas de  $^{13}\text{C}$ -RMN,  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{31}\text{P}$ -RMN de la cetona **42**.

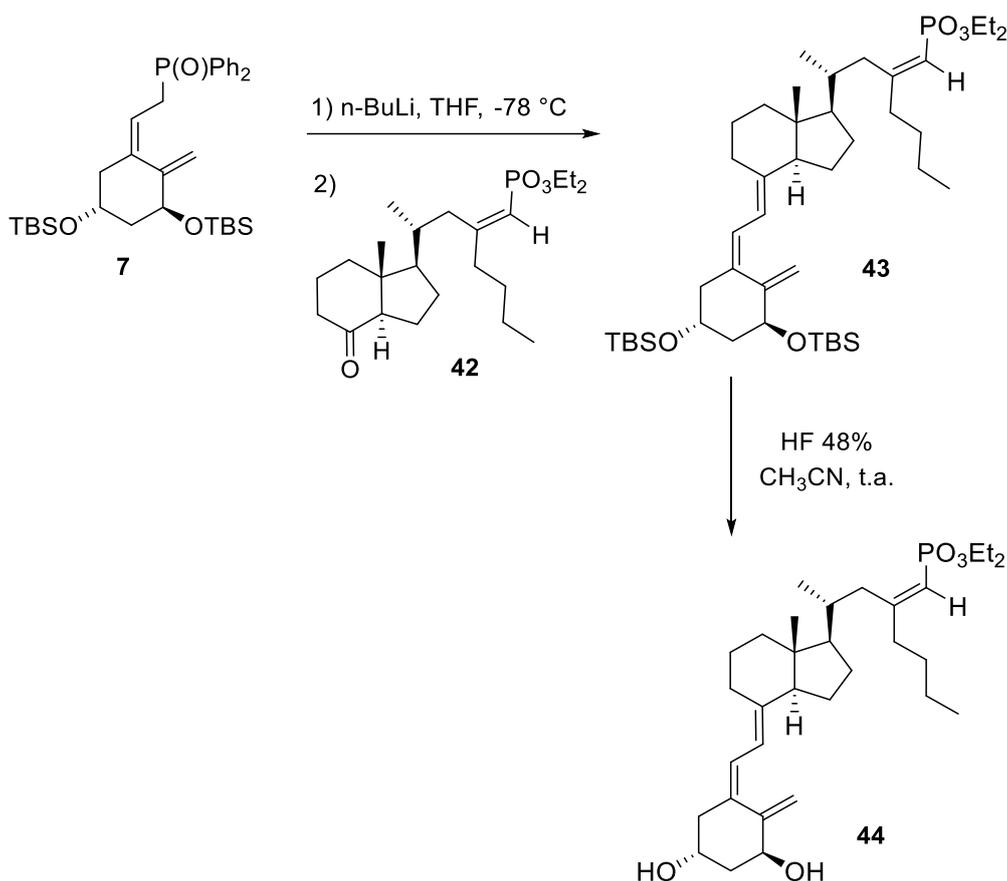


**Figura 33.** Señales más representativas RMN de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  y  $^{31}\text{P}$  de **42**.

## 2.6- Construcción del sistema triénico

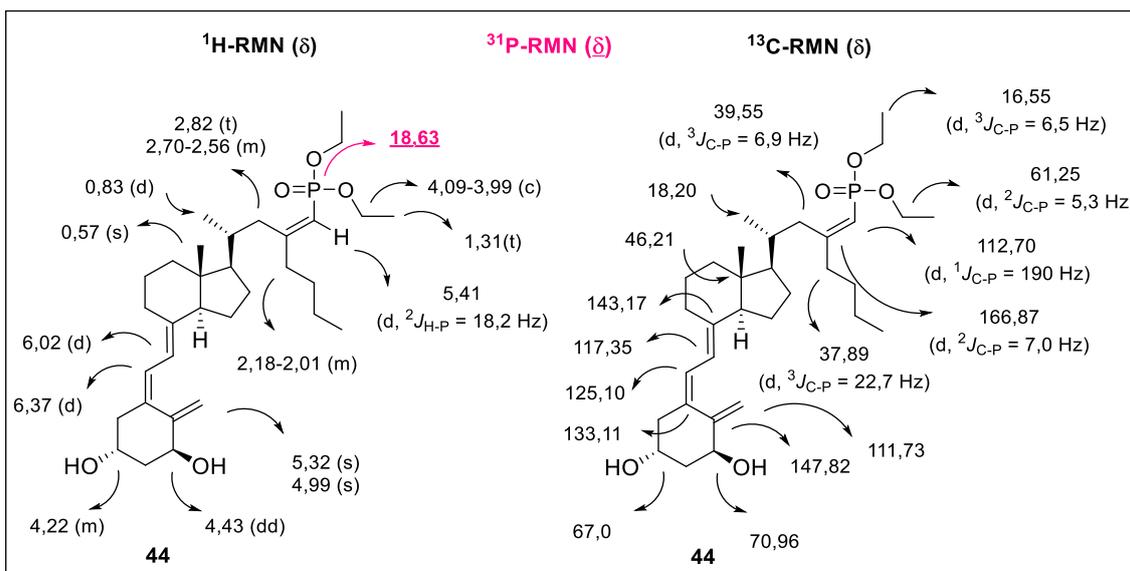
La construcción del sistema triénico se realizó mediante el acoplamiento de Wittig-Horner, entre la cetona **42** con la cadena lateral modificada y el óxido de fosfina **7**. La reacción se llevó a cabo utilizando un exceso del iluro correspondiente al óxido de fosfina **7** con respecto a **42** (**Esquema 17**). Adición lenta de *n*-BuLi sobre una solución del óxido de fosfina, a  $-78^\circ\text{C}$  y utilizando THF como solvente, dio lugar a la formación del iluro, que se evidenció por su color rojo característico. Posteriormente, sobre la solución coloreada, se agregó a la misma temperatura, la cetona **42**. Transcurridas 5 horas en ausencia de luz y las mismas condiciones de temperatura, se da por finalizada la reacción. Luego de la elaboración, se separó por cromatografía en columna el análogo **43** con un 49% de rendimiento, recuperándose además el exceso de óxido de fosfina empleado.

A continuación, realizamos la desprotección de los grupos silil éter a temperatura ambiente y en condiciones ácidas, utilizando HF 48% y acetonitrilo como solvente. Por último, y para cumplir con los requerimientos de pureza de los ensayos biológicos, se realizó la correspondiente purificación mediante cromatografía preparativa, empleando solventes con grado de pureza HPLC, para obtener finalmente el análogo deseado **44**, con un rendimiento del 40%.



**Esquema 17.** Síntesis del análogo **44**.

En la **Figura 34**, se muestran las señales más representativas de RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  y  $^{31}\text{P}$  del análogo **44**. El análisis de  $^{31}\text{P}$ -RMN muestra una única señal en 18,63 ppm, la cual se corresponde con el desplazamiento esperado para el átomo de fósforo unido a un carbono con hibridación  $\text{sp}^2$ . Por otro lado, se determinó por espectroscopia UV la absorción correspondiente al sistema triénico y coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) para el análogo SG, los cuales fueron UV ( $i\text{-PrOH}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  253 nm,  $\lambda_{\text{min}}$  232 nm ( $\epsilon$ : 2.688,8  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 34.** Señales más representativas RMN de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  y  $^{31}\text{P}$  del análogo **44**.

De este modo, logramos sintetizar un nuevo análogo del calcitriol modificado en la cadena lateral como vinilfosfonato, mediante una estrategia sintética convergente, en 10 etapas desde el alcohol **11**.

## CAPÍTULO 2

### Ensayos biológicos de la actividad antitumoral del análogo SG y estudios computacionales

#### 1- Ensayos biológicos

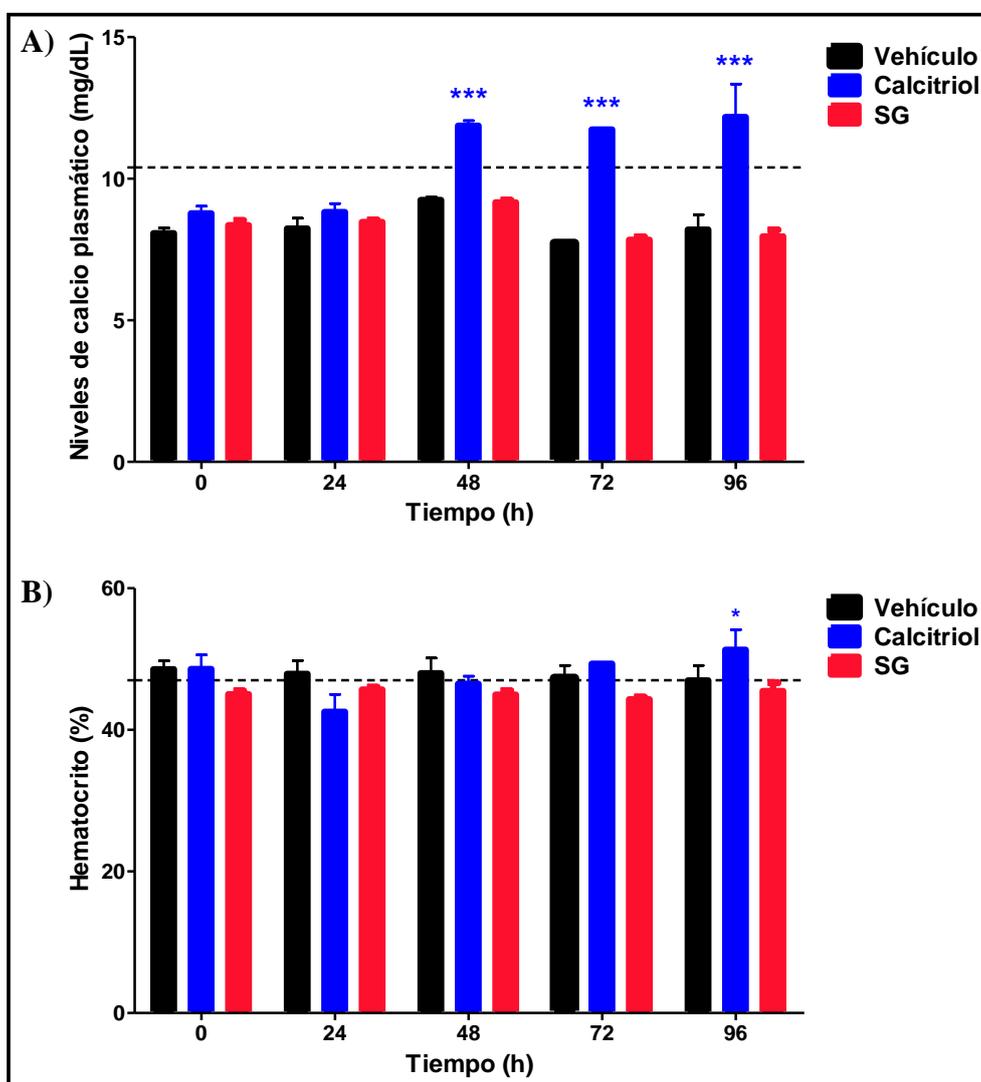
##### 1.1- Ensayos *in vivo*

##### 1.1.1- Estudio del efecto del análogo SG sobre los niveles plasmáticos de calcio en ratones y parámetros tóxicos en animales

Como hemos mencionado anteriormente, el calcitriol y muchos de sus análogos producen hipercalcemia como efecto secundario, limitando la dosis terapéutica para el tratamiento del cáncer. Es por ello, que al sintetizar nuevos análogos se busca que posean poca o nula actividad calcemiantes con el fin de poder administrar la dosis necesaria para ejercer la acción antitumoral. Por esta razón, resulta importante evaluar la actividad calcémica de los mismos. Por lo tanto, en primer lugar y cumpliendo con nuestro segundo objetivo planteado para este trabajo de Tesis Doctoral, es que evaluamos el efecto calcemiantes del análogo SG mediante ensayos *in vivo*. Para ello, se inyectó el análogo vía intraperitoneal, con posterior análisis de los niveles de calcio plasmático. La elección de la dosis a ensayar, se eligió tomando como base estudios previos llevados a cabo por otros laboratorios. Uno de estos trabajos demuestra en ensayos farmacocinéticos que el calcitriol administrado intraperitonealmente en una única dosis de 0,125  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  (aproximadamente 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso) resulta en una concentración máxima de calcitriol plasmático a las 24 h de 12 ng/mL y en un área debajo de la curva (AUC) de 47 ng.h/mL [193]; siendo esta concentración superior a la necesaria para la acción antitumoral demostrada en modelos murinos [194,195]. Otros grupos también demostraron que ocurría reducción de la carga tumoral en ratones con la administración de calcitriol o análogos en dosis menores a 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso [196-198]. Es por ello que elegimos, para llevar a cabo los estudios de calcemia, comenzar evaluando una dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Se realizaron extracciones de sangre del seno retro-orbital seguidas de la inyección de los análogos a las 0, 24, 48, 72 y 96 h, con posterior análisis de los niveles de calcio plasmáticos de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos. Los valores de referencia para el calcio sérico reportado para

ratones son de 8,8 a 10,4 mg/dl [199]. Asimismo, dicho rango es coincidente con el de los humanos que es de 8,5 - 10,5 mg/dL [200].

Como se muestra en la **Figura 35**, el tratamiento de ratones CF1 con el análogo SG no afectó los niveles de calcio plasmático a todos los tiempos ensayados, comparando estos resultados con los tratados con el vehículo. El mismo resultado fue previamente reportado para el análogo EM1, el cual no modificó los niveles de calcio en plasma, luego de 4 días de tratamiento con dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso [137]. Por lo tanto, tanto el análogo SG como el EM1 carecen de actividad hipercalcemiente a la misma dosis y durante el mismo período de tratamiento.

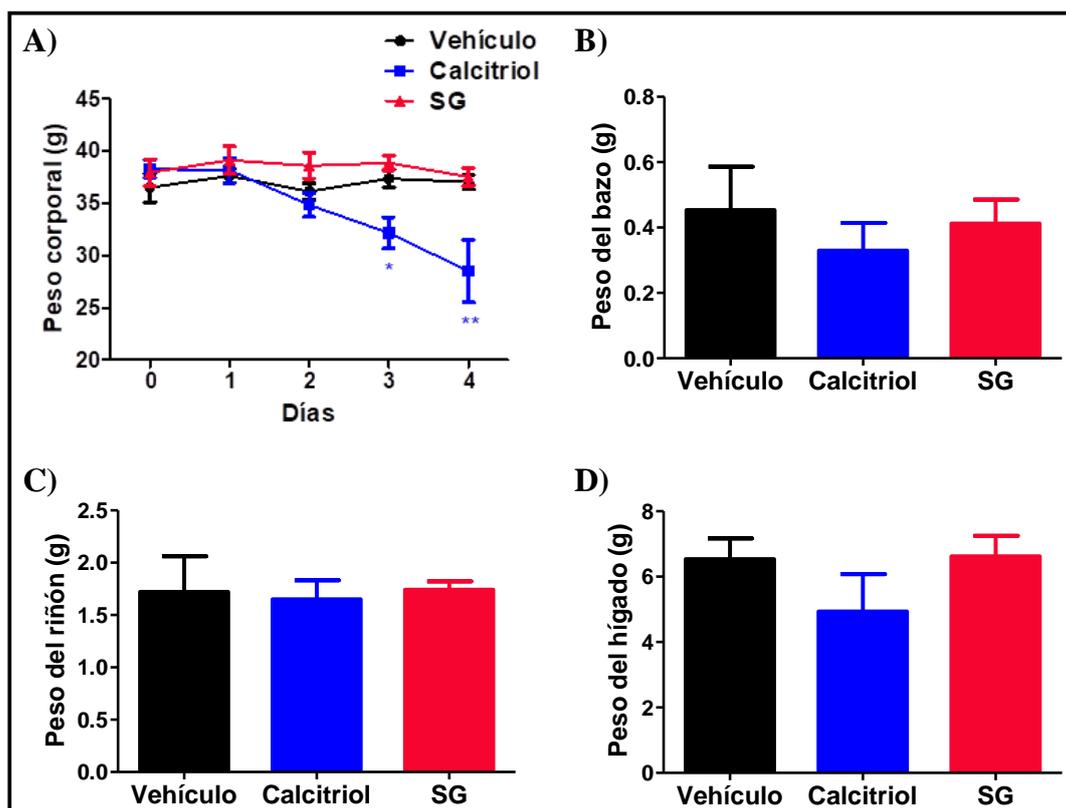


**Figura 35.** A) Niveles de calcio plasmático en ratones CF1. Los animales fueron inyectados diariamente con 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal de análogo SG, calcitriol o vehículo, por vía intraperitoneal durante un período de 96 h. Se midió el calcio plasmático antes de la inyección de los compuestos (0 h, niveles basales) y a las 24, 48,

72 y 96 h. B) Hematocrito. Los valores mostrados corresponden al promedio  $\pm$  SD de seis animales en cada grupo. La línea punteada indica el límite superior del rango de calcemia y hematocrito normal. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al vehículo.

A diferencia del análogo SG (**Figura 35A**) y el EM1 previamente informado [137], el tratamiento con calcitriol causó hipercalcemia a partir de las 48 h de tratamiento, en comparación con los animales tratados con vehículo. Además, como se muestra en la **Figura 35B**, no se observaron alteraciones en el hematocrito para los ratones tratados con SG, y los animales permanecieron vivos y sanos durante el período de examinación.

Por otra parte, el tratamiento con el análogo SG al igual que el tratamiento con el análogo EM1, no causó la muerte de ningún ratón ni produjo signos insalubres en ellos. Sin embargo, algunos de los animales tratados con calcitriol murieron antes de finalizado el tratamiento, y los que permanecieron vivos, además de presentar un aumento en los niveles de calcio en plasma, mostraron la aparición de conjuntivitis, escalofríos y sed, los cuales son síntomas y signos que se han asociado con hipercalcemia [201]. Como se esperaba, también se observó un incremento en el hematocrito en los animales tratados con calcitriol (**Figura 35B**), siendo los niveles normales entre 39 y 47, lo cual se considera un signo de intoxicación [202,203]. Por otra parte, no se observaron alteraciones en el peso corporal de los animales, ni en el peso y morfología macroscópica de los órganos internos como el hígado, el bazo y los riñones en los ratones tratados con SG (**Figura 36**). Por lo tanto, el análogo SG parece ser bien tolerado, con parámetros tóxicos similares a los obtenidos para el análogo EM1 [137].



**Figura 36.** A) Peso corporal de los ratones durante el período de tratamiento. B) Peso del bazo al final del tratamiento. C) Peso del riñón al final del tratamiento. D) Peso del hígado al final del tratamiento.

## 1.2- Ensayos *in vitro*

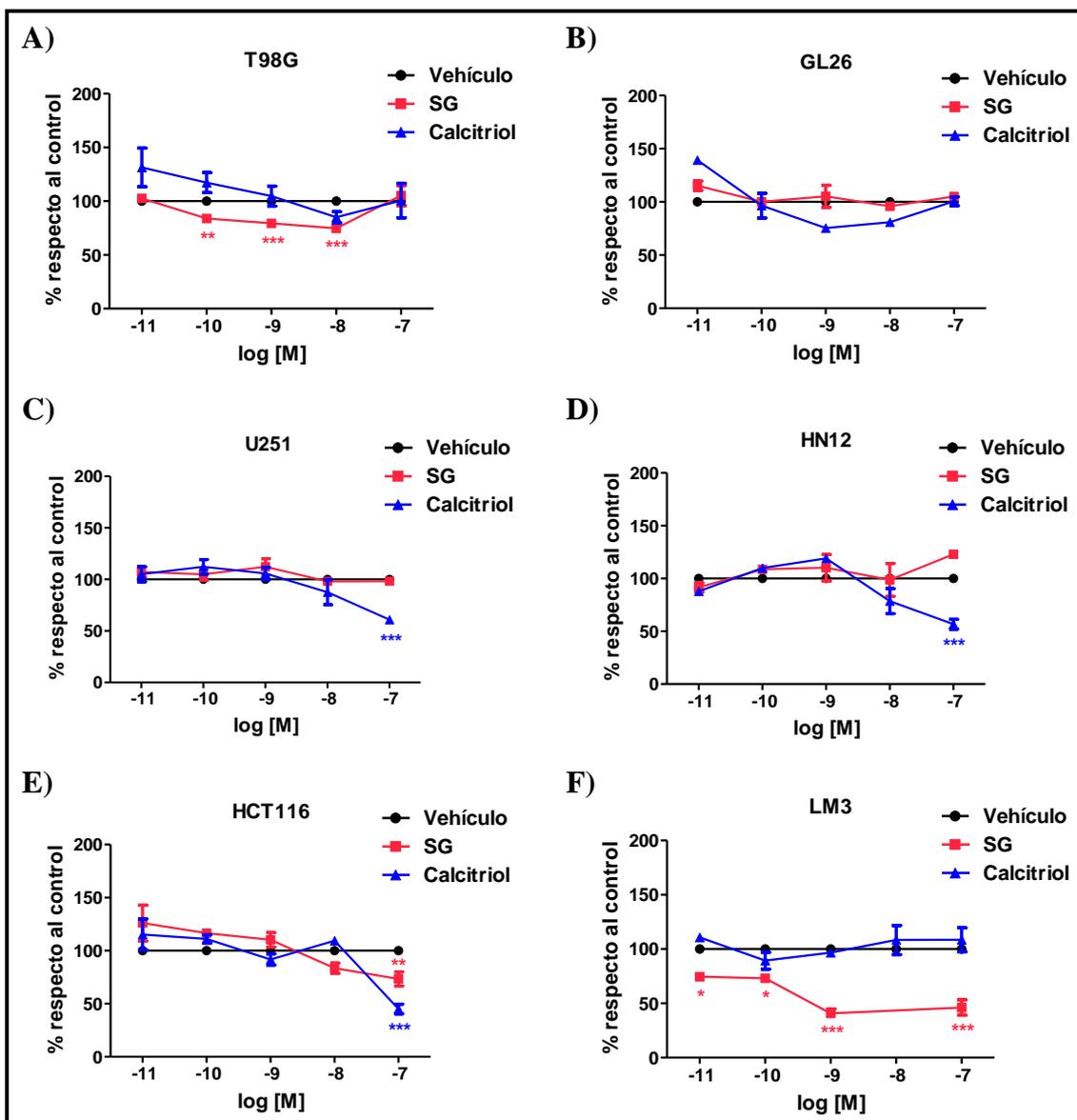
### 1.2.1- Estudio del efecto del análogo SG sobre la viabilidad celular

Uno de los primeros estudios que se llevan a cabo con el fin de comenzar a evaluar si un determinado compuesto presenta propiedades antitumorales, es determinar su efecto *in vitro* sobre la viabilidad celular de distintas líneas celulares de cáncer. Definimos a la *viabilidad celular* como la proporción de células que sobreviven a alguna situación particular; específicamente aquí se refiere al número de células vivas o viables luego del tratamiento con el compuesto en estudio. Si el número de células hallado en la condición experimental es menor al de la condición control esto podría deberse a que el análogo produjo una alteración en el ciclo celular y/o un incremento de la muerte celular en las células de la línea en estudio.

Para la selección de las concentraciones y los tiempos de tratamiento a utilizar, realizamos una revisión bibliográfica de las concentraciones de acción fisiológicas del

calcitriol [44,204] y de análogos probados en ensayos *in vitro* [96,205-207] y decidimos tratar a las células con un rango amplio de concentraciones del análogo SG (0,01; 0,1; 1; 10; 100 nM) y a diferentes tiempos de tratamiento (24, 48, 72, 96, 120 h). Además, las concentraciones y tiempos de tratamiento elegidos fueron los mismos que se utilizaron para el análogo EM1 [137,168,169]. De este modo, se pudo comparar la relación estructura-actividad de ambos análogos y el efecto ejercido por el calcitriol. Para llevar a cabo este ensayo, empleamos la técnica de conteo manual en cámara de Neubauer, dado que es un método económico y rápido. En aquellas líneas celulares que mostraron disminución significativa de la viabilidad celular, se calcularon las concentraciones inhibitorias 50 (IC<sub>50</sub>).

Como se muestra en la **Figura 37**, el análogo SG ejerce una ligera disminución en la viabilidad celular de las líneas T98G (A), HCT116 (E) y LM3 (F), en comparación con el vehículo. Específicamente, el efecto ejercido por el análogo SG en las células T98G (**Figura 37A**), fue similar al ejercido por el análogo EM1 [137]. Ambos análogos disminuyeron la viabilidad celular a 0,1 nM y 120 h de tratamiento (media del SG = 83,97% vs. media del vehículo = 100%, \*\* $p < 0,01$ ; media del EM1 = 41,52% vs. media del vehículo = 100%, \*\*\* $p < 0,001$ ). El calcitriol no afectó la viabilidad de las células T98G (**Figura 37A**) bajo ninguna dosis ensayada. Con respecto a las células HCT116, la disminución de la viabilidad celular causada por el análogo SG (**Figura 37E**), fue menor que la ejercida por el calcitriol (media del SG = 73,44% vs. media del vehículo = 100%, \*\* $p < 0,01$ ; media del calcitriol = 45,04% vs media del vehículo = 100%, \*\*\* $p < 0,001$ ), pero mayor que la ejercida por el análogo EM1, el cual no afectó a la viabilidad de estas células luego de 72 h de tratamiento [137] e incluso, luego de 120 h de tratamiento. Finalmente, como se muestra en la **Figura 37F**, el análogo SG disminuyó la viabilidad de las células LM3 a una concentración de 0,01 nM (media del SG = 74,59% vs media del vehículo = 100%, \* $p < 0,05$ ), mientras que el calcitriol y el análogo EM1, no afectaron la viabilidad de estas células luego de 72 h de tratamiento [137] e incluso, luego de 120 h de tratamiento. Sin embargo, el análogo EM1 disminuyó la viabilidad de otras líneas celulares tumorales mamarias (T47D y LM05e) luego de 72 h de tratamiento [137].



**Figura 37.** Ensayo dosis-respuesta del análogo SG y el calcitriol evaluando la viabilidad celular. (A) T98G (B) GL26 (C) U251 (D) HN12 (E) HCT116 (F) LM3. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas (0,01-100 nM) de análogo, calcitriol o vehículo (isopropanol) por 120 h. Cada punto representa el promedio de cuatro réplicas de un mismo experimento  $\pm$  SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*  $p < 0,05$ ; con respecto al vehículo.

En la **Tabla 8**, se muestra la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) de las líneas celulares que respondieron a los tratamientos con SG, en comparación con la  $IC_{50}$  para el calcitriol y el EM1. Estos valores de  $IC_{50}$  reflejan las comparaciones previamente detalladas entre el efecto de los tres compuestos en las células T98G, HCT116 y LM3.

| IC <sub>50</sub> : concentración de compuesto necesaria para reducir la viabilidad celular al 50 % (nM). |            |            |             |
|--|------------|------------|-------------|
| Línea celular  | Análogo SG | Calcitriol | Análogo EM1 |
| T98G   | 5,33       | -          | 7,262       |
| HCT116   | 3,13       | 0,433      | -           |
| LM3  | 0,19       | -          | -           |

**Tabla 8.** IC<sub>50</sub> de las líneas que respondieron al tratamiento (nM) con el análogo SG y calcitriol durante 120 h. Las IC<sub>50</sub> corresponden a un promedio de los tres ensayos independientes.

Por otro lado, el análogo SG no afectó la viabilidad de las células GL26 (B), U251 (C) y HN12 (D), en comparación con el vehículo. Por el contrario, el análogo EM1 fue capaz de disminuir la viabilidad de las células GL26 y HN12 [137].

El calcitriol y sus análogos muestran efectos diferenciales según el tipo de cáncer. La razón de esta respuesta diferencial es en cierta medida desconocida y depende de los factores discutidos previamente [58,130,208,209]. Las diferencias en el metabolismo del calcitriol o los análogos por la enzima 24-hidroxilasa (CYP24A1) también podrían explicar las diferentes respuestas celulares observadas [58,210].

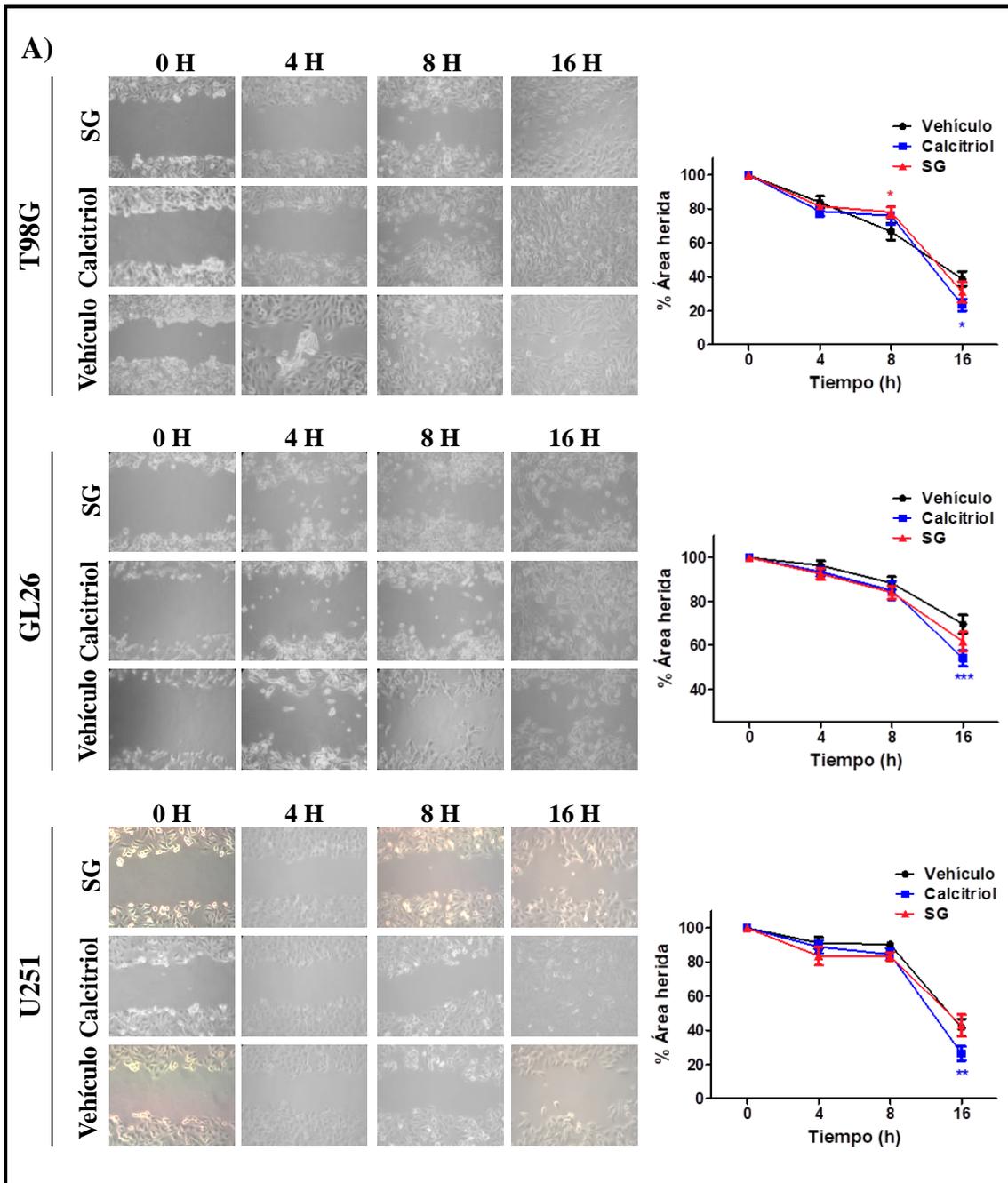
Como se describió previamente, el análogo EM1 podría presentar limitaciones en su metabolismo a través de la 24-hidroxilación debido a la presencia de un triple enlace entre los carbonos 23 y 24 [137,211]. En este caso, el análogo SG también puede presentar limitaciones en su metabolismo debido a la presencia de un doble enlace entre los carbonos 23 y 24. Esto es muy relevante en las células que muestran una mayor actividad de la enzima 24-hidroxilasa (CYP24A1), como en las células tumorales de glioma [212], astrocitos [213], y también en colon, ovario, tumores de pulmón [214] y próstata [215].

### 1.2.2- Efecto del análogo SG sobre la migración celular

Se ha demostrado que una de las capacidades adquiridas por las células cancerosas es la invasividad. Durante la progresión tumoral, esta capacidad migratoria de las células cancerosas es una significativa habilidad para poder lograr la metástasis. Por esta razón,

es importante evaluar el potencial de diferentes tipos de fármacos para disminuir la migración celular. Según estudios ya reportados, el calcitriol y sus análogos modulan el proceso de migración celular en varios tipos celulares tumorales [78,216]. Por este motivo, nos propusimos evaluar si este era el caso del análogo SG. Para analizar esto, realizamos un ensayo de cierre de la herida o “wound healing” en varias líneas celulares de cáncer [217].

Como se muestra en la **Figura 38A** y **B**, se realizó la herida a las monocapas confluentes de las células T98G, GL26, U251, HN12, HCT116 y LM3. El cierre de la herida se observó por microscopía óptica durante 16 h de tratamiento. Bajo tratamiento con el análogo SG (0,1 nM), solo las líneas celulares T98G y LM3 disminuyeron su capacidad migratoria. Tal efecto se observó a las 8 h de tratamiento. En este tiempo, el área de la herida en las células T98G tratadas con SG fue de 78,11% en comparación con el 66,66% en las células tratadas con vehículo (\* $p < 0,05$ ; **Figura 38A**). En las células LM3, el área de la herida bajo tratamiento con el análogo SG fue de 63,38% en comparación con el 54,25% bajo tratamiento con vehículo (\* $p < 0,05$ ; **Figura 38B**). Por otro lado, la capacidad migratoria de las líneas celulares GL26, U251 (**Figura 38A**), HN12 y HCT116 (**Figura 38B**) no se vio afectada por el tratamiento con el análogo SG. En contraste, el calcitriol aumentó la capacidad migratoria de las tres líneas celulares de glioma después de 16 horas de tratamiento, en comparación con el vehículo (**Figura 38A**).



**Figura 38.** Evaluación de la migración celular luego del tratamiento con SG y calcitriol sobre las líneas celulares (A) T98G, GL26, U251, (B) HN12, HCT116 y LM3 a las 0, 4, 8 y 16 h de tratamiento. Las células fueron expuestas a la concentración de 0,1 nM de SG, calcitriol o vehículo. El área de la herida se midió y cuantificó a diferentes intervalos con ImageJ 1,37 v. El experimento se repitió tres veces. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

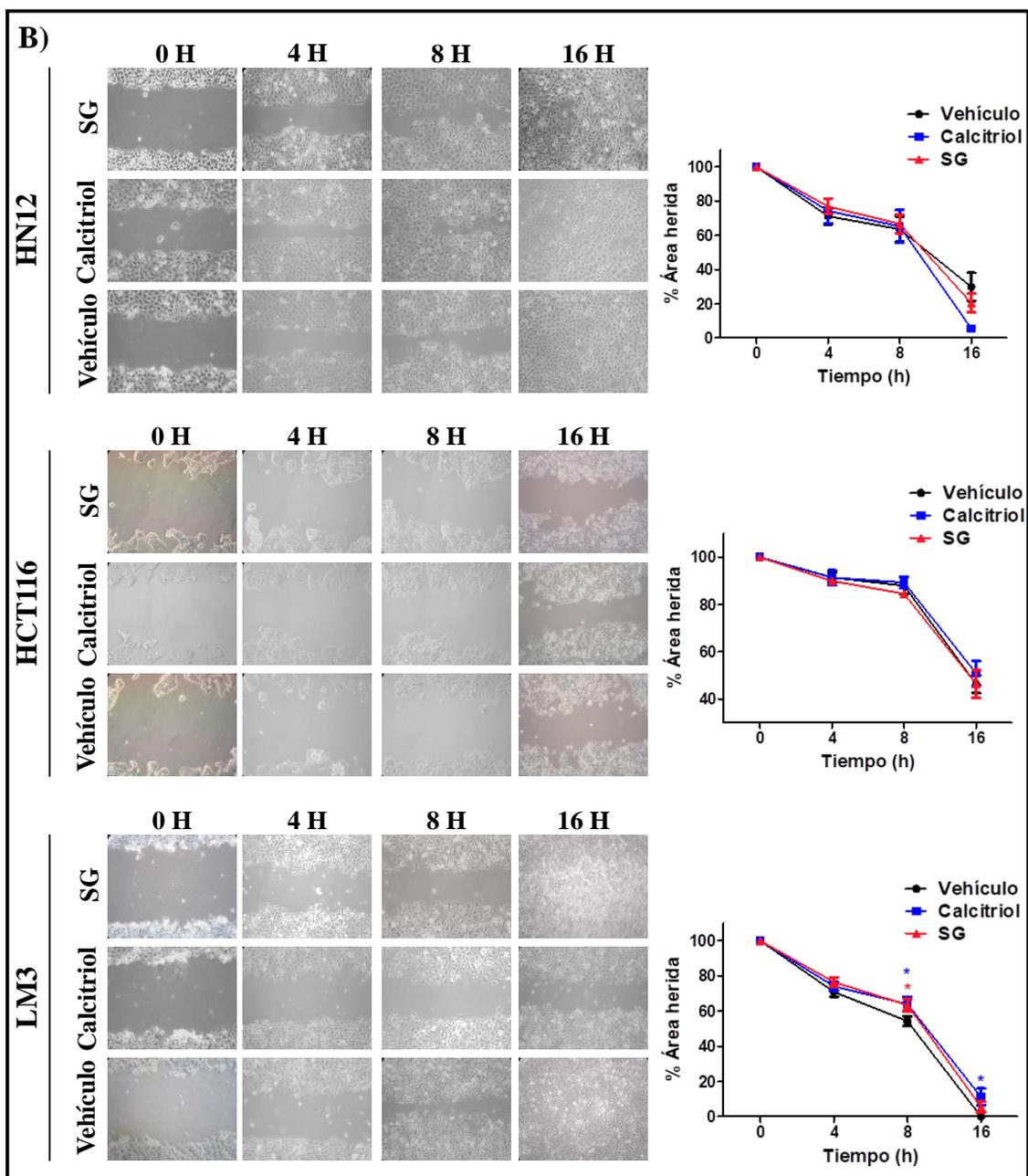


Figura 38. (continuación).

## 2- Ensayos computacionales

### 2.1- Unión del análogo SG al VDR: Estudios de modelado molecular

En el presente estudio, analizamos la interacción farmacodinámica entre el análogo SG y el VDR, teniendo en cuenta, como se describió en la sección “Introducción”, que las acciones biológicas del calcitriol pueden estar mediadas por el receptor VDR, tanto a nivel genómico como no genómico [34], regulando de este modo, numerosos genes y

vías de transducción de señales, a través de su unión al VDR. A esto se le suma el hecho de que informamos previamente que el potente efecto antitumoral del análogo EM1 en algunos tipos de cáncer [137,168,169], podría ser, debido a su elevada afinidad con el VDR, tal como ocurre con el calcitriol [169]. Por lo tanto, para cumplir con el cuarto objetivo propuesto para este trabajo de tesis doctoral, realizamos los estudios *in silico*, empleando el VDR-LBD humano. Para el mismo, incluimos las técnicas de acoplamiento (docking) molecular, dinámica molecular (DM) y análisis de energía libre de unión para modelar la interacción SG:VDR, realizando un análisis comparativo con nuestros resultados obtenidos previamente relacionando el calcitriol y el análogo EM1 [169].

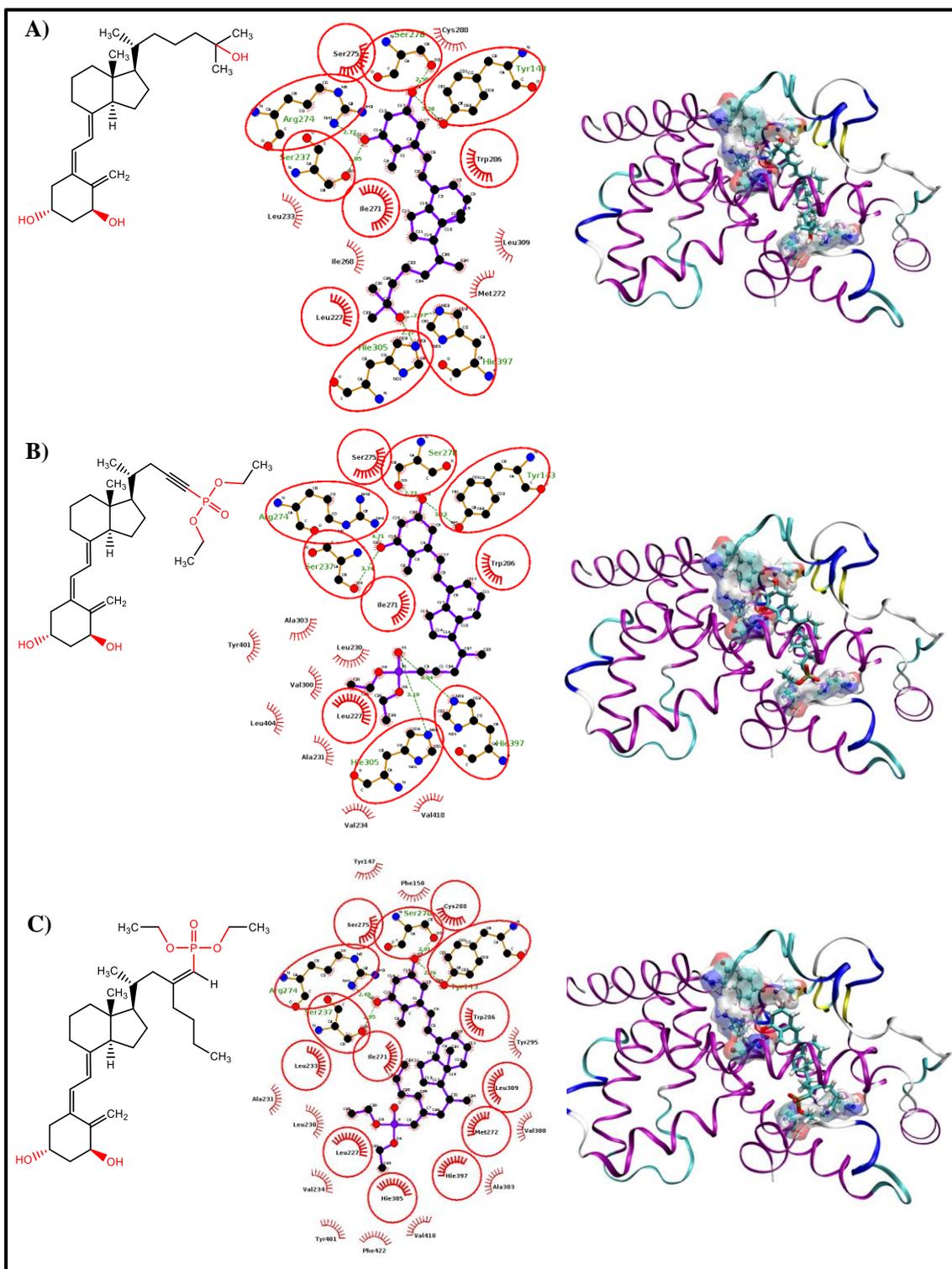
En el año 2000, el modo de unión entre el calcitriol y el dominio de unión al ligando del VDR fue revelado mediante análisis de rayos X [48]. Se demostró que el calcitriol forma puentes de hidrógeno con seis residuos (Ser237, Arg274, Ser278, Tyr143, His305 e His397), lo que resulta en una energía de unión específica [48,49,51]. En este sentido, se sabe que la afinidad de unión de los fármacos está asociada a los cambios en la energía libre de Gibbs y estos cambios pueden explicar la actividad diferencial de los diferentes análogos [49].

## 2.2- Estudio de docking molecular

Con el fin de analizar y comparar la afinidad del calcitriol, EM1 y SG con el VDR, realizamos los estudios de docking molecular, basados en la estructura cristalográfica previamente informada [48]. La **Figura 39** presenta los complejos intermoleculares obtenidos de los ensayos de docking molecular, destacando las principales interacciones intermoleculares que identificamos. La **Figura 39A** representa las interacciones observadas para el complejo calcitriol:VDR, en el que se encontraron todas las interacciones previamente identificadas como críticas para la modulación alostérica al VDR [48,49]. Las interacciones más importantes para la unión involucraron enlaces puente de hidrógeno del ligando al VDR con el oxidrilo en posición 1 (1-OH) formando dos enlaces puente de hidrógeno con los residuos Ser237 y Arg274, mientras que el oxidrilo en posición 3 (3-OH) establece dos enlaces puente de hidrógeno adicionales con los residuos Tyr143 y Ser278. Además, se forman dos enlaces puente de hidrógeno entre el oxidrilo en posición 25 (25-OH) con los residuos His305 y His397, dos interacciones que son cruciales para la modulación de la funcionalidad del VDR ya que

conducen a cambios conformacionales significativos que afectan su funcionalidad, es decir, la modulación alostérica.

Asimismo, se observa una red de interacciones hidrofóbicas entre el calcitriol y el VDR. Como se informó anteriormente [169], el modo de unión observado para el EM1 es homólogo al de calcitriol (**Figura 39B**), manteniendo la red de puentes de hidrógeno mencionada anteriormente, y además se puede observar un número significativamente mayor de contactos hidrofóbicos. Cuando se analizó la unión de SG al VDR (**Figura 39C**), observamos que las interacciones puente de hidrógeno entre el oxidrilo en posición 1 (1-OH) y el oxidrilo en posición 3 (3-OH) del análogo con el VDR estaban presentes, mientras que no se observó la interacción correspondiente con los aminoácidos His305 y His397. Además, se observó una cantidad significativa de interacciones hidrofóbicas. Este comportamiento farmacodinámico diferencial del análogo SG con respecto al análogo EM1 y al calcitriol se evidencia por la presencia del grupo vinilo de la cadena lateral, el cual debido a la presencia de los carbonos sp<sup>2</sup>, tiene la capacidad para moverse más libremente en el espacio y además, teniendo en cuenta que es un grupo voluminoso por la presencia del butilo en el carbono 23, todo esto hace que esté acomodándose dentro de la cavidad hidrofóbica, comprometiendo de este modo, el establecimiento de los enlaces puente de hidrógeno con los aminoácidos His305 e His397. Para seguir estudiando la unión del análogo SG al VDR, y para complementar la naturaleza estática de las técnicas de docking molecular, sometimos los correspondientes complejos intermoleculares a simulaciones de dinámica molecular (DM) en condiciones explícitas de solventes.



**Figura 39.** Estudios de docking molecular. Estructuras químicas y unión de (A) Calcitriol, (B) Análogo EM1 y (C) Análogo SG al VDR. Los residuos resaltados corresponden a las interacciones intermoleculares compartidos entre los análogos y el calcitriol con el VDR.

Los análisis estructurales mostraron que el calcitriol, el análogo EM1 y el análogo SG permanecieron unidos al LBD del VDR durante los 100 ns de simulación. Para evaluar cuantitativamente la persistencia de la red de enlaces puente de hidrógeno observado en los ensayos de docking, se cuantificó el porcentaje de ocupación de cada interacción (**Tabla 9**).

|        | Ocupación (%) de cada interacción de los diferentes compuestos al LBD de VDR. |     |    |
|--------|---|-----|----|
|        | Calcitriol  | EM1 | SG |
| Ser237 | 74  | 75  | 73 |
| Tyr143 | 43  | 30  | 27 |
| Ser278 | 61  | 31  | 49 |
| Arg274 | 15  | 62  | 53 |
| His305 | 30  | 48  | 10 |
| His397 | 22  | 36  | 16 |

**Tabla 9.** Estudios de docking molecular. Ocupación (%) de las interacciones más importantes para la unión, involucrando enlaces puente de hidrógeno entre calcitriol, análogo EM1 y análogo SG con el VDR.

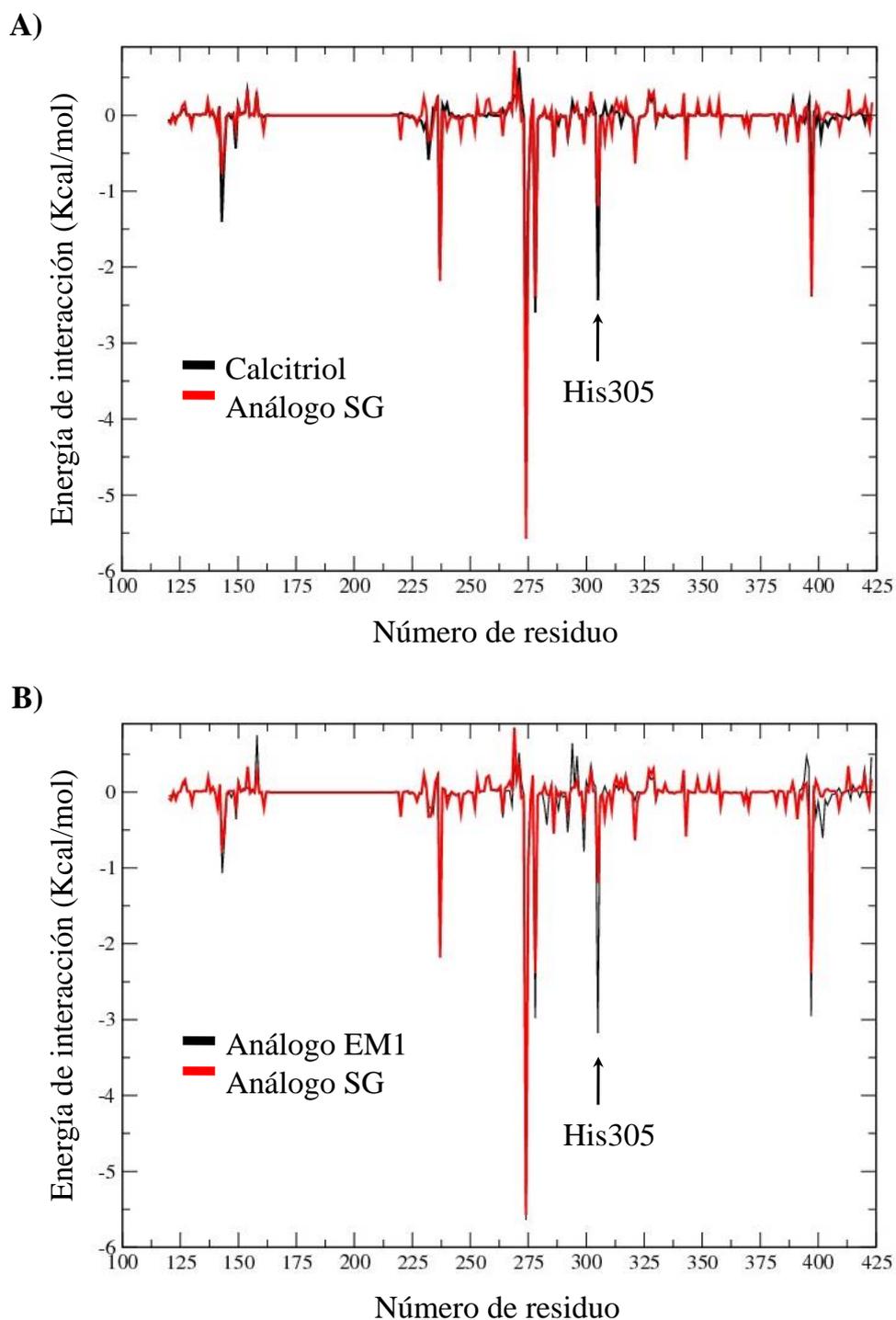
Como se puede ver, el análogo SG presentó una reducción significativa en la frecuencia de los enlaces puente de hidrógeno con Tyr143, Ser278 e His397, en comparación con el calcitriol. Cabe destacar que la interacción del análogo SG con His305 se reduce significativamente en comparación con el calcitriol y el EM1. Para seguir estudiando estas características, se realizó un análisis de interacción energética sobre las trayectorias DM correspondiente. La **Tabla 10** informa los valores de los componentes resultantes, detallando la contribución entálpica calculada para cada ligando con respecto a su unión al VDR-LBD. Como se puede observar, tanto EM1 como SG pueden establecer interacciones intermoleculares más fuertes que el calcitriol. Estas energías de interacción calculadas para el análogo SG, no están en concordancia con las actividades antiproliferativas descritas previamente. Esto se podría deber a que SG exhibe un  $\Delta H$  casi idéntico al calculado para EM1, lo que sugiere que puede unirse eficientemente al VDR pero de un modo que no puede ejercer su actividad alostérica.

| Energía de interacción intermolecular (Kcal/mol) para los diferentes compuestos en su interacción con el VDR |            |             |            |
|--|------------|-------------|------------|
| Componente Energético  | Calcitriol | Análogo EM1 | Análogo SG |
| Electrostático   | -29,7      | -38,8       | -31,6      |
| Van der Waals  | -63,5      | -73,9       | -79,0      |
| Gas  | -93,2      | -112,7      | -110,7     |
| Solvatación Polar  | 27,2       | 33,3        | 20,8       |
| Solvatación Apolar   | -8,4       | -9,8        | -10,4      |
| TOTAL  | -74,5      | -89,2       | -89,9      |

**Tabla 10.** Componentes de energía de interacción intermolecular calculados para el calcitriol, análogo EM1 y análogo SG en su interacción con el VDR.

Para seguir estudiando esta hipótesis de manera cuantitativa, se realizó una descomposición por residuo de las energías de interacción calculadas, con el correspondiente componente electrostático para SG, siendo superpuesto con el del calcitriol (**Figura 40A**) y el EM1 (**Figura 40B**).

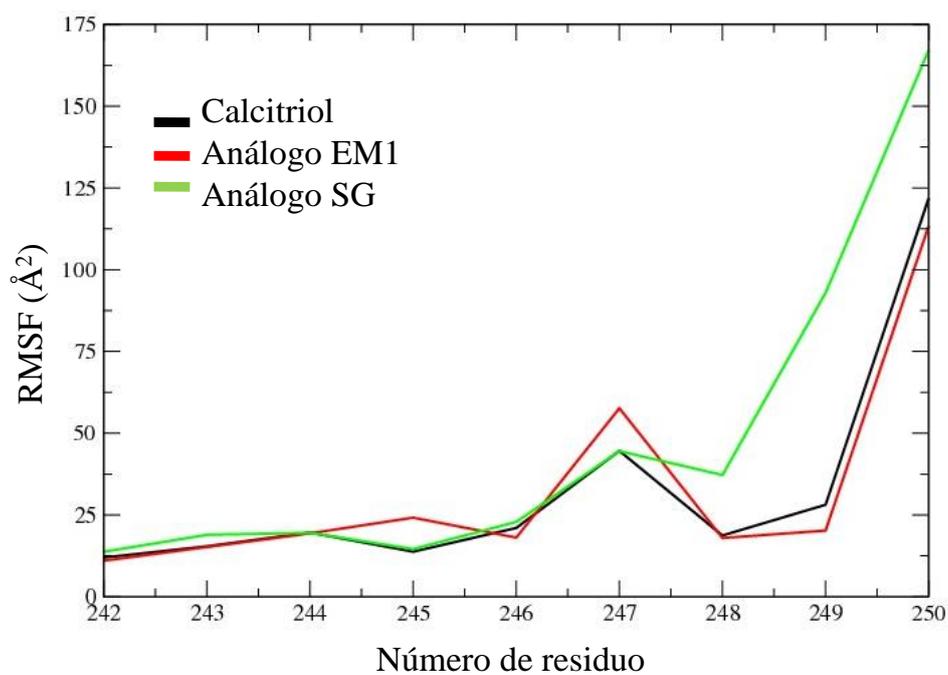
Los gráficos que se muestran en la **Figura 40**, demuestran la evidencia de que la interacción intermolecular entre SG e His305 es sustancialmente menor que la del calcitriol o EM1, lo cual es una consecuencia de la necesidad de acomodar la cadena hidrofóbica adicional presente en SG dentro de la cavidad hidrofóbica correspondiente. La interacción con His305 se informó anteriormente como contacto farmacofórico para los agonistas de VDR, ya que este residuo está estructuralmente involucrado en la modulación de la conformación del dominio AF-2, lo que a su vez origina la unión de los moduladores transcripcionales involucrados en la actividad anticancerígena [218]. Como hemos informado anteriormente, el análogo EM1 es capaz de mantener un efecto alostérico similar al calcitriol [169], en concordancia con su actividad anticancerígena. Por otro lado, el análogo SG exhibe una alta afinidad por el VDR pero en un modo de unión no agonista, lo que lleva a una baja actividad antiproliferativa.



**Figura 40.** Patrones de interacción intermolecular por residuo derivados de las simulaciones de dinámica molecular: A) Calcitriol (negro) y análogo SG (rojo) al VDR. B) Análogo EM1 (negro) y análogo SG (rojo) al VDR.

Para respaldar aún más este punto, se estudió la capacidad de SG para mantener el efecto alostérico sobre el dominio AF-2 calculando los valores de las fluctuaciones

cuadráticas medias de raíz (RSMF) de este dominio a lo largo de la trayectoria de DM, en comparación con las del calcitriol y EM1 (**Figura 41**). Como se puede ver en la **Figura 41**, el valor de RMSF observado para el análogo de SG es considerablemente más alto que los calculados para el calcitriol y el EM1, lo que respalda nuestra hipótesis de que la unión de SG al VDR no puede inducir un control alostérico en el dominio AF-2.



**Figura 41.** Simulaciones de dinámica molecular. Gráfico de RMSF correspondiente a la región AF-2 del VDR determinada a partir de las trayectorias de DM cuando se une el calcitriol, EM1 y SG.

# CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral constituyen un aporte, por un lado, a la evaluación de estrategias para introducir modificaciones estructurales de análogos de la vitamina D con funcionalización de fósforo en la cadena lateral, y por otro, establecer a través de estudios de relación estructura-actividad cómo afecta a la misma. Así mismo, la racionalización de los resultados con estudios computacionales, se constituye en una herramienta útil para evaluar y planificar futuras modificaciones en el bloque estructural del alquilfosfonato del análogo EM1.

Para generar modificaciones en la cadena lateral del biciclo CD de EM1, centramos nuestro interés en la preparación de vinilfosfonatos, estudiando dos posibles cambios estructurales. Por un lado, la reducción por hidrogenación catalítica sobre 1-alquilfosfonatos, para obtener vinilfosfonatos monosustituídos. Se ensayó esta estrategia sobre sustratos modelos y obtuvimos los productos deseados con rendimientos moderados y muy buenos (56% - 84%). Posteriormente, trabajamos sobre el alquilfosfonato **27**, pero la imposibilidad de controlar el progreso de la hidrogenación parcial, condujo a la obtención del alquilfosfonato **28** no deseado con muy buenos rendimientos (89%).

Por otra parte, analizamos modificaciones del sistema vía química de cupratos, como una alternativa para la síntesis regio y estereoselectiva de vinilfosfonatos di y trisustituídos a partir de 1-alquilfosfonatos. Comenzamos trabajando con sustratos modelos, optimizamos tiempos de reacción y la estequiometría de los reactivos organocúpricos para obtener mezclas de isómeros *Z/E*, a diferencia de lo reportado en la bibliografía. Los productos deseados fueron obtenidos con rendimientos moderados a buenos en el caso de vinilfosfonatos disustituídos (30% - 71%) y trisustituídos (30% - 75%). Teniendo en cuenta estos resultados, se trabajó sobre el alquilfosfonato **18** para dar lugar al alquilfosfonato disustituído **39** (40%) y trisustituído **40** (48%), con rendimientos moderados.

En lo que se refiere a la síntesis de análogos de la vitamina D, hemos logrado sintetizar un nuevo análogo, denominado SG (compuesto **44**), que contiene un grupo vinilfosfonato en su cadena lateral. Esta síntesis se logró, a través de una ruta accesible, convergente y en 10 pasos a partir del alcohol **11**. De este modo, en este trabajo de Tesis Doctoral, describimos la síntesis, actividad biológica y los estudios de modelado computacional de este nuevo análogo del calcitriol; comparando sus efectos biológicos tanto *in vivo* e *in vitro*, como así también los estudios *in silico*, reportando los resultados comparativos de SG con el análogo EM1 y el calcitriol.

De acuerdo a los resultados *in vivo*, el análogo SG demostró no producir efectos hipercalcemiantes a las dosis ensayadas, ni alterar los niveles de hematocrito, peso corporal, ni los órganos internos de los ratones. Estos resultados son similares a los reportados por el análogo EM1. Posteriormente, los ensayos *in vitro* realizados en diferentes líneas celulares de cáncer, demostraron que SG ejerce una leve disminución de la viabilidad y migración celular en unas pocas líneas celulares. Estos resultados sugieren que SG, a diferencia de EM1, no ejerce importantes efectos antitumorales. Por otro lado, los estudios *in silico* de las interacciones entre el análogo SG y el VDR, demostraron que este fármaco se une con menor afinidad al dominio de unión del VDR, en comparación con el modo de unión del análogo EM1 y el calcitriol. Por lo tanto, esto sugiere que SG es un mal ligando y modulador para ejercer los efectos biológicos deseados. Esto es debido posiblemente, a las diferencias en las interacciones entre el compuesto y el VDR, las cuales afectan la energía de unión específica; principalmente, los componentes electrostáticos y las fuerzas de Van Der Waals.

En base a los estudios de dinámica y modelado molecular, las diferencias observadas en la actividad biológica, podrían ser explicadas por el hecho de que el análogo SG no es capaz de establecer contactos farmacofóricos claves para el agonismo del VDR, en particular con His305. Por el contrario, el análogo EM1 interactúa con la mayoría de los contactos intermoleculares establecidos por el calcitriol, que inducen cambios conformacionales significativos, los cuales son responsables de la modulación alostérica del VDR. Además, se encontraron contactos intermoleculares adicionales para el análogo EM1, lo que sugiere una mayor interacción con el VDR y en consecuencia, hace que este análogo, sea un mejor ligando y modulador en comparación con el análogo SG.

En conclusión, estos resultados demuestran que la modificación en la cadena lateral del vinilfosfonato SG, en comparación con el alquinilfosfonato EM1, cumple con el requisito indispensable para un análogo de vitamina D de no presentar efectos hipercalcemiantes, pero afecta el modo de unión al VDR, impactando consecuentemente en los efectos antitumorales ejercidos por ambos fármacos, que son considerablemente distintos.

# **PRODUCCIÓN**

## Producciones originadas en la presente Tesis

### Publicaciones científicas

**Título:** Structure-activity relationship study of phosphonate analogues of calcitriol.

**Autores:** Silvina Mariela Grioli, Eliana Noelia Alonso, Evangelina Mascaró, Santiago Armando Stabile, María Julia Ferronato, Mario Alfredo Quevedo, Gabriel Radivoy, María Marta Facchinetti, Cristian Alejandro Vitale, Alejandro Carlos Curino.

**Revista:** Medicinal Chemistry

**Volumen:** 17    **Páginas:** 230-246    **Año:** 2021

### Presentaciones a congresos

**Título:** Differential Antitumoral Effects Between the Analogues of Calcitriol SG and EM1.

**Autores:** Grioli SM, Ferronato MJ, Obiol DJ, Guevara JA, Quevedo MA, Radivoy G, Vitale C, Curino AC, Facchinetti MM.

**Evento:** LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC).

**Lugar:** Buenos Aires, Argentina.    **Fecha:** 13-11-17 al 17-11-17    **Año:** 2017

**Título:** Síntesis de Vinilfosfonatos Di y Trisustituidos a partir de Alquínifosfonatos Vía Adición de Cupratos.

**Autores:** Silvina M. Grioli, Evangelina Mascaró, Cristian Vitale y Gabriel Radivoy.

**Evento:** XX Simposio Nacional de Química Orgánica.

**Lugar:** Mar del Plata, Argentina.    **Fecha:** 11-11-15 al 14-11-15    **Año:** 2015

**Título:** Actividad Biológica del Análogo Fosforado EM1 y Evaluación de Modificaciones Estructurales para Estudios SAR.

**Autores:** Silvina Grioli, Evangelina Mascaró, Débora Salomón, Alejandro Curino, María Marta Fachinetti, Gabriel Radivoy y Cristian Vitale.

**Evento:** XIX Simposio Nacional de Química Orgánica.

**Lugar:** Mar del Plata, Argentina.    **Fecha:** 16-11-13 al 19-11-13    **Año:** 2013

# **SECCIÓN EXPERIMENTAL**

## **1- Materiales**

### **1.1- Síntesis química**

#### **1.1.1- Procedimientos generales para la síntesis química**

Todas las reacciones sensibles a la humedad o al aire se realizaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno.

El material de vidrio se secó antes de su empleo, aplicando calor, evacuando el sistema bajo vacío (1 mmHg), y permitiendo luego llegar a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno.

Los baños criogénicos se prepararon utilizando mezclas de hielo/agua, hielo/NaCl y acetona/nitrógeno líquido o alcohol isopropílico/nitrógeno líquido, para alcanzar temperaturas de 0°C, -20°C y -78°C respectivamente. Las reacciones a alta temperatura se llevaron a cabo haciendo uso de refrigerantes y baños de aceite.

Las reacciones que involucraron al sistema triénico u otros compuestos fotosensibles se realizaron en ausencia de luz.

Para el secado de fases orgánicas tras la elaboración de diversas reacciones se utilizaron Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o MgSO<sub>4</sub> anhidro.

#### **1.1.2- Solventes y reactivos**

Los solventes utilizados en las reacciones se purificaron siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía [219] y se secaron por calentamiento a reflujo utilizando un agente desecante adecuado, en atmósfera inerte, y destilados inmediatamente antes de su uso. Los agentes desecantes utilizados fueron: Na/Benzofenona para THF y Et<sub>2</sub>O, CaH<sub>2</sub> para CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. DMF y piridina se destilaron a presión reducida y se almacenaron sobre tamices moleculares de 4 Å y KOH respectivamente.

Para las reacciones de cupratos, el CuCl (Aldrich) y CuI (Aldrich) se purificaron de acuerdo a los procedimientos descritos en la bibliografía [219-221], y se manipularon en atmósfera inerte y protegiéndolos de la luz.

Los reactivos organometálicos empleados se prepararon inmediatamente antes de ser utilizados (RMgBr, RMgCl, *n*-BuLi) [222].

Aquellos sustratos no asequibles en forma comercial, fueron sintetizados empleando reactivos de la mayor pureza posible, y se purificaron por destilación, cristalización o cromatografía en columna.

### 1.1.3- Cromatografía

Para las cromatografías en capa fina (CCF) se utilizaron placas Merck (20 x 20 cm sílica gel 60 F254). El revelado de los cromatogramas se realizó por visualización con luz UV (254 y 366 nm) o haciendo uso de los siguientes reveladores: Ac. Fosfomolibdico (disolución al 5% en EtOH absoluto), *p*-anisaldehído (solución de 0,5 mL *p*-anisaldehído, 85 mL MeOH, 10 mL CH<sub>3</sub>COOH glacial y 5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado).

La cromatografía en columna se realizó en columnas de vidrio, utilizando como fase estacionaria gel de sílice Merck 60 con un tamaño de partícula de 240-400 mesh (cromatografía flash) o de 35-70 mesh (por gravedad).

Para las cromatografías en capa fina preparativas se emplearon placas de vidrio de 20 x 20 cm Macharey-Nagel Sil G 25-UV254, previamente activadas en estufa a 100 °C durante 1 hora. El revelado de las placas se realizó por visualización con luz UV (254 y 366 nm).

### 1.1.4- Instrumentos y equipos

La evaporación de solventes de las disoluciones procedentes de la elaboración de las reacciones se realizó en un evaporador rotatorio Büchi a presión reducida (15 mmHg).

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados con un espectrómetro Bruker ARX-300 (300 MHz para <sup>1</sup>H-RMN, 75 MHz para <sup>13</sup>C-RMN, y 121 MHz para <sup>31</sup>P-RMN), empleando como solvente cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>), y como referencia interna tetrametilsilano (TMS) o la señal residual de CHCl<sub>3</sub> en <sup>1</sup>H- y <sup>13</sup>C-RMN; y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> como referencia externa en <sup>31</sup>P-RMN. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están expresados en ppm y entre paréntesis se informa la integración, multiplicidad y las constantes de acoplamiento *J* en Hz.

El espectro ultravioleta se registró con un espectrofotómetro Jasco V-630. Las reacciones de ozonólisis se realizaron con un ozonizador marca UNITEK modelo UTK-O-4.

## **1.2- Ensayos biológicos**

### **1.2.1- Reactivos para cultivo**

Medios de cultivo para células: RPMI Medium 1640 y DMEM Gibco Life technologies.

Suero Fetal Bobino Natocor. Tripsina 0,25 % Gibco. Antibiótico-Antimicótico 100X Gibco.

### **1.2.2- Líneas Celulares**

#### **1.2.2.1- Línea de adenocarcinoma mamario**

LM3 es una línea establecida a partir de pasajes sucesivos *in vitro* de un cultivo primario del adenocarcinoma mamario murino M3 [223]. No expresan receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR). La línea fué gentilmente cedidas por el Instituto de Oncología Ángel H. Roffo.

#### **1.2.2.2- Línea de carcinoma colorrectal**

HCT116 es una línea aislada a partir de un carcinoma colorrectal humano.

#### **1.2.2.3- Líneas de glioblastoma**

T98G, derivada de un glioblastoma multiforme humano.

U251, derivada de un glioblastoma astrocitoma humano.

GL26, derivada de un glioblastoma murino.

#### **1.2.2.4- Línea de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello**

HN12 es una línea de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello deriva de una metástasis nodal humana.

### **1.2.3- Cepa de ratón CF1**

Los machos CF1 fueron gentilmente cedidos por el Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur.

### 1.3- Ensayos computacionales

Los ensayos computacionales fueron realizados con la colaboración del Dr. Mario Alfredo Quevedo de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA - CONICET) de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

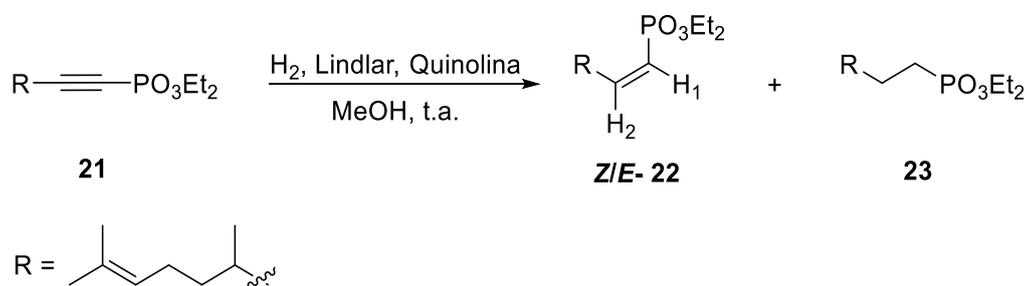
## 2- Métodos

### 2.1- Síntesis química

#### 2.1.1- Procedimiento general para la reducción catalítica de alquínifosfonatos

Sobre una disolución del correspondiente alquínifosfonato en metanol bajo atmósfera inerte, se agregó quinolina y el catalizador de Lindlar. Luego de purgar el sistema con nitrógeno, la mezcla de reacción se dejó en agitación con atmósfera de hidrógeno (1 atm.). Una vez finalizada la reacción (CCF), se filtró la mezcla sobre celite®, y se evaporó el solvente a presión reducida. El residuo se retomó con Et<sub>2</sub>O, se agregó una solución de HCl 10% y se dejó con agitación 15 min. La fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O y las fases orgánicas combinadas se secaron con MgSO<sub>4</sub> o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y concentraron, eliminando el solvente utilizando un rotavapor. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna [160].

##### 2.1.1.1- Reducción de (4,8-dimetil-7-nonen-1-ínil)fosfonato de dietilo (**21**)



La reacción de hidrogenación de **21** (64 mg; 0,26 mmol), Lindlar (6 mg) y quinolina (7  $\mu$ L) en metanol (1 mL), se llevó a cabo durante 3h. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (1,5 x 10 cm, eluyente AcOEt/Hex 30%), obteniéndose

los alquencilfosfonatos **Z-22** (26 mg, 41%) y **E-22** (9 mg, 15%), y el alquifosfonato **23** (10 mg, 10%) ( $R_f = 0,17; 0,10$  y  $0,07$  respectivamente AcOEt/Hex 40%, todos líquidos incoloros).

**(Z)-(4,8-dimetil-1,7-nonadienil)fosfonato de dietilo (Z-22)**

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  ppm: 6,48 (1H, ddt  $^3J_{\text{H-P}} = 53,2$ ;  $^{\text{cis}}J_{\text{H-H}} = 13,1$ ;  $^3J_{\text{H-H}} = 7,6$  Hz; H-2); 5,61 (1H, ddm  $^2J_{\text{H-P}} = 19,8$ ;  $^{\text{cis}}J_{\text{H-H}} = 13,1$ ; H-1); 5,10-5,05 (1H, m, H-7); 4,06 (4H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 2,56-2,38 (2H, m, H-3); 1,98 (2H, m, H-6); 1,67 (3H, s, H-9 ó  $\text{CH}_3$ -8); 1,59 (3H, s, H-9 ó  $\text{CH}_3$ -8); 1,32 (6H, t  $^3J_{\text{H-H}} = 7,0$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 0,92 (3H, d,  $^3J_{\text{H-H}} = 6,6$  Hz;  $\text{CH}_3$ -4).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 153,18 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 4,54$  Hz;  $\text{HC}=\text{CHP}$ ); 131,30 ( $=\text{C}$ -8); 124,53 ( $=\text{CH}$ -7); 117,17 (d,  $^1J_{\text{C-P}} = 184,3$  Hz;  $=\text{CHP}$ ); 61,28 (d;  $^2J_{\text{C-P}} = 6,3$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 37,66 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 7,9$  Hz;  $\text{CH}_2$ -3); 36,70 (CH); 32,65 ( $\text{CH}_2$ ); 25,68 ( $\text{CH}_2$ ); 25,52 ( $\text{CH}_3$ ); 19,17 ( $\text{CH}_3$ ); 17,62 ( $\text{CH}_3$ ); 16,35 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 6,5$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ).

$^{31}\text{P-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$  ppm: 17,28.

**(E)-(4,8-dimetil-1,7-nonadienil)fosfonato de dietilo (E-22)**

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  ppm: 6,76 (1H, ddt  $^3J_{\text{H-P}} = 21,9$ ;  $^{\text{trans}}J_{\text{H-H}} = 17,1$ ;  $^3J_{\text{H-H}} = 7,2$  Hz; H-2); 5,66 (1H, ddm  $^3J_{\text{H-P}} = 21,5$ ;  $^{\text{trans}}J_{\text{H-H}} = 17,1$ ; H-1); 5,12-5,06 (1H, m, H-7); 4,22-4,00 (4H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 2,32-2,21 (1H, m, H-3); 2,13-1,92 (3H, m, H-3 y H-6); 1,70 (3H, s, H-9 ó  $\text{CH}_3$ -8); 1,61 (3H, s, H-9 ó  $\text{CH}_3$ -8); 1,34 (6H, t  $^3J_{\text{H-H}} = 7,1$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 0,92 (3H, d,  $^3J_{\text{H-H}} = 6,7$  Hz;  $\text{CH}_3$ -4).

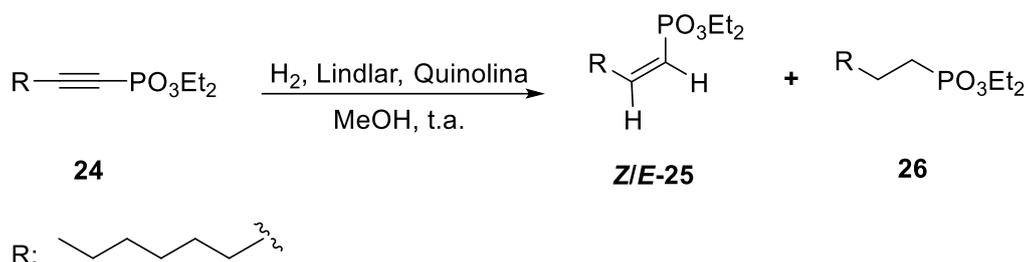
$^{31}\text{P-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$  ppm: 18,66.

**(4,8-dimetil-7-nonenil)fosfonato de dietilo (23)**

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  ppm: 5,11-5,05 (1H, m, H-7); 4,15-4,02 (4H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 2,01-1,89 (2H, m, H-1); 1,68 (3H, s, H-9 ó  $\text{CH}_3$ -8); 1,60 (3H, s, H-9 ó  $\text{CH}_3$ -8); 1,32 (6H, t  $^3J_{\text{H-H}} = 7,1$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 0,87 (3H, d,  $^3J_{\text{H-H}} = 6,5$  Hz;  $\text{CH}_3$ -4).

$^{31}\text{P-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$  ppm: 32,54.

### 2.1.1.2- Reducción de octinil fosfonato de dietilo (24)



La reacción de hidrogenación de **24** (50 mg; 0,20 mmol), Lindlar (5 mg) y quinolina (6  $\mu\text{L}$ ) en metanol (765  $\mu\text{L}$ ) se llevó a cabo durante 3h, verificando la reducción completa del alquini fosfonato por CCF. Los productos de reacción se determinaron a partir de la intensidad y el desplazamiento de las señales de  $^{31}\text{P}$ -RMN en el crudo de reacción [160], obteniéndose rendimientos del 77% y 7% para los alqueni fosfonatos **Z-25** y **E-25**; además de un 11% del producto de reducción total, el alquil fosfonato **26** ( $R_f = 0,47; 0,39$  y  $0,32$  respectivamente, CCF corrida dos veces en AcOEt/Hex 40%).

#### (Z)-(1-octaenil)fosfonato de dietilo (Z-25)

$^{31}\text{P}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$  ppm: 17,32.

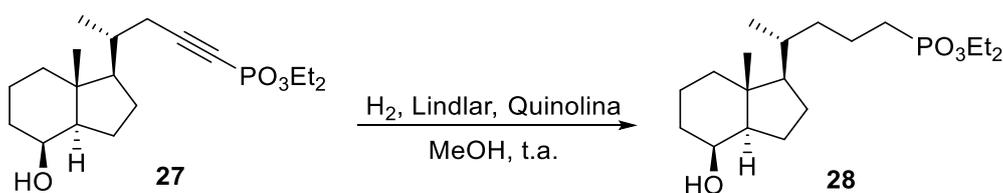
#### (E)-(1-octaenil)fosfonato de dietilo (E-25)

$^{31}\text{P}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$  ppm: 18,95.

#### Octil fosfonato de dietilo (26)

$^{31}\text{P}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$  ppm: 32,65.

### 2.1.1.3- Reducción de (Des-A,B-8 $\beta$ -hidroxi-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (27)



La reacción de hidrogenación de **27** (53 mg; 0,15 mmol), Lindlar (4 mg) y quinolina (4  $\mu$ L) en metanol (580  $\mu$ L), se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento general descrito previamente. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1 x 7 cm, eluyente AcOEt), obteniéndose el alquilfosfonato **28** (48 mg, 89 %, Rf = 0,17; CCF corrida dos veces en AcOEt/Hex 50%, líquido incoloro).

**(Des-A,B-8 $\beta$ -hidroxicolan-24-il)fosfonato de dietilo (28)**

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  ppm: 4,14-3,99 (5H, m, H-8 y  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 1,30 (6H, t,  $^3J_{\text{H-H}} = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 0,90 (3H, s, H-18); 0,88 (3H, d,  $^3J_{\text{H-H}} = 6,6$  Hz; H-21).

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 69,11 (CH-8); 61,29 (d;  $^2J_{\text{C-P}} = 6,3$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 56,30 (CH); 52,54 (CH); 41,78 (C-13); 40,32 ( $\text{CH}_2$ ); 36,76 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 16,73$  Hz;  $\text{CH}_2$ -23); 34,99 (CH); 33,54 ( $\text{CH}_2$ ); 27,07 ( $\text{CH}_2$ ); 26,01 (d,  $^1J_{\text{C-P}} = 140,0$  Hz;  $\text{CH}_2\text{P}$ ); 22,42 ( $\text{CH}_2$ ); 18,95 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 4,80$  Hz,  $\text{CH}_2$ -22); 18,30 ( $\text{CH}_3$ ); 17,35 ( $\text{CH}_3$ ); 16,38 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 5,9$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 13,40 ( $\text{CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$  ppm: 32,66.

**HRMS** (ESI): calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{P}$  (M+H): 361,25077; encontrado: 361,25022.

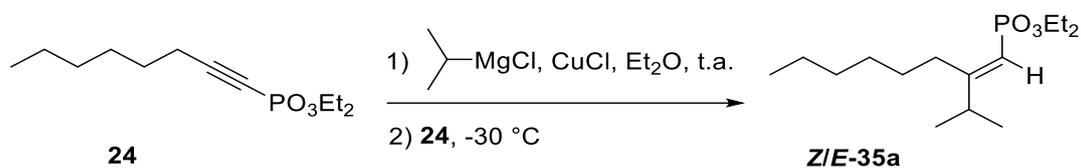
**2.1.2- Procedimiento general para las reacciones de carbocupración. Síntesis de vinilfosfonatos disustituidos y trisustituidos**

**Método A:** Sobre una solución del reactivo de Grignard en  $\text{Et}_2\text{O}$  seco, bajo atmósfera inerte ( $\text{N}_2$ ), se adicionó  $\text{CuCl}$  a temperatura ambiente, observándose la aparición progresiva de un color rojo amarronado intenso. Transcurridos 15 min, la disolución se enfrió a  $-30$   $^\circ\text{C}$  y se trasvasó, vía canula, la solución del cuprato sobre la solución del alquilfosfonato en  $\text{Et}_2\text{O}$  seco. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se mantuvo con agitación a la misma temperatura durante 6 h. La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a  $0$   $^\circ\text{C}$ , y la fase acuosa se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$ . Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de  $\text{NaCl}$ , se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna [160].

**Método B:** En un balón seco y bajo atmósfera inerte ( $N_2$ ), se agregó CuI en  $Et_2O$  seco y se enfrió a  $-40\text{ }^\circ\text{C}$ , luego se adicionó por goteo lento el alquil litio, observándose la aparición progresiva de un color rojo amarronado intenso. Una vez finalizado el agregado, se mantuvo en agitación durante 1 h permitiendo que suba a  $-25\text{ }^\circ\text{C}$ . Luego, la mezcla de reacción se enfrió a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  y se trasvasó la solución de cuprato sobre la solución del alquilfosfonato en  $Et_2O$  seco. Una vez finalizada la adición, la reacción se mantuvo con agitación durante 3 h manteniendo la temperatura por debajo de  $-25\text{ }^\circ\text{C}$ . La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de  $NH_4Cl$  a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , y la fase acuosa se extrajo con  $Et_2O$ . Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de  $NaCl$ , se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna [160].

**Método C:** En un balón seco y bajo atmósfera inerte ( $N_2$ ), se agregó CuI en  $Et_2O$  seco y se enfrió a  $-40\text{ }^\circ\text{C}$ , luego se adicionó por goteo lento el alquil litio, observándose la aparición progresiva de un color rojo amarronado intenso. Una vez finalizado el agregado, se mantuvo en agitación durante 1 h permitiendo que suba a  $-25\text{ }^\circ\text{C}$ . Luego, la mezcla de reacción se enfrió a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  y se trasvasó la solución del cuprato sobre la solución del alquilfosfonato en  $Et_2O$  seco. Una vez finalizada la adición, la reacción se mantuvo con agitación durante 3 h manteniendo la temperatura por debajo de  $-25\text{ }^\circ\text{C}$ . Transcurrido ese tiempo, se enfrió a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , se agregó el electrófilo adecuado para obtener el producto de iodinación o alquilación correspondiente. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 3 h más, permitiendo luego que suba hasta temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de  $NH_4Cl$  a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , y la fase acuosa se extrajo con  $Et_2O$ . Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de  $NaCl$ , se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna [160].

### 2.1.2.1- Síntesis de (Z/E)-(2-isopropil-1-octaenil)fosfonato de dietilo (Z/E-35a)



La reacción de carbocupración del compuesto **24** se llevó a cabo acorde al método A. Para llevar a cabo la reacción, se agregó el cloruro de isopropil magnesio (1,24 mL; 1,64 M) en  $\text{Et}_2\text{O}$  seco (2 mL),  $\text{CuCl}$  (40 mg; 0,41 mmol) y posteriormente se trasvasó la solución del cuprato sobre la solución del alquini fosfonato **24** (100 mg; 0,41 mmol) en  $\text{Et}_2\text{O}$  seco (3 mL). El progreso de la reacción se siguió por CCF. La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mL), y la fase acuosa se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de  $\text{NaCl}$  (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1 x 10 cm, eluyente  $\text{AcOEt/Hex}$  30%), obteniéndose los alqueni fosfonatos **Z-35a** (15 mg, 18%) y **E-35a** (46 mg, 45%) (63%,  $R_f = 0,41$  y  $0,54$  respectivamente, CCF corrida dos veces en  $\text{AcOEt/Hex}$  40%, ambos líquidos incoloros).

#### (Z)-(2-isopropil-1-octaenil)fosfonato de dietilo (Z-35a)

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  ppm: 5,36 (1H, d,  $^2J_{\text{H-P}} = 14,8$  Hz); 4,16 (4H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 2,64 – 2,49 (2H, m,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2-$ ); 2,76 - 2,61 (1H, m,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$ ); 1,72 – 1,40 (14H, m;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2-$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$ ); 1,10 (6H, d,  $^3J_{\text{H-H}} = 5,1$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 1,13 (3H, t,  $^3J_{\text{H-H}} = 8,9$  Hz;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2-$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 170,79 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5,85$  Hz;  $\text{C}=\text{CHP}$ ); 111,03 (d,  $^1J_{\text{C-P}} = 191,5$  Hz;  $\text{C}=\text{CHP}$ ); 61,04 (d;  $^2J_{\text{C-P}} = 5,5$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 36,15 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 21,5$  Hz;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2-$ ); 33,72 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 7$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 31,93 ( $\text{CH}_2$ ); 29,79 ( $\text{CH}_2$ ); 29,70 ( $\text{CH}_2$ ); 22,82 ( $\text{CH}_2$ ); 22,20 ( $\text{CH}_3$ ); 14,36 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 4,1$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 14,38 ( $\text{CH}_3$ ).

$^{31}\text{P-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$  ppm: 18,57.

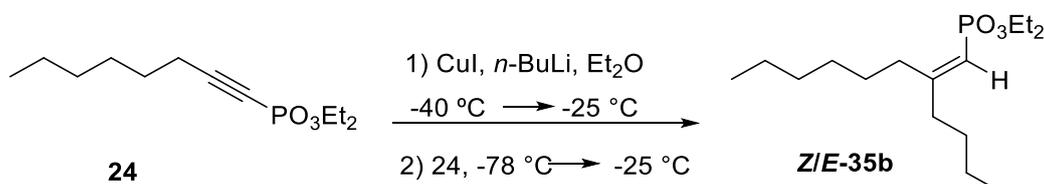
### **(E)-(2-isopropil-1-octaenil)fosfonato de dietilo (E-35a)**

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 5,41 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>H-P</sub> = 15,5 Hz); 4,29 – 4,07 (4H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 2,78 – 2,61 (2H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); 2,54 (1H, m, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-); 1,72 – 1,40 (14H, m; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-); 1,28 (6H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,8 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 1,13 (3H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8,9 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm: 172,33 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,8 Hz; C=CHP); 110,42 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 191,7 Hz; C=CHP); 60,55 (d; <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,3 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 36,13 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 21,4 Hz, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); 32,53 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 4,40 Hz; CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 31,93 (CH<sub>2</sub>); 29,79 (CH<sub>2</sub>); 29,70 (CH<sub>2</sub>); 22,83 (CH<sub>2</sub>); 22,22 (CH<sub>3</sub>); 16,72 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 14,39 (CH<sub>3</sub>).

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ ppm: 17,90.

### **2.1.2.2- Síntesis de (Z/E)-(2-butil-1-octaenil)fosfonato de dietilo (Z/E-35b)**



La reacción de carbocupración del compuesto **24** se llevó a cabo acorde al método B. Para realizar la reacción, se agregó el CuI (387 mg; 2,03 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (4 mL) y lentamente *n*-BuLi (2,98 mL; 1,36 M). Posteriormente, se trasvasó la solución del cuprato sobre la solución del alquínifosfonato **24** (100 mg; 0,41 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (3 mL). El progreso de la reacción se siguió por CCF. La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (5 mL), y la fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1,5 x 20 cm, eluyente AcOEt/Hex 30%), aislándose puros los alquénifosfonatos **Z-35b** (25 mg, 20%) y **E-35b** (63 mg, 51%) (71%, R<sub>f</sub> = 0,71 y 0,55 respectivamente, CCF corrida dos veces en AcOEt/Hex 40%, ambos líquidos incoloros).

**(Z)-(2-butyl-1-octaenil)fosfonato de dietilo (Z-35b)**

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 5,33 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>H-P</sub> = 15,6 Hz); 3,48 (4H, m, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,0 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 2,62 (2H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); 2,31 (2H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 1,53 (12H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 1,10 (6H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 1.18 – 1.07 (6H, dt, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm: 158,30 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,3 Hz; C=CHP); 124,39 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 175,1 Hz; C=CHP); 60,42 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5,7 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 34,34 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 22,4 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 32,69 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,8 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); 32,02 (CH<sub>2</sub>); 29,84 (CH<sub>2</sub>); 29,58 (CH<sub>2</sub>); 23,38 (CH<sub>2</sub>); 23,19 (CH<sub>2</sub>); 22,87 (CH<sub>2</sub>); 16,72 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 14,40 (CH<sub>3</sub>); 14,29 (CH<sub>3</sub>).

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ ppm: 21,31.

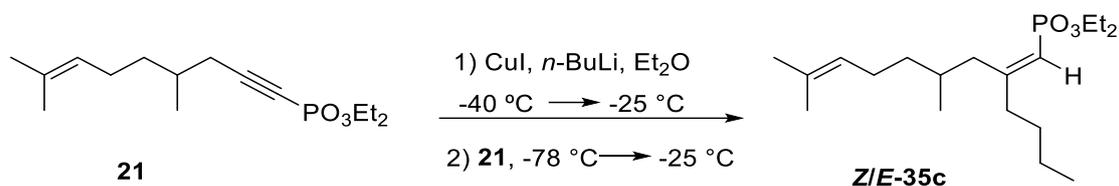
**(E)-(2-butyl-1-octaenil)fosfonato de dietilo (E-35b)**

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 5,40 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>H-P</sub> = 18,5 Hz); 4,11 (4H, m, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,1 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 2,61 – 2,51 (2H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 2,22 (2H, m, J = 7,5 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); 1,57 – 1,41 (12H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 1,38 (6H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,9 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 1,01 – 0,91 (6H, dt, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm: 167,88 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,9 Hz; C=CHP); 111,11 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 189,4 Hz; C=CHP); 61,30 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5,6 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 38,12 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 22,6 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); 34,02 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,9 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 33,90 (CH<sub>2</sub>); 31,75 (CH<sub>2</sub>); 29,80 (CH<sub>2</sub>); 29,53 (CH<sub>2</sub>); 28,66 (CH<sub>2</sub>); 22,40 (CH<sub>2</sub>); 16,56 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 14,06 (CH<sub>3</sub>); 13,91 (CH<sub>3</sub>).

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ ppm: 18,72.

### 2.1.2.3- Síntesis de (Z/E)-(2-butil-4,8-dimetil-1,7-nonadienil) fosfonato de dietilo (Z/E-35c)



La reacción de carbocupración del compuesto **21** se llevó a cabo acorde al método B. Para realizar la reacción, se agregó el CuI (156 mg; 0,82 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (2 mL) y lentamente *n*-BuLi (1,21 mL; 1,36 M). Posteriormente, se trasvasó la solución del cuprato sobre la solución del alquinielfosfonato **21** (46 mg; 0,16 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (2 mL). El progreso de la reacción se siguió por CCF. La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (5 mL), y la fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1,5 x 20 cm, eluyente AcOEt/Hex 30%), aislándose puros los alquenielfosfonatos **Z-35c** (9 mg) y **E-35c** (7 mg) (Rto: 30%, Rf = 0,66 y 0,54 respectivamente (CCF corrida dos veces en AcOEt/Hex 40%), ambos líquidos incoloros).

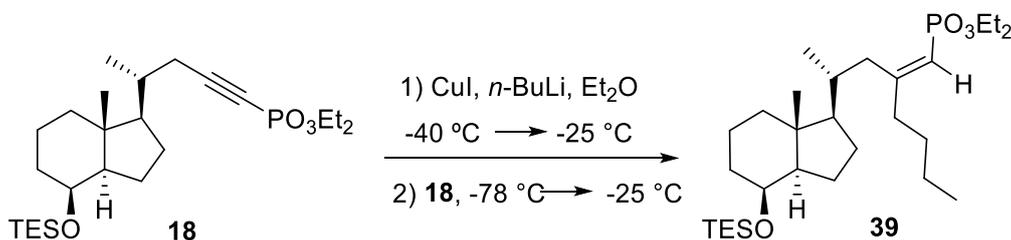
#### (Z)-(2-butil-4,8-dimetil-1,7-nonadienil) fosfonato de dietilo (Z-35c)

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ ppm: 21,40.

#### (E)-(2-butil-4,8-dimetil-1,7-nonadienil) fosfonato de dietilo (E-35c)

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ ppm: 17,50.

### 2.1.2.4- Síntesis de (Z)-(Des-A,B-23-butil-8β-trietilsililoxi-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (39)



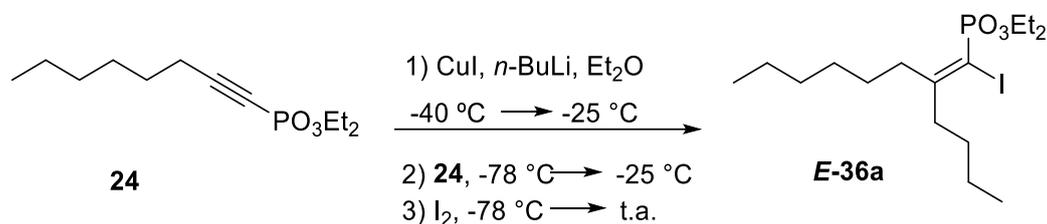
La reacción de carbocupración del compuesto **18** se llevó a cabo acorde al método B. Para realizar la reacción, se agregó el CuBr (194 mg; 1,35 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (3 mL) y lentamente *n*-BuLi (1,08 mL; 2,5 M). Posteriormente, se trasvasó la solución del cuprato sobre la solución del alquínifosfonato **18** (126 mg; 0,27 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (3 mL). El progreso de la reacción se siguió por CCF. La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (5 mL), y la fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1 x 10 cm, eluyente AcOEt/Hex 30%), obteniéndose el alquénifosfonato **39** (56 mg, 40%, R<sub>f</sub> = 0,33; TLC corrida dos veces en AcOEt/Hex 30%, líquido incoloro).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 5,40 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>H-P</sub> = 18,2 Hz; H-24); 4,08-3,99 (5H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP, H-8); 2,64 (1H, t, J = 12,3 Hz; H-22); 2,24 (1H, m, H-22); 2,18-2,01 (2H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 1,31 (6H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 0,96-0,89 (12H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si, H-18, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-); 0,84 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,5 Hz; H-21); 0,55 (6H, c, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,9 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm: 167,10 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,8 Hz; C-23); 112,64 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 189,6 Hz; CH-24); 69,58 (CH-8); 61,25 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 61,19 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 5,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 57,74 (CH-17); 53,24 (CH-14); 42,51 (C-13); 40,84 (CH<sub>2</sub>); 39,48 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,8 Hz; CH<sub>2</sub>-22); 37,84 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 22,7 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 34,75 (CH<sub>2</sub>); 34,38 (CH-20); 29,90 (CH<sub>2</sub>); 27,78 (CH<sub>2</sub>); 23,18 (CH<sub>2</sub>); 22,51 (CH<sub>2</sub>); 17,98 (CH<sub>3</sub>-21); 17,82 (CH<sub>2</sub>); 16,55 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 6,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 14,07 (CH<sub>3</sub>), 13,79 (CH<sub>3</sub>); 7,09 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 5,12 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ ppm: 18,66.

### 2.1.2.5- Síntesis de (*E*)-(2-butil-1-yodo-1-octaenil)fosfonato de dietilo (*E*-36a)



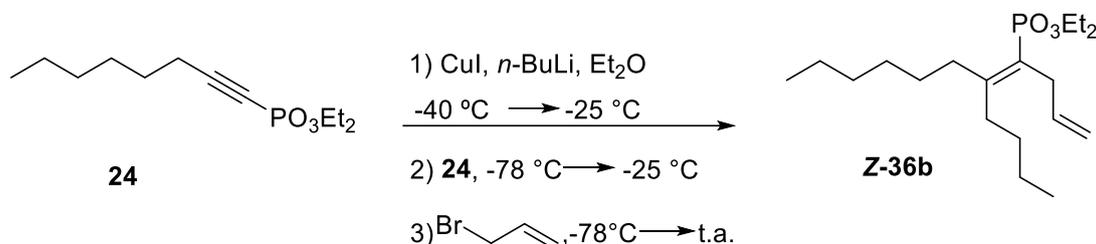
La reacción de carbocupración del compuesto **24** se llevó a cabo acorde al método C. Para realizar la reacción, se agregó el CuI (453 mg; 2,38 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (4 mL) y lentamente *n*-BuLi (3,35 mL; 1,42 M). Posteriormente, se trasvasó la solución del cuprato sobre la solución del alquiniolfosfonato **24** (117 mg; 0,48 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (2 mL). Finalmente, se agregó el I<sub>2</sub> (1,21 g; 4,76 mmol) bajo las condiciones descritas previamente. El progreso de la reacción se siguió por CCF. La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (5 mL), y la fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (2 x 20 cm, eluyente AcOEt/Hex 20%), obteniéndose el alqueniolfosfonato **E-36a** (143 mg, 70%, R<sub>f</sub> = 0,62 (CCF corrida dos veces en AcOEt/Hex 40%), líquido rojo pálido).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 4,13 (4H, m, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,3 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 2,91 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,5 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); 2,52 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,5 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); 1,44 (18H, m, J = 5,2; 3,3 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 1,04 (6H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 19,6; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm: 169,68 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 13,5 Hz; C=CHP); 62,36 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5,3 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 35,34 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 4,5 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); 32,33 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 22,1 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 30,40 (CH<sub>2</sub>); 30,29 (CH<sub>2</sub>); 30,13 (CH<sub>2</sub>); 30,10 (CH<sub>2</sub>); 23,61 (CH<sub>2</sub>); 17,01 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 14,89 (CH<sub>3</sub>); 14,57 (CH<sub>3</sub>); -2,56 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 124,9 Hz; C=CHP).

$^{31}\text{P}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$  ppm: 9,08.

### 2.1.2.6- Síntesis de (Z)-(2-butil-1-propenilo-1-octaenil)fosfonato de dietilo (Z-36b)



La reacción de carbocupración del compuesto **24** se llevó a cabo acorde al método C. Para realizar la reacción, se agregó el  $\text{CuI}$  (414 mg; 2,17 mmol) en  $\text{Et}_2\text{O}$  seco (4 mL) y lentamente  $n\text{-BuLi}$  (2,57 mL; 1,69 M). Posteriormente, se trasvasó la solución del cuprato sobre la solución del alquiniolfosfonato **24** (107 mg; 0,43 mmol) en  $\text{Et}_2\text{O}$  seco (2 mL). Finalmente, se agregó el bromuro de alilo (37,63 mL; 4,35 mmol) bajo las condiciones descritas previamente. El progreso de la reacción se siguió por CCF. La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mL), y la fase acuosa se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de  $\text{NaCl}$  (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1,5 x 20 cm, eluyente  $\text{AcOEt/Hex}$  20%), obteniéndose el alqueniolfosfonato **Z-36b** (112 mg, 75%,  $R_f = 0,44$ ; CCF corrida dos veces en  $\text{AcOEt/Hex}$  40%, líquido incoloro).

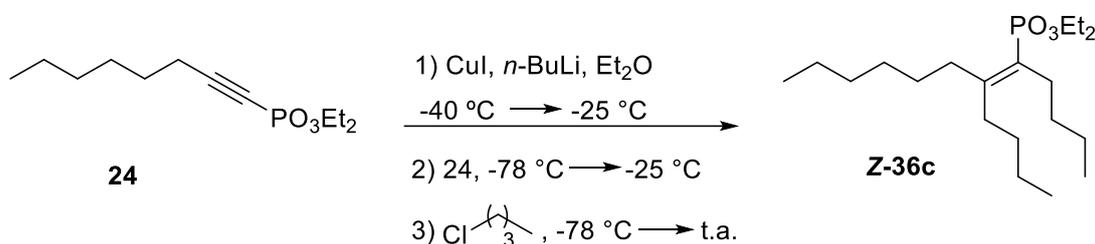
$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  ppm: 5,72 (1H, ddt,  $^3J_{\text{H-H}} = 16,2$ ;  $^4J_{\text{H-H}} = 10,0$ ;  $^4J_{\text{H-H}} = 5,8$  Hz;  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ -); 5,02 – 4,86 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ -); 3,95 (4H, m,  $^3J_{\text{H-H}} = 7,1$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 3,02 – 2,88 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ -); 2,49 – 2,40 (2H, m,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2$ -); 2,06 (2H, t,  $^3J_{\text{H-H}} = 7,6$  Hz;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$ -); 1,41 – 1,16 (18H, m,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2$ -);  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$ -;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 0,82 (6H, dt,  $^3J_{\text{H-H}} = 9,8$ ; 6,8 Hz;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2$ -);  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$ -).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 161,82 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 11,4$  Hz;  $\text{C}=\text{CHP}$ ); 136,26 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 1,9$  Hz;  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 120,28 (d,  $^1J_{\text{C-P}} = 178,2$  Hz;  $\text{C}=\text{CHP}$ ); 114,73 ( $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 61,14 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5,7$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 60,95 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5,7$  Hz;

CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 34,56 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7,6 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); 33,90 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 12,3 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 32,84 (d, <sup>4</sup>J<sub>C-P</sub> = 19,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 31,77 (CH<sub>2</sub>); 30,50 (d, J<sub>C-P</sub> = 2,3 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 29,72 (CH<sub>2</sub>); 29,22 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 2,3 Hz; -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>); 23,09 (CH<sub>2</sub>); 22,62 (CH<sub>2</sub>); 16,28 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,6 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 14,02 (CH<sub>3</sub>); 13,87 (CH<sub>3</sub>).

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ ppm: 21,32.

### 2.1.2.7- Síntesis de (Z)-(1,2-dibutil-1-octaenil)fosfonato de dietilo (Z-36c)



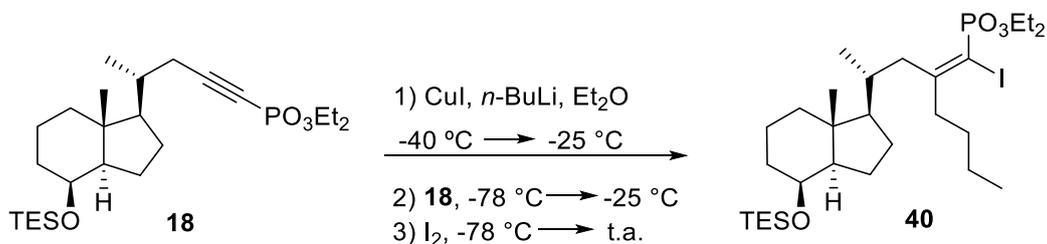
La reacción de carbocupración del compuesto **24** se llevó a cabo acorde al método C. Para realizar la reacción, se agregó el CuI (387 mg; 2,03 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (4 mL) y lentamente *n*-BuLi (2,12 mL; 1,92 M). Posteriormente, se trasvasó la solución del cuprato sobre la solución del alquiniolfosfonato **24** (100 mg; 0,41 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (2 mL). Finalmente, se agregó el cloruro de butilo (42,5 mL; 4,06 mmol) bajo las condiciones descritas previamente. El progreso de la reacción se siguió por CCF. La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (5 mL), y la fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1,5 x 20 cm, eluyente AcOEt/Hex 20%), obteniéndose el alqueniolfosfonato **Z-36c** (42 mg, 30%, R<sub>f</sub> = 0,50; CCF corrida dos veces en AcOEt/Hex 40%, líquido incoloro).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 4,20 (4H, m, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,2 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 2,63 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,3 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 2,39 – 2,27 (4H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 1,51 (22H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-); CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 1,13 (9H, dt, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 11,4; 6,8 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>-; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 158,82 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 11,9$  Hz;  $\underline{\text{C}}=\text{CHP}$ ); 125,01 (d,  $^1J_{\text{C-P}} = 174,7$  Hz;  $\text{C}=\underline{\text{CHP}}$ ); 61,03 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5,6$  Hz;  $\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OP}$ ); 34,88 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 7,5$  Hz;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ); 33,00 ( $\text{CH}_2$ ); 32,74 ( $\text{CH}_2$ ); 32,68 ( $\text{CH}_2$ ); 32,02 ( $\text{CH}_2$ ); 31,04 ( $\text{CH}_2$ ); 30,77 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 11,8$  Hz;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ); 29,84 ( $\text{CH}_2$ ); 29,57 ( $\text{CH}_2$ ); 23,86 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 14,1$  Hz;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ); 22,87 ( $\text{CH}_2$ ); 17,27 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 6,1$  Hz;  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 14,95 ( $\text{CH}_3$ ); 14,83 ( $\text{CH}_3$ ); 14,79 ( $\text{CH}_3$ ).

$^{31}\text{P}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$  ppm: 21,37.

### 2.1.2.8- Síntesis de (*E*)-(Des-A,B-23-butil-8 $\beta$ -triethylsiloxi-24-yodo-23-colen-24-il)fosfonato de dietilo (40)



La reacción de carbocupración del compuesto **18** se llevó a cabo acorde al método C. Para realizar la reacción, se agregó el  $\text{CuI}$  (77 mg; 0,40 mmol) en  $\text{Et}_2\text{O}$  seco (2 mL) y lentamente *n*-BuLi (0,45 mL; 1,79 M). Posteriormente, se trasvasó la solución del cuprato sobre la solución del alquiniolfosfonato **18** (38 mg; 0,08 mmol) en  $\text{Et}_2\text{O}$  seco (2 mL). Finalmente, se agregó el  $\text{I}_2$  (204 mg; 0,81 mmol) bajo las condiciones descritas previamente. El progreso de la reacción se siguió por CCF. La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mL), y la fase acuosa se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de  $\text{NaCl}$  (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se determinó a partir de la intensidad y señalización de  $^{31}\text{P}$ -RMN del crudo de reacción, obteniéndose rendimientos del 48% ( $R_f = 0,36$ ; CCF corrida dos veces en  $\text{AcOEt}/\text{Hex}$  30%, líquido rojo pálido).

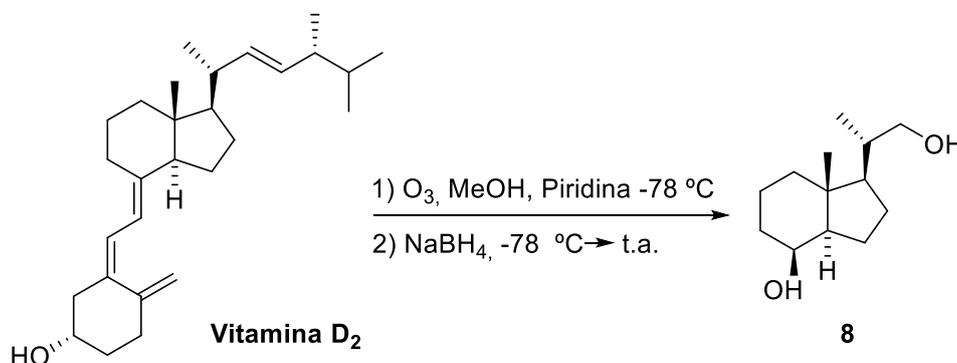
$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 150,63 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 12,0$  Hz; C-23); -13,71 (d,  $^1J_{\text{C-P}} = 124,8$  Hz); 71,74 (CH-8); 63,09 – 63,05 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 6,3$  Hz;  $\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OP}$ ); 56,15 (CH-17); 53,75 (CH-14); 42,01 (C-13); 40,40 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 13,2$  Hz;  $\text{CH}_2$ -22); 39,35 ( $\text{CH}_2$ ); 34,48

(CH<sub>2</sub>); 33,98 (CH-20); 32,18 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 12,6 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 29,75 (CH<sub>2</sub>); 28,24 (CH<sub>2</sub>); 24,05 (CH<sub>2</sub>); 22,71 (CH<sub>2</sub>); 17,98 (CH<sub>3</sub>-21); 17,65 (CH<sub>2</sub>); 16,24 – 16,20 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 5,7 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 14,07 (CH<sub>3</sub>), 13,79(CH<sub>3</sub>); 6,98 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 5,70 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

**<sup>31</sup>P-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ ppm: 9,93.

## 2.1.3- Síntesis del biciclo CD y la cadena lateral de EM1 para modificaciones vía química de cupratos [167]

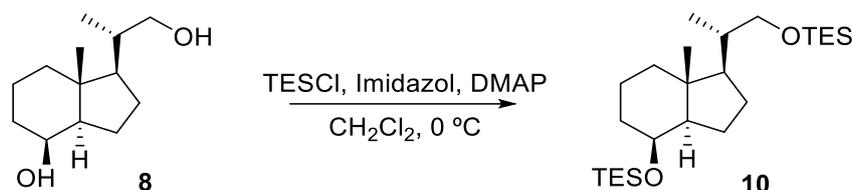
### 2.1.3.1- Síntesis de Des-A,B-23,24-dinorcolan-8 $\beta$ ,22-diol (Diol de Inhoffen-Lythgoe) (**8**)



En un reactor de vidrio con un cabezal provisto de un difusor de vidrio poroso, seco y purgado con nitrógeno, se preparó una disolución de la vitamina D<sub>2</sub> (3,57 g; 9 mmol) en metanol destilado (200 mL) y piridina seca (2,80 mL). La disolución se enfrió a -78 °C en atmósfera inerte, y a continuación se hizo burbujear una corriente de ozono/oxígeno provista por un ozonizador UNITEK (0,6 A; 1,5 L/h) durante 15 min., hasta que la solución adquirió un color ligeramente azulado (exceso de ozono). Se detuvo el flujo de ozono y la solución se purgó con nitrógeno hasta eliminar el ozono remanente (test de KI). Seguidamente se hizo un primer agregado de NaBH<sub>4</sub> (685 mg; 18 mmol) a -78 °C, y la mezcla de reacción se dejó en agitación permitiendo que suba la temperatura hasta -20 °C. Luego de 3 h se realizó un segundo agregado de NaBH<sub>4</sub> (685 mg; 18 mmol), se dejó alcanzar t.a, y se agregó NaBH<sub>4</sub> (357 mg; 9,3 mmol) una vez más. La mezcla se dejó en agitación durante toda la noche a t.a. Finalmente se concentró la mezcla y se extrajo, en un aparato de extracción continua, con Et<sub>2</sub>O durante 24 h. El residuo obtenido se concentró hasta obtener un aceite espeso de color pardo, que se sembró ayudado por alícuotas de metanol y se purificó por cromatografía flash en columna (3 x 30 cm, eluyente AcOEt/Hex 40%) obteniéndose el diol **8** (0,70 g; 47%, R<sub>f</sub> = 0,31; AcOEt/Hex 40%, sólido blanco) [187].

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  ppm: 4,05 (1H, s ancho, H-8); 3,60 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 10,5 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3,1 Hz; H-22); 3,32 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 10,4; <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,9 Hz, H-22); 1,00 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,6 Hz; H-21); 0,92 (3H, s, H-18).

### 2.1.3.2- Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ ,22-di(trietilsililoxi)-23,24-dinorcolano (**10**)

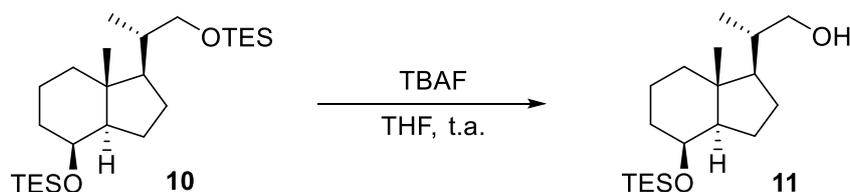


Sobre una solución del diol **8** (1,0 g; 4,71 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  y bajo atm. de  $\text{N}_2$ , se agregó sucesivamente imidazol (0,96 g; 14,15 mmol), una cantidad catalítica de DMAP y luego TESCl (1,6 mL; 9,65 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1 h. Se agregó  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL), y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (15 mL) y con  $\text{H}_2\text{O}$  (15 mL). Luego de secar, filtrar y concentrar se obtuvo el producto **10**, el cual fue utilizado para la siguiente reacción sin previa purificación ( $R_f = 0,84$ ; AcOEt/Hex 30%, sólido blanco).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  ppm: 4,00 (1H, s ancho, H-8); 3,62 (1H, m, H-22); 3,2 (1H, m, H-22); 2,00 (1H, m, H-14); 0,98 (18H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ); 0,60 (12H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 69,31 (CH-8); 67,56 (CH<sub>2</sub>-22); 53,50 (CH-17); 52,87 (CH-14); 42,24 (C-13); 40,68 (CH<sub>2</sub>); 38,80 (CH<sub>2</sub>); 34,68 (CH-21); 26,86 (CH<sub>2</sub>); 23,17 (CH<sub>2</sub>); 17,69 (CH<sub>2</sub>); 16,79 (CH<sub>3</sub>-21); 13,60 (CH<sub>3</sub>-18); 6,94 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ); 6,83 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ); 4,94 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 4,44 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

### 2.1.3.3- Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-23,24-dinorcolan-22-ol (**11**)

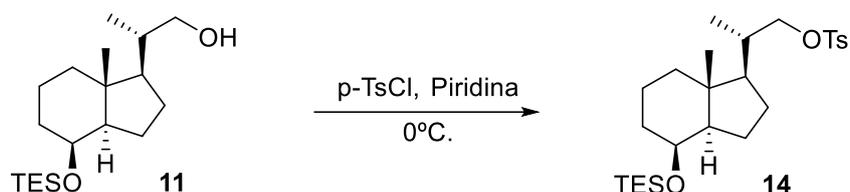


Sobre una solución del compuesto **10** (1,04 g; 4,71 mmol) en THF (15 mL) se agregó una solución de TBAF en THF (1 M; 2,35 mL). La mezcla de reacción se dejó en agitación bajo atm de N<sub>2</sub> y a t.a. La reacción se detuvo por adición de H<sub>2</sub>O (5 mL), y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1,5 x 15 cm, eluyente AcOEt/Hex 10%) obteniéndose el alcohol **11** (0,70 g; 91%, R<sub>f</sub> = 0,44; AcOEt/Hex 30%, líquido incoloro).

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  ppm: 4,00 (1H, s ancho, H-8); 3,62 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 10,4 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3,2 Hz; H-22); 3,36 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 10,4; <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,8 Hz, H-22); 1,02 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,6 Hz, 3H, H-20); 0,95 (12H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si y H-18); 0,55 (6H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,9 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  ppm: 69,23 (CH-8); 67,60 (CH<sub>2</sub>-22); 53,07 (CH-17); 52,79 (CH-14); 42,07 (C-13); 40,57 (CH<sub>2</sub>); 38,26 (CH<sub>2</sub>); 34,55 (CH-20); 26,75 (CH<sub>2</sub>); 23,01 (CH<sub>2</sub>); 17,58 (CH<sub>2</sub>); 16,59 (CH<sub>3</sub>-21); 13,47 (CH<sub>3</sub>-18); 6,83 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 4,91 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

### 2.1.3.4- Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-22-tosiloxi-23,24-dinorcolano (**14**)

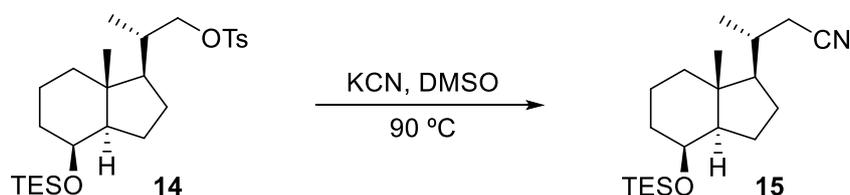


Sobre una solución del alcohol **11** (0,70 g; 2,13 mmol) en piridina (10 mL) a 0 °C, se agregó *p*-TsCl (0,60 g; 3,19 mmol). La mezcla se dejó en agitación a 0 °C durante 2 h y luego se dejó en la heladera toda la noche. Se agregó H<sub>2</sub>O helada y se extrajo con una mezcla de AcOEt/Hex (1:1) (2 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con HCl al 5% (2 x 15 mL), CuSO<sub>4</sub> (sat.) (3 x 10 mL), y H<sub>2</sub>O (20 mL); se secaron, filtraron y concentraron a presión reducida. El compuesto **14** obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación (0,88 g; R<sub>f</sub> = 0,38; AcOEt/Hex 10%, sólido blanco).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  ppm: 7,78 (2H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8,2 Hz; H-Ar); 7,33 (2H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8,0 Hz; H-Ar); 4,02 (1H, m, H-8); 3,79 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 9,2; <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,4 Hz, H-22); 3,97 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 9,2; <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3,1 Hz, H-22); 2,44 (3H, s, Me-Ar); 0,94 (12H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si y H-21); 0,87 (3H, s, H-18); 0,56 (6H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  ppm: 144,47 (C-Ar); 133,34 (C-Ar); 129,70 (CH-Ar); 127,88 (CH-Ar); 75,69 (CH<sub>2</sub>-22); 69,17 (CH-8); 52,75 (CH-17); 52,51 (CH-14); 42,16 (C-13); 40,45 (CH<sub>2</sub>); 35,74 (CH-20); 34,51 (CH<sub>2</sub>); 26,51 (CH<sub>2</sub>); 22,91 (CH<sub>2</sub>); 21,55 (CH<sub>3</sub>-Ar); 17,57 (CH<sub>2</sub>); 16,75 (CH<sub>3</sub>-21); 13,45 (CH<sub>3</sub>-18); 6,86 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 4,94 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

### 2.1.3.5- Síntesis de Des-A,B-8β-(triethylsililoxi)-22-ciano-23,24-dinorcolano (15)

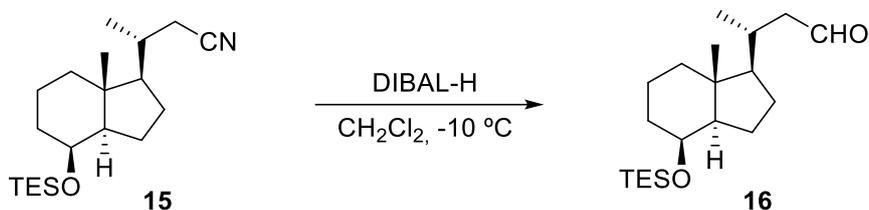


Sobre una disolución del tosilato **14** (0,88 g; 1,84 mmol) en DMSO (3 mL) se agregó KCN (0,18 g; 2,75 mmol), y la mezcla se dejó en agitación a 90 °C. Luego de 3 h, cuando se observó la conversión total del sustrato (CCF), se agregó H<sub>2</sub>O (5 mL) y se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de NaCl (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron a presión reducida. El producto **15** se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación (0,64 g; R<sub>f</sub> = 0,5; AcOEt/Hex 10%, líquido incoloro).

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 4,02 (1H, s ancho, H-8); 2,31 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 16,6 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3,8 Hz, H-22); 2,20 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 16,6 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,0 Hz, H-22); 1,11 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,6 Hz; H-21); 0,91 (3H, s, H-18); 0,93 (9H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8,0 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 0,54 (6H, c, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,9 Hz CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm: 118,99 (CN); 69,16 (CH-8); 55,41 (CH-17); 52,89 (CH-14); 42,10 (C-13); 40,40 (CH<sub>2</sub>); 34,43 (CH<sub>2</sub>); 33,11 (CH-20); 27,18 (CH<sub>2</sub>); 24,64 (CH<sub>2</sub>); 22,86 (CH<sub>2</sub>); 19,19 (CH<sub>3</sub>-21); 17,55 (CH<sub>2</sub>); 13,62 (CH<sub>3</sub>-18); 6,88 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 4,92 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

### 2.1.3.6- Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(triethylsililoxi)-24-norcolan-23-al (**16**)

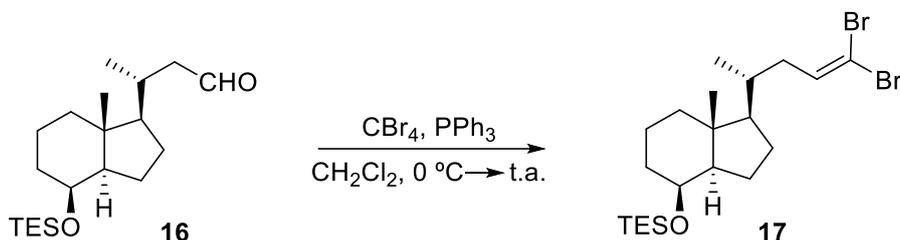


Sobre una solución del nitrilo **15** (0,64 g; 1,80 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) a -10 °C, se agregó por goteo lento, una solución de DIBAL-H 1 M en hexano (3,5 mL; 3,45 mmol). Al cabo de 30 min. se detuvo la reacción por agregado de HCl 10% (30 mL) y Et<sub>2</sub>O (15 mL). Se dejó en agitación 15 min. y luego se extrajo la fase acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 25 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y concentraron. El aldehído **16** se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación. (0,56 g; R<sub>f</sub> = 0,64; AcOEt/Hex 10%, líquido incoloro).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  ppm: 9,7 (1H, s ancho, -CHO); 4,02 (1H, s ancho, H-8); 2,45-2,41 (1H, m, H-22); 2,16-2,09 (1H, m, H-22); 0,98 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,5 Hz; H-21); 0,96-0,92 (3H, s, H-18 y 9H, t, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 0,54 (6H, c, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,8 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  ppm: 203,66 (CHO); 69,20 (CH-8); 56,49 (CH-17); 53,00 (CH-14); 50,74 (CH<sub>2</sub>-22); 42,22 (C-13); 40,57 (CH<sub>2</sub>); 34,47 (CH<sub>2</sub>); 31,21 (CH-20); 27,53 (CH<sub>2</sub>); 22,87 (CH<sub>2</sub>); 19,87 (CH<sub>3</sub>-21); 17,57 (CH<sub>2</sub>); 13,46 (CH<sub>3</sub>-18); 6,89 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 4,87 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

### 2.1.3.7- Síntesis de Des-A,B-8β-(trietilsililoxi)-24,24-dibromo-23-coleno (**17**)

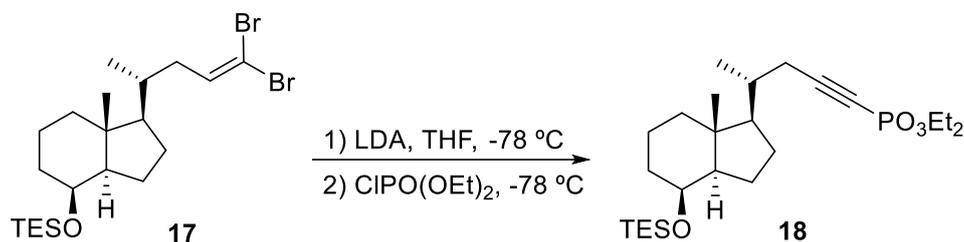


Sobre una solución del aldehído **16** (0,56 g; 1,66 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) se agregó  $\text{CBr}_4$  (0,88 g; 2,65 mmol) y se enfrió a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ . A continuación, se añadió  $\text{PPh}_3$  (1,40 g; 5,24 mmol) en seis porciones con intervalos de 2 min, observándose que la mezcla de reacción se tornaba color amarillo. Finalizado el agregado de  $\text{PPh}_3$ , se retiró el baño de hielo y se dejó la mezcla de reacción en agitación a t.a.; al cabo de unos minutos la solución se volvió turbia. Finalizada la reacción (CCF) a los 40 min., se agregó hexano (25 mL) y se dejó con buena agitación 10 min. más. Luego se filtró la suspensión blanca a través de sílica gel mediante una placa filtrante y se lavó con hexano hasta arrastrar todo el producto (CCF). El filtrado se concentró bajo presión reducida obteniéndose el compuesto **17**, el cual fue utilizado para la siguiente reacción sin previa purificación (0,57 g;  $R_f = 0,8$ ; AcOEt/Hex 5%, líquido incoloro) [224].

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  ppm: 6,39 (1H, dd,  $^2J_{\text{H-H}} = 8,0\text{ Hz}$ ;  $^3J_{\text{H-H}} = 6,6$ ; H-23); 4,03 (1H, m, H-8); 2,17 (1H, ddd,  $^3J_{\text{H-H}} = 3,4\text{ Hz}$ ;  $^3J_{\text{H-H}} = 6,5\text{ Hz}$ ;  $^2J_{\text{H-H}} = 14,7\text{ Hz}$ , H-22); 0,95 (12H, m  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$  y H-21); 0,91 (3H, s, H-18); 0,56 (6H, c,  $^3J_{\text{H-H}} = 7,9\text{ Hz}$ ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 137,84 (CH-23); 88,58 (C-24); 69,32 (CH-8); 56,49 (CH-17); 53,05 (CH-14); 42,26 (C-13); 40,65 ( $\text{CH}_2$ ); 39,56 ( $\text{CH}_2$ ); 35,22 (CH-20); 34,59 ( $\text{CH}_2$ ); 27,41 ( $\text{CH}_2$ ); 23,00 ( $\text{CH}_2$ ); 18,92 ( $\text{CH}_3$ -21); 17,65 ( $\text{CH}_2$ ); 13,53 ( $\text{CH}_3$ -18); 6,94 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ); 4,95 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ).

### 2.1.3.8- Síntesis de (Des-A,B-8β-trietilsililoxi-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (18)



Sobre una disolución de *n*-BuLi en hexano (3,60 mmol; 1,53 M) a 0 °C, se agregó lentamente *i*-Pr<sub>2</sub>NH (0,45 mL; 3,45 mmol) y luego, THF (8 mL); se dejó en agitación durante 40 min. a la misma temperatura. A continuación, sobre la solución de LDA a -78 °C, se agregó lentamente una solución del compuesto **17** (0,57 g; 1,15 mmol) en THF (5 mL) y se dejó en agitación. La solución se fue tornando color rojo oscuro, observándose la desaparición del sustrato (CCF) luego de 1h. Seguidamente, se enfrió la mezcla de reacción nuevamente a -78 °C, y se agregó lentamente CIPO(OEt)<sub>2</sub> (0,18 mL; 1,26 mmol). Finalizado el agregado, la mezcla de reacción se dejó en agitación permitiendo que suba la temperatura. La reacción se detuvo agregando HCl 5% (10 mL) y la fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 25 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1,5 x 20 cm, eluyente AcOEt/Hex 30%) obteniéndose el alquinilfosfonato **18** (0,39 g; 40 %, R<sub>f</sub> = 0,27; AcOEt/Hex 30%, líquido incoloro).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 4,08 (4H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 3,96 (1H, s ancho, H-8); 2,32 (1H, m, H-22); 2,15 - 2,08 (1H, m, H-22); 1,30 (6H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,0 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 1,00 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,6 Hz, H-21); 0,88 (9H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,9 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 0,84 (3H, s, H-18); 0,48 (6H, c, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8,0 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

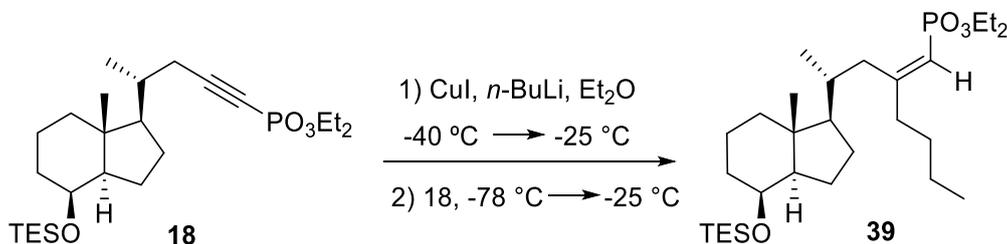
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm: 102,23 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 52,9 Hz, C-23); 71,25 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 302,6 Hz, C-24); 69,0 (CH-8); 62,66 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5,5 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 55,49 (CH-17); 52,80 (CH-14); 41,96 (C-13); 40,34 (CH<sub>2</sub>); 34,54 (d, <sup>4</sup>J<sub>H-P</sub> = 2,4 Hz, CH-20); 34,32 (CH<sub>2</sub>); 27,04 (CH<sub>2</sub>); 26,19 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 4,3 Hz, CH<sub>2</sub>-22); 22,70 (CH<sub>2</sub>); 18,94 (CH<sub>3</sub>-21);

17,40 (CH<sub>2</sub>); 15,93 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7,0 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 13,43 (CH<sub>3</sub>-18); 6,74 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si);  
4,72 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ ppm: -6,09.

**HRMS** (ESI): calculado para C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>PSi (M+H): 471,3059; encontrado: 471,3054.

### 2.1.3.9- Síntesis de (Z)-(Des-A,B-23-butil-8β-trietilsililoxi-23-colin-24-il) fosfonato de dietilo (39)



Sobre una suspensión de CuBr (194 mg; 1,35 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (4 mL) a -40 °C, se agregó lentamente *n*-BuLi (1,08 mL; 2,5 M), y se dejó en agitación durante 1 h permitiendo que suba la temperatura hasta -25 °C. A continuación, se trasvasó la solución de cuprato (9,45 mL; 0,1 M) sobre la solución del alquiniolfosfonato **18** (126 mg; 0,27 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (3 mL) -78 °C. La mezcla de reacción se dejó en agitación manteniendo la temperatura por debajo de -25 °C. Luego de 3 h la reacción finalizó (CCF). Se agregó una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (5 mL) y la fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron, se filtraron y concentraron a presión reducida. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1 x 10 cm, eluyente AcOEt/Hex 30%), obteniéndose el alquenilfosfonato **39** (56 mg, 40%, R<sub>f</sub> = 0,33; CCF corrida dos veces en AcOEt/Hex 30%, líquido incoloro) [160].

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 5,40 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>H-P</sub> = 18,2 Hz; H-24); 4,08-3,99 (5H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP, H-8); 2,64 (1H, t, *J* = 12,3 Hz; H-22); 2,24 (1H, m, H-22); 2,18-2,01 (2H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 1,31 (6H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 0,96-0,89 (12H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si, H-18, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-); 0,84 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,5 Hz; H-21); 0,55 (6H, c, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,9 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

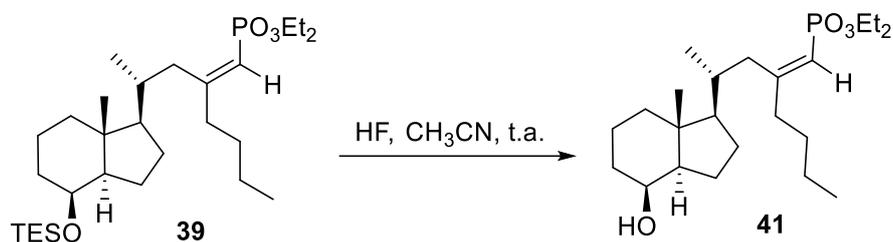
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm: 167,10 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,8 Hz; C-23); 112,64 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 189,6 Hz; CH-24); 69,58 (CH-8); 61,25 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 61,19 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 57,74 (CH-17); 53,24 (CH-14); 42,51 (C-13); 40,84 (CH<sub>2</sub>); 39,48 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,8 Hz; CH<sub>2</sub>-22); 37,84 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 22,7 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 34,75 (CH<sub>2</sub>); 34,38 (CH-20); 29,90 (CH<sub>2</sub>); 27,78 (CH<sub>2</sub>); 23,18 (CH<sub>2</sub>); 22,51 (CH<sub>2</sub>); 17,98

(CH<sub>3</sub>-21); 17,82 (CH<sub>2</sub>); 16,55 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 14,07 (CH<sub>3</sub>), 13,79(CH<sub>3</sub>); 7,09 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 5,12 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ ppm: 18,66.

**HRMS (ESI):** calculado para C<sub>29</sub>H<sub>58</sub>O<sub>4</sub>PSi (M+H): 529,38420; encontrado: 529,38365.

### 2.1.3.10- Síntesis de (Z)-(Des-A,B-23-butil-8β-hidroxi-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (41)

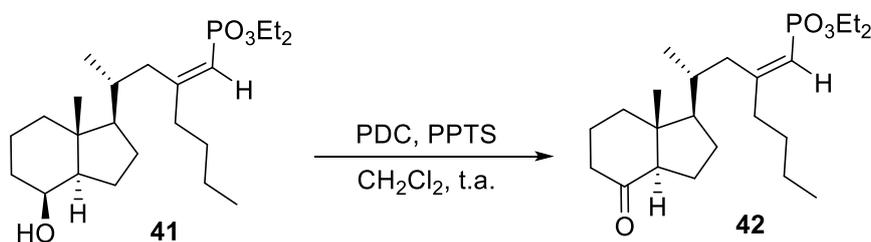


Sobre una disolución de **39** (56 mg; 0,107 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (2 mL), se agregó HF (48 %, 2 gotas). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y transcurrida 1 h, se agregó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H<sub>2</sub>O, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtraron y concentraron a presión reducida. El compuesto **41** fue utilizado directamente en la siguiente reacción, sin previa purificación (42 mg, 95%, R<sub>f</sub> = 0,45; AcOEt/Hex 50%, líquido incoloro).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 5,40 (d, <sup>2</sup>J<sub>H-P</sub> = 18,1 Hz; H-24); 4,09 – 3,98 (5H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP y H-8); 2,66 (1H, m, H-22); 2,25 (1H, m, H-22); 1,30 (6H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 0,85 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,6 Hz, H-21).

<sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ ppm: 18,58.

### 2.1.3.11- Síntesis de (Z)-(Des-A,B-23-butil-8-oxo-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (42)



Sobre una solución del alcohol **41** (42 mg; 0,102 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL), se agregó sucesivamente PDC (115 mg; 0,306 mmol) y una cantidad catalítica de PPTS. La mezcla de reacción se dejó en agitación a t.a. durante 3 h en ausencia de luz. Luego se agregó una mezcla de AcOEt/Hex al 25% (5 mL), se dejó 15 min más en agitación y se filtró a través de celite® mediante una placa filtrante. Los sólidos se lavaron con AcOEt/Hex al 50% hasta arrastrar todo el producto (CCF). El filtrado se concentró y el residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1 x 12 cm, eluyente AcOEt/Hex 40%) obteniéndose el compuesto **42** (28 mg, 67%, R<sub>f</sub> = 0,20; AcOEt/Hex 50%, líquido incoloro).

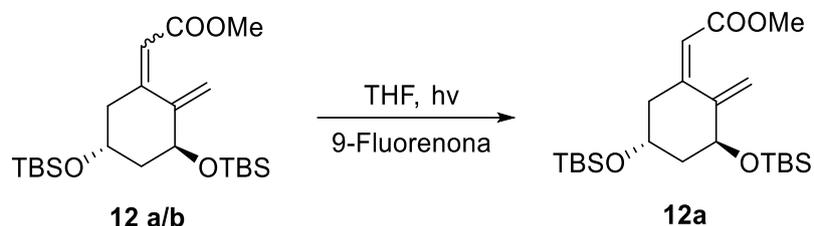
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 5,41 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>H-P</sub> = 17,8 Hz; H-24); 4,03 (4H, m, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 2,73 (1H, t, J = 12,2 Hz; H-22); 2,45 (1H, m, H-22); 1,30 (6H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 0,92-0,87 (6H, m, H-21 y CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-); 0,65 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ: 212,09 (C=O); 166,24 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 7,1 Hz, C-23); 113,00 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-P</sub> = 189,5 Hz, CH-24); 62,07 (CH-14), 61,29 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5,8 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 61,19 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5,7 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 57,49 (CH-17); 50,13 (C-13); 41,07 (CH<sub>2</sub>); 39,30 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,9 Hz, CH<sub>2</sub>-22); 39,00 (CH<sub>2</sub>); 37,74 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 22,5 Hz, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 34,57 (d, J = 1,7 Hz, CH-20), 29,83 (CH<sub>2</sub>); 27,95 (CH<sub>2</sub>); 24,15 (CH<sub>2</sub>); 22,46 (CH<sub>2</sub>); 19,23 (CH<sub>2</sub>); 18,01 (CH<sub>3</sub>-21); 16,53 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,5 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 14,05 (CH<sub>3</sub>); 12,69 (CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ: 18,32.

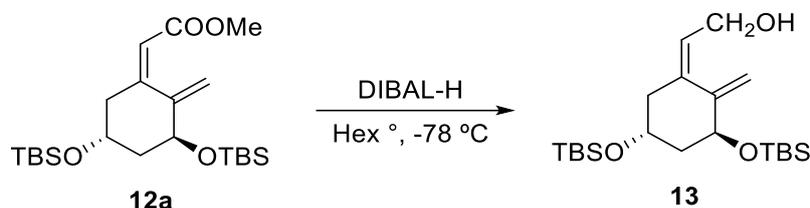
## 2.1.4- Síntesis del anillo A para el acoplamiento de Wittig-Horner [172]

### 2.1.4.1- Síntesis de Síntesis de (2Z)-2-[(3S,5R)-3,5-Bis[[1,1-dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-2-metilidenciclohexilideno]acetato de metilo (12a)



En un tubo Schlenk seco y purgado con N<sub>2</sub> se preparó una solución de la mezcla de isómeros **12a** y **12b** (212 mg, 0,58 mmol) en THF (30 mL). Posteriormente se agregó 9-fluorenona (11 mg, 0,049 mmol) y se irradió la mezcla con radiación ultravioleta mediante 4 lámparas durante 90 min. Transcurrido este tiempo se observó, por CCF, que la isomerización finalizó y se procedió a concentrar y purificar por cromatografía flash en columna (1 x 15 cm, eluyente Et<sub>2</sub>O 1%) obteniéndose el éster **12a** (200 mg, 95%, R<sub>f</sub> = 0,56 AcOEt/Hex 8%).

### 2.1.4.2- Síntesis de (2Z)-2-[(3S,5R)-3,5-Bis[[1,1-dimetiletil]dimetilsilil]oxi]-2-metilidenciclohexilideno]etanol (**13**)

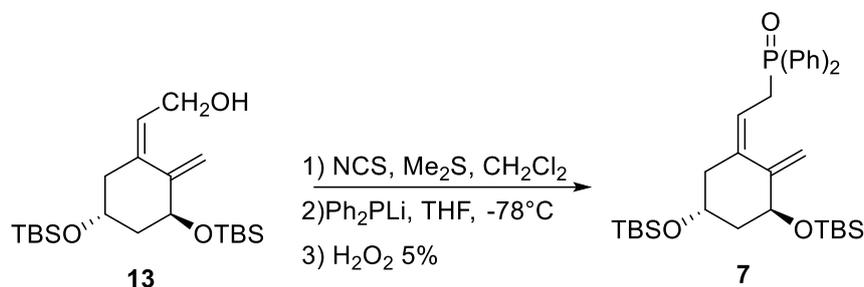


Sobre una solución del éster **12a** (200 mg; 0,55 mmol) en hexano seco (7 mL) a -78°C, se agregó una solución 1M de DIBAL-H en hexano (0,73 mL; 0,73 mmol). La mezcla se dejó bajo agitación 1 h, verificando la finalización de la reacción por CCF, (AcOEt/Hex 10%). Posteriormente se agregó Et<sub>2</sub>O (1 mL) y H<sub>2</sub>O (1 mL), observándose la aparición de un precipitado blanco, el cual se disolvió con NaOH 4M (1 mL) y H<sub>2</sub>O (1 mL). Luego se agregaron pequeñas cantidades de sílica gel (200-425 mesh), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y Et<sub>2</sub>O. Finalmente se filtró la mezcla, lavando la sílica con Et<sub>2</sub>O hasta arrastrar todo el producto (CCF) y se concentró, obteniéndose el producto **13** (0,18 g; 95%, R<sub>f</sub> = 0,46; AcOEt/Hex 10%, sólido blanco).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 5,52 (1H, t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,9 Hz; H-6); 5,15 (1H, s ancho, H-19); 4,75 (1H, s ancho, H-19); 4,42-4,34 (1H, m, H-7); 4,21-4,13 (3H, m, H-7, H-1 y H-3); 2,39 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 13,0; 3,6 Hz, H-4); 2,17 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 13,2; 6,6 Hz, H-4); 1,85 – 1,76 (2H, m, H-2); 1,25 (1H, s ancho, -OH); 0,87 (18H, d, J = 4,1 Hz; (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C); 0,04 (s, 12H, CH<sub>3</sub>-Si).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm: 126,68 (C-6); 110,59 (C-19); 71,31 (C-1); 67,34 (C-3); 59,60 (C-7); 45,26 (C-2); 44,56 (C-4); 25,76 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C).

**2.1.4.3- Síntesis de óxido de [(2Z)-2-[(3S,5R)-3,5-Bis[[1,1-dimeteil]dimetilsilil]oxi]-2-metilidenciclohexilideno]etil]difenilfosfina (Óxido de fosfina) (7)**



Sobre una solución de NCS (78 mg; 0,58 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) a 0°C, se agregó Me<sub>2</sub>S (43 μL; 0,58 mmol) de a gotas, observándose la aparición de un precipitado blanco fino. A continuación, se enfrió a -20°C y se agregó, vía cánula, una solución del alcohol **13** (115 mg; 0,29 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL). Luego de 90 min se observó por CCF que esta etapa de la reacción había finalizado y se procedió al agregado de H<sub>2</sub>O (5 mL). Posteriormente se extrajo con hexano (4 x 5 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró.

Sobre una solución de HPPH<sub>2</sub> (128 μL; 0,73 mmol) en THF seco (3 mL) a -78°C, se agregó *n*-BuLi (301 μL; 0,65 mmol), observándose la coloración roja intensa característica del anión correspondiente. Dicho anión se agregó, vía canula sobre una disolución en THF (3 mL) del cloruro obtenido en la primera etapa, a -78°C, hasta observar una coloración permanente de la solución resultante. Se dejó la mezcla bajo agitación toda la noche, verificando que la reacción se completó por CCF (AcOEt/Hex 10%).

Finalmente se agregó una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5% (10 mL) y se dejó 30 min bajo agitación. Una vez finalizada la reacción, se agregó H<sub>2</sub>O (5 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron y concentraron a presión reducida, obteniéndose el óxido de fosfina **7** (0,43 g; 77%, R<sub>f</sub> = 0,30; AcOEt/Hex 40%, sólido blanco).

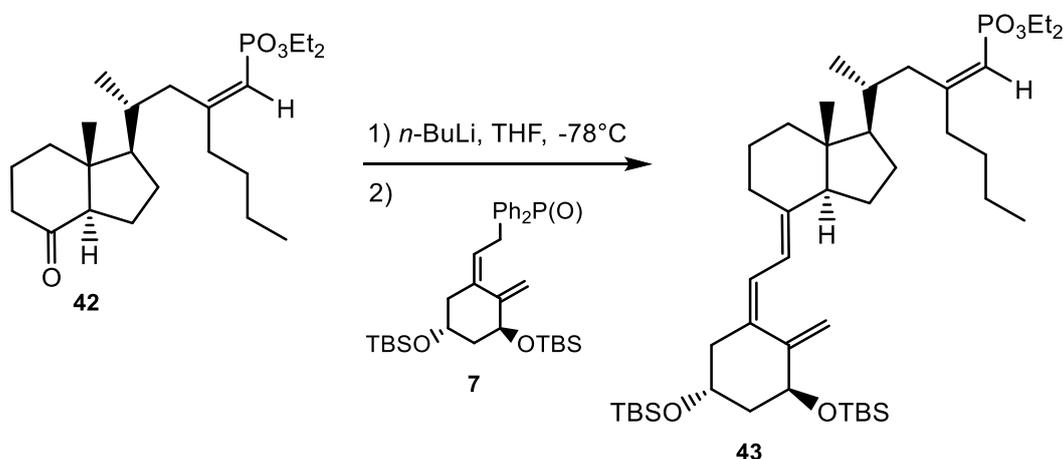
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 7,75 – 7,65 (4H, m, H-Ar); 7,52 – 7,38 (6H, m, H-Ar); 5,37-5,28 (1H, m, H-6); 5,14 (1H, s ancho, H-19); 4,72 (1H, s ancho, H-19); 4,38 – 4,31 (1H, m, H-1); 4,14 – 4,06 (1H, m, H-3); 3,39 (1H, dt, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 14,2; 8,6 Hz; H-7);

3,15 (1H, dt,  $^3J_{\text{H-H}} = 15,8; 6,5$  Hz; H-7); 0,95 – 0,75 (18H, m,  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ ); 0,06 – -0,06 (12H, m,  $\text{CH}_3\text{-Si}$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 131,79 (C-Ar); 131,76 (C-Ar); 131,11(C-Ar); 131,10 (C-Ar); 130,99 (C-Ar); 130,97 (C-Ar); 128,64 (C-Ar); 128,62 (C-Ar); 128,49 (C-Ar); 128,47 (C-Ar); 115,03 (C-6); 110,23 (C-19); 70,80 (C-1); 67,48 (C-3); 45,50 (C-4); 44,80 (C-2); 31,76 (C-9); 30,82 (C-9); 25,80 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ); 21,10 ( $\text{CH}_3\text{-Si}$ ).

## 2.1.5- Síntesis del análogo SG a través del acoplamiento de Wittig-Horner

### 2.1.5.1- Síntesis de (5Z,7E,23Z)-(1S,3R)-[23-n-butil-1,3bis-(1,1-dimetiletil)dimetilsililoxi-9,10-secocola-5,7,10(19),23-tetraen-24-il]fosfonato de dietilo (43)



Sobre una disolución del óxido de fosfina **7** (83 mg; 0,61 mmol) en THF (2 mL) a -78°C, se agregó gota a gota *n*-BuLi (0,1 mL; 1,45 M en hexano), observándose la aparición progresiva de un color rojo intenso. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se mantuvo con agitación a la misma temperatura durante 1 h. Luego, en ausencia de luz, se agregó gota a gota una disolución de la cetona **42** (28 mg; 0,068 mmol) en THF (3 mL) y se dejó en agitación durante 3 h en las mismas condiciones. Al cabo de ese tiempo, se detuvo el enfriamiento, permitiendo que la temperatura alcance -40°C lentamente, en un plazo de 2 h. La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (5 mL), y la mezcla se extrajo con AcOEt (4 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1 x 22 cm, eluyente AcOEt/Hex 20%), obteniéndose el análogo protegido **43** (33 mg, 49%, R<sub>f</sub> = 0,79; AcOEt/Hex 50%, líquido color ambar).

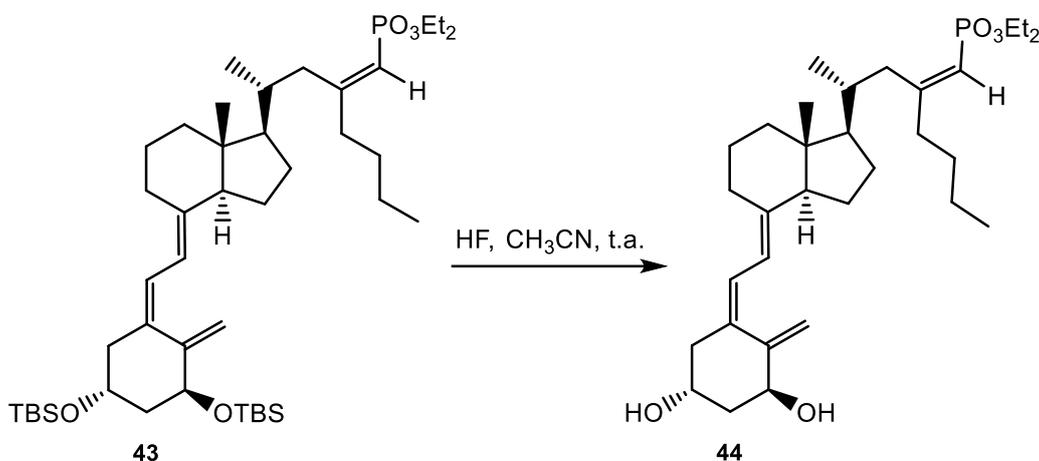
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 6,23 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 11,2 Hz; H-6); 6,01 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 11,2 Hz; H-7); 5,41 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>H-P</sub> = 18,1 Hz; H-24); 5,18 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 2,5 Hz; H-19); 4,86 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 2,6 Hz; H-19); 4,37 (1H, m, H-1); 4,18 (1H, m, H-3); 4,11 – 3,97 (4H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 2,81 (1H, m, H-22); 2,67 (1H, m, H-22); 2,43 (1H, m, H-20); 1,31

(6H, t,  $^3J_{\text{H-H}} = 7,1$  Hz;  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 0,88 y 0,87 (18H, s, *t*-butilSi); 0,56 (3H, s, H-18); 0,06 (12H, m,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$ : 166,83 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 7,1$  Hz; C-23); 148,57 (C-10); 141,02 (C-8); 135,19 (C-5); 123,29 (CH-6), 118,10 (CH-7), 112,73 (d,  $^1J_{\text{C-P}} = 190$  Hz, CH-24); 111,18 ( $\text{CH}_2$ -19); 72,07 (CH-1); 67,68 (CH-3); 61,26 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5,4$  Hz;  $\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OP}$ ); 61,20 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5,5$  Hz;  $\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OP}$ ); 57,49 (CH-17); 56,46 (CH-14); 46,11 ( $\text{CH}_2$ ), 46,06 (C-13); 44,97 ( $\text{CH}_2$ ); 40,65 ( $\text{CH}_2$ ); 39,61 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 6,8$  Hz;  $\text{CH}_2$ -22); 37,82 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 22,7$  Hz;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -), 35,21 (CH-20), 29,87 ( $\text{CH}_2$ ), 28,98 ( $\text{CH}_2$ ), 28,13 ( $\text{CH}_2$ ), 26,00 [ $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{C-Si}$ ]; 25,97 [ $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{C-Si}$ ]; 23,62 ( $\text{CH}_2$ ); 22,49 ( $\text{CH}_2$ ); 22,33 ( $\text{CH}_2$ ); 18,40 [ $(\text{CH}_3)_3\underline{\text{C}}\text{-Si}$ ]; 18,28 [ $(\text{CH}_3)_3\underline{\text{C}}\text{-Si}$ ]; 18,20 ( $\text{CH}_3$ -21); 16,55 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 6,6$  Hz,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 14,07 ( $\text{CH}_3$ ); 12,20 ( $\text{CH}_3$ -18); -4,50 ( $\text{CH}_3\text{-Si}$ ); -4,54 ( $\text{CH}_3\text{-Si}$ ); -4,65 ( $\text{CH}_3\text{-Si}$ ); -4,94 ( $\text{CH}_3\text{-Si}$ ).

$^{31}\text{P-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$ : 18,62.

### 2.1.5.2- Síntesis de (5Z,7E,23Z)-(1S,3R)-[1,3-dihidroxi-23-n-butil-9,10-secocola-5,7,10(19),23-tetraen-24-il]fosfonato de dietilo (Análogo SG) (44)



Sobre una solución de **43** (33 mg; 0,034 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (2 mL) se agregó HF (48 %, 2 gotas) lentamente. Transcurridos 30 min, se agregó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H<sub>2</sub>O, se secaron, filtraron y concentraron. Previo a los ensayos biológicos el compuesto **44**, fue purificado por cromatografía preparativa, utilizando AcOEt grado HPLC como eluyente, obteniéndose el análogo **44** (10 mg, 40%, R<sub>f</sub> = 0,12; AcOEt/Hex, 80%, líquido color ambar).

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 6,37 (1H, d,  $^3J_{H-H}$  = 11,2 Hz; H-6); 6,02 (1H, d,  $^3J_{H-H}$  = 11,2 Hz; H-7); 5,41 (1H, d,  $^2J_{H-P}$  = 18,2 Hz; H-24); 5,32 (1H, m, H-19); 4,99 (1H, m, H-19); 4,43 (1H, m, H-1); 4,22 (1H, m, H-3); 4,09-3,99 (4H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 2,82 (1H, m, H-22); 2,70 – 2,56 (2H, m, H-22, H-20); 1,31 (8H, t,  $^3J_{H-H}$  = 7,0 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 0,94 – 0,83 (7H, m, H-17, H-21, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-); 0,57 (3H, s, H-18).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$ : 166,87 (d,  $^2J_{C-P}$  = 7,0 Hz; C-23); 147,82 (C-10); 143,17 (C-8); 133,11 (C-5); 125,10 (CH-6); 117,26 (CH-7); 112,70 (d,  $^1J_{C-P}$  = 190 Hz; CH-24); 111,88 (CH<sub>2</sub>-19); 70,96 (CH-1); 67,00 (CH-3); 61,32 (d,  $^2J_{C-P}$  = 5,3 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 61,25 (d,  $^2J_{C-P}$  = 5,3 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 57,45 (CH-17); 56,47 (CH-14); 46,21 (C-13); 45,42 (CH<sub>2</sub>); 43,00 (CH<sub>2</sub>); 40,52 (CH<sub>2</sub>); 39,55 (d,  $^3J_{C-P}$  = 6,9 Hz; CH<sub>2</sub>-22); 37,89 (d,  $^3J_{C-P}$  = 22,7 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 35,17 (d,  $J$  = 1,6 Hz, CH-20); 29,89 (CH<sub>2</sub>); 29,19 (CH<sub>2</sub>);

28,05 (CH<sub>2</sub>); 23,70 (CH<sub>2</sub>); 22,51 (CH<sub>2</sub>); 22,39 (CH<sub>2</sub>); 18,20 (CH<sub>3</sub>-21); 16,55 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 6,5 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 14,08 (CH<sub>3</sub>); 12,26 (CH<sub>3</sub>-18).

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ: 18,63.

UV (*i*-PrOH): λ<sub>max</sub> 253 nm, λ<sub>min</sub> 232 nm (ε: 2.688,8 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

## 2.2- Ensayos biológicos

### 2.2.1- Preparación de la solución stock del calcitriol y análogo SG

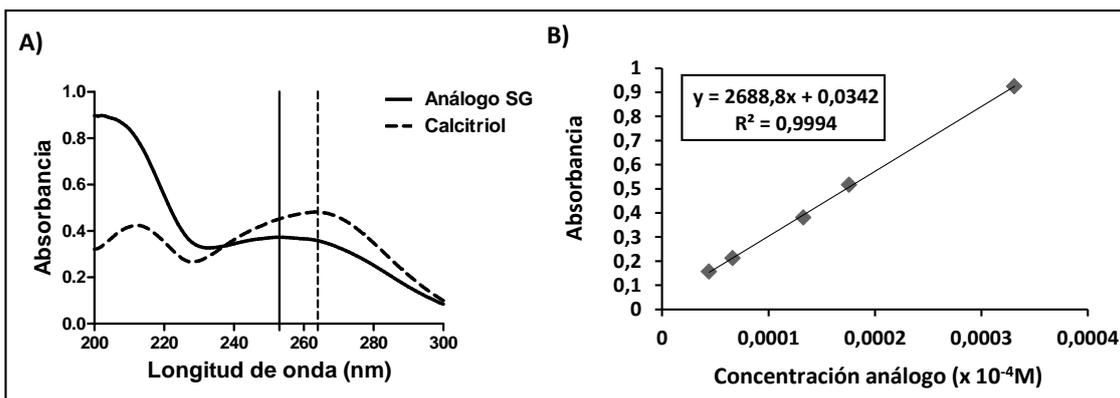
El calcitriol y el análogo SG, fueron resuspendidos en isopropanol (vehículo) calidad HPLC. Se protegieron de la luz, se gasearon con N<sub>2</sub> y conservaron a -20°C en viales de vidrio [168].

Dado que el sistema triénico conjugado del calcitriol, y el análogo SG, le confiere la característica de absorción de luz UV; y además en el caso de SG, la presencia de un grupo vinilfosfonato conjugado en la cadena lateral, es que la concentración de las soluciones fue determinada por espectrofotometría UV, realizando un espectro de absorción entre 200 y 300 nm.

El coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de la vitamina D es de 18.300 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (l<sub>máx</sub>): 264 nm) [225]. Por lo tanto, mediante el empleo de la ley de Lambert-Beer [226] se calculó la concentración de la solución madre de calcitriol:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia a la } l_{\text{máx}} \times \text{Factor de dilución}}{\epsilon}$$

Para el análogo SG se calculó el  $\epsilon$  mediante la realización de una curva de calibrado. Se prepararon soluciones del análogo de diferentes concentraciones, se midieron en el espectrofotómetro entre un rango de longitudes de onda de 200 y 300 nm, determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia a la l<sub>máx</sub>. Se construyó un gráfico representando los valores de absorbancia en el eje de las ordenadas y los de concentración en el eje de las abscisas (**Figura 42**). Se trabajó con la precaución de respetar la zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer (la absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración). Se calculó gráficamente el valor de  $\epsilon$  a partir de la curva de calibrado, que corresponde a la pendiente de la recta. En nuestro caso, el valor de  $\epsilon$  para el análogo SG fue de 2.688,8 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Además, para el sistema triénico, el l<sub>máx</sub> del calcitriol es 264 nm y para el análogo SG es 253 nm (**Figura 42**). Luego se calculó la concentración de la solución madre mediante el empleo de la ley de Lambert-Beer.



**Figura 42.** Espectro UV del calcitriol y del análogo SG, y determinación del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) para el SG. A) La representación de los espectros del calcitriol y del SG muestran las  $\lambda_{máx}$  de los compuestos. B) La pendiente de recta de la curva de calibrado corresponde al  $\epsilon$  del análogo SG.

### 2.2.2- Evaluación del calcio plasmático en ratones

Se utilizaron ratones macho de la cepa CF1 de entre 8-10 semanas de vida y con un peso aproximado de 40 g. Los ratones fueron cedidos por el Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur y tratados de acuerdo con las pautas del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (078/2016). Los animales se alojaron en condiciones libres de patógenos, en jaulas de plástico, en condiciones de temperatura y humedad controladas, con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas y con libre disponibilidad de agua filtrada y alimento. Los mismos fueron aclimatados durante al menos una semana antes de su uso, por lo tanto, los protocolos de experimentación se iniciaron después de un período de aclimatación de 7 días.

Los estudios de los niveles de calcio se llevaron a cabo tras una serie de inyecciones vía intraperitoneal de calcitriol, análogo SG e isopropanol (vehículo) durante 4 días. Se utilizaron 6 animales por condición a los cuales se los trató con una dosis  $5 \mu g/kg$  de peso corporal de calcitriol, análogo SG y vehículo. Esta concentración se eligió en base a trabajos previos en los cuales se demuestra que el calcitriol en esa concentración es suficiente para ejercer efectos antitumorales [194], obteniéndose en estudios farmacocinéticos una concentración máxima ( $C_{máx.}$ )  $> 10.0 \text{ ng/ml}$  y un área debajo de la curva (AUC)  $> 40.0 \text{ ng h/mL}$  [193].

Se tomaron muestras de sangre para analizar los niveles de calcio plasmático, a las 0 (niveles basales) 24, 48, 72 y 96 hs posteriores a la administración de las drogas. Para ello, los animales fueron anestesiados con Acedan <sup>®</sup> (Holliday Scott, Argentina) en una

dosis de 0,22 mg/kg de peso corporal y posteriormente se colectó sangre del seno retro orbital utilizando capilares heparinizados. Las muestras fueron procesadas, protegidas de la luz y se mantuvieron en hielo. Se separó el plasma por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos y se almacenó a -20°C hasta su procesamiento [137]. Se obtuvieron aproximadamente 10-30 µL de plasma por cada muestra de ratón.

La concentración de calcio se determinó utilizando el kit colorimétrico Ca-Color Arsenazo III AA kit (Wiener Lab, Argentina; cat # 1152004), según las indicaciones del fabricante. En tres tubos: un blanco (B), un standard (S) y la muestra a analizar (D) se agregaron los siguientes componentes:

|                      | Blanco (B) | Estándar (S) | Desconocido (D) |
|----------------------|------------|--------------|-----------------|
| Agua destilada       | 10 µl      | -            | -               |
| Estándar             | -          | 10 µl        | -               |
| Muestra a determinar | -          | -            | 10 µl           |
| Reactivo de color    | 1 ml       | 1 ml         | 1 ml            |

Se incubó la mezcla de reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente (15°- 25° C) y se leyó la absorbancia (Abs) en espectrofotómetro a 650 nm. El calcio plasmático se determinó utilizando la siguiente fórmula:

|   |
|---|
| <b>Calcio plasmático (mg/dL) = Absorbancia del tubo D x F</b>               |
| F (factor) = 10 mg/dL (concentración del estándar) / Absorbancia del tubo S |

Para ajustar las diferencias debido a la posible hemólisis en las muestras, se prepararon blancos y su lectura de absorbancia se restó de la lectura de las muestras. Los niveles de calcio plasmático se consideraron normales en el rango de 8,5 a 10,5 mg/dL [199,227]; valores coincidentes con los de calcemia normal en humanos [200]. Pevio a la determinación del calcio plasmático se midió el hematocrito para cada ratón antes y después de los tratamientos para determinar su estado de salud, sabiendo que los niveles normales del mismo varían entre 39 - 47 % [203] y que niveles elevados de este parámetro son un síntoma de intoxicación [202]. El hematocrito se determinó mediante la centrifugación de los capilares heparinizados. De este modo, se separó la parte sólida (elementos celulares) de la parte líquida (plasma) de la sangre. El cálculo del mismo, se

estableció a partir del cociente entre el volumen de los elementos celulares dividido el volumen total de sangre (elementos celulares más plasma sanguíneo). Los ratones fueron observados durante el tratamiento con el fin de estudiar la toxicidad de los compuestos. Esto se evaluó mediante medidas clínicas, como la pérdida de peso, cambios en la apariencia y el comportamiento, aparición de conjuntivitis, escalofríos, sed, letargo y muerte. Síntomas que han sido asociados a la hipercalcemia [201].

### **2.2.3- Cultivo Celular**

#### **2.2.3.1- Mantenimiento de los cultivos celulares**

Se utilizaron las líneas celulares de adenocarcinoma mamario murino LM3 [223], de carcinoma colorrectal humano HCT116, de glioma humano T98G, U251, y murino GL26; y de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello humano HN12.

Las células fueron cultivadas en medio DMEM (del inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma), suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco) en una concentración de 5 % v/v o 10 % v/v según la línea, L-glutamina (5 mM, Gibco), penicilina (Gibco, 100 U/mL) y estreptomycin (Gibco, 100 µg/mL). Las células se mantuvieron a 37 °C bajo atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Las células GL26 fueron cultivadas en medio RPMI (del inglés Roswell Park Memorial Institute Medium, Sigma) suplementado con 10 % v/v de SFB, L-glutamina (5 mM, Gibco), penicilina (100 U/mL, Gibco), y estreptomycin (100 µg/mL, Gibco). El medio correspondiente a las células HC11 fue suplementado con insulina (5 µg/mL, Gibco). Las células se mantuvieron a 37 °C bajo atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Al momento que las células formaban monocapa, el medio de cultivo fue aspirado y descartado, se lavaron con PBS 1X (8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,27g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 1 litro de agua Milli-Q, pH 7,4) para remover los inhibidores de tripsina presentes en el suero y luego se agregó a cada placa 500 µL de solución de tripsina (0,25 %; EDTA 0,53 mM). Se incubaron a 37 °C hasta observar en el microscopio que las células se despegaran. Posteriormente las células fueron resuspendidas con medio de cultivo y se plaquearon a una densidad de 5 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> en placas de 100 mm de diámetro.

#### **2.2.3.2- Preservación criogénica**

Cuando los cultivos celulares alcanzaron el 85 % de confluencia, las células fueron tripsinizadas como se describió anteriormente, centrifugadas por 5 min a 1.200 rpm y

luego resuspendidas en medio de cultivo con suero fetal bovino 20 % (v/v) y dimetil sulfóxido (DMSO) 10 % (v/v). Las células fueron fraccionadas en alícuotas de a 1 ml en criotubos y colocadas en un dispositivo “cryo-cooler” a -70 ° C. Luego de 24 h las células fueron transferidas a nitrógeno líquido.

## **2.2.4- Ensayos celulares**

### **2.2.4.1- Ensayos de viabilidad celular: conteo en cámara de Neubauer**

Se analizaron los efectos del análogo SG en la relación dosis-respuesta a partir del ensayo de viabilidad celular por medio del conteo manual de células en cámara de Neubauer. A tal fin, se repicaron las células de la siguiente manera: se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con 5 mL de buffer fosfato salino (PBS) 1X estéril, se descartó el PBS y posteriormente se agregaron 500 µL de tripsina estéril. Una vez que las células perdieron su adhesión a la placa de cultivo, se frenó la acción de la tripsina por el agregado de 2 mL del medio de cultivo estéril correspondiente a la línea celular. Se homogeneizó la suspensión celular y se cargó 10 µL de ella por duplicado en la cámara de Neubauer para determinar el número de células presentes por mL de suspensión.

Para realizar los ensayos de viabilidad celular se trabajó con placas de 96 pocillos. Las células fueron sembradas en una densidad de 500 a 2.000 células cada 100 µL de medio completo por pocillo e incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda de 5 % de CO<sub>2</sub>. La densidad celular varió en función de la línea en estudio y del tiempo de tratamiento a ensayar. Transcurridas 24 h desde su siembra, se prepararon las concentraciones para realizar los tratamientos celulares (0,01; 0,1; 1; 10; 100 nM) a partir de las soluciones madres de calcitriol, análogo o vehículo (isopropanol). Los tratamientos con cada concentración se realizaron por cuadruplicado. La concentración de vehículo empleado (concentración máxima 0,1% v/v) no tuvo efecto significativo sobre las líneas celulares. El medio con drogas o vehículo, fueron renovados cada 2 días hasta realizarse el conteo celular. Las células fueron incubadas por 24, 48, 72, 96 y 120 horas de tratamiento. Para el recuento celular se removió el medio de cada pocillo, se realizó un lavado con 100 µL de PBS 1X, se agregó 50 µL de tripsina y una vez que las células perdieron su adhesión se la inactivó con 50 µL de medio de cultivo completo. Con una alícuota de 10 µL de la suspensión se determinó en cámara de Neubauer el número de células presentes por pocillo. Cada ensayo fue repetido tres veces. Se graficó el número de células contadas

como porcentaje respecto al vehículo (considerado 100 %), en función de la concentración utilizada empleando el software GraphPad Prism 5. Los valores de concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de SG o calcitriol para cada línea celular se obtuvieron utilizando la ecuación de dosis - respuesta sigmoidea del programa estadístico GraphPad Prism 5.00 para Microsoft Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

#### **2.2.4.2- Ensayo de migración celular**

Para evaluar la influencia del análogo sobre la migración celular se realizó el ensayo de “wound healing” [228]. Este método imita la migración celular durante la cicatrización *in vivo*. Los pasos involucran crear una herida en una monocapa celular, capturando las imágenes al comienzo y a intervalos regulares durante la migración celular al cerrar la herida, y comparando las imágenes para cuantificar la tasa migratoria de las células.

Se sembraron las líneas T98G, GL26, U251, HN12, HCT116 y LM3 con una densidad de 300.000 a 2.000.000 células en placas de Petri de 35 mm de diámetro, y se cultivaron por 24 h hasta que formaron una monocapa. La densidad celular varió en función de la línea en estudio. Luego se hizo una herida con un tip de una micropipeta de 10 µl, dejando al descubierto una sección de la monocapa celular. Se retiró el medio de cultivo y se añadió nuevo medio de cultivo conteniendo calcitriol, análogo SG o vehículo (isopropanol) a una concentración de 0,1 nM. La herida fue observada con un microscopio invertido NIKON ECLIPSE TE 2000S y fotografiada con una cámara digital Sony Coolpix acoplada al microscopio (200x). Las fotos se tomaron a las 0, 4, 8 y 16 h de tratamiento, siempre teniendo la precaución que el ensayo no superara el tiempo de duplicación de la línea celular estudiada. El programa ImageJ se empleó para medir el área de la herida fotografiada en cada tiempo. Se realizaron gráficos representando el porcentaje del área de la herida en cada tiempo, tomando el valor a las 0 h como 100%. Por lo tanto, un menor porcentaje del área de la herida está relacionado con una mayor capacidad migratoria de las células. El ensayo se repitió tres veces.

#### **2.3- Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism 5 (San Diego California USA). El ensayo de viabilidad y migración celular, así

como también los efectos sobre los niveles de calcio plasmático, hematocrito y el peso corporal de los animales, se analizaron utilizando el test two way ANOVA seguido del test de Bonferroni. El peso del bazo, riñón e hígado de los animales se analizaron mediante el test one way ANOVA seguido del test de Bonferroni. Un  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

## **2.4- Ensayos computacionales**

Los ensayos computacionales fueron realizados con la colaboración del Dr. Mario Alfredo Quevedo de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA - CONICET) de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Los estudios bioinformáticos se desarrollaron en base a la interacción intermolecular entre el calcitriol, el análogo EM1 o el análogo SG y el VDR. Los mismos se realizaron utilizando docking y dinámica molecular, y análisis de la energía libre de unión. La estructura cristalográfica correspondiente al receptor VDR, tal como se encuentra en la base de datos Protein DataBank (PDB) bajo el código 1DB1, se utilizó como plantilla [48], desde que se ha validado como estructura modelo [49]. Mediante el empleo del software MarvinSketch [229], se construyeron las estructuras químicas iniciales del calcitriol, análogo EM1 y análogo SG. Luego se utilizó el software Gaussian03 [230] para obtener la conformación de mínima energía aplicando métodos semiempíricos (AM1) y ab initio (HF/6-311+G\*). Los estudios de docking se realizaron empleando paquetes de software desarrollados por OpenEye Scientific Software. Los estudios de reconocimiento intermolecular consistieron en tres etapas secuenciales. En la primera etapa, la generación de bibliotecas de conformeros de los ligandos estudiados, para lo cual se utilizó un umbral de energía de 10 kcal/mol. Estos estudios conformacionales se realizaron empleando el software OMEGA [231]. En la segunda etapa, se realizó la ejecución de los estudios de docking propiamente dicho, empleando una exploración rígida exhaustiva, tal como se encuentra implementado en el software FRED3 [232-234], aplicando la función de puntuación ChemGauss3 para evaluar y clasificar los distintos modos de unión generados. Se consideró la conformación de unión de mínima energía para los análisis posteriores. Finalmente, la última etapa implicó la visualización tridimensional y análisis de las interacciones intermoleculares involucradas en el

reconocimiento ligando – receptor, las cuales se realizaron utilizando los paquetes de *software* VIDA [235]) y LIGPLOT + [236], respectivamente.

Para la ejecución de los estudios de dinámica molecular (DM), se empleó el paquete de *software* AMBER16 [237,238]. Las cargas atómicas y los parámetros moleculares para el ligando se asignaron a partir del potencial electrostático restringido (RESP) y el campo de fuerza GAFF2 [239]. Las cargas y los parámetros moleculares correspondientes a VDR se asignaron desde el campo de unión ff14SB [240]. Las simulaciones se realizaron en condiciones explícitas de solventes, utilizando moléculas de agua explícitas preequilibradas TIP3P incluidas en una caja cúbica. Para iniciar la simulación, se sometieron los sistemas al siguiente protocolo de simulación: a) Dos etapas iniciales de minimización de energía, la primera de ellas efectuada sobre el solvente, y la segunda sobre el sistema completo; b) Los sistemas minimizados se calentaron de 0 a 298 K durante 100 ps, empleando de un paso de tiempo de 2 fs bajo condiciones constantes de presión y temperatura; c) Luego de la fase de calentamiento, se llevó a cabo una etapa de equilibración (1 ns) y posteriormente las etapas de producción (80 ns). El algoritmo SHAKE se utilizó para restringir los enlaces, incluidos los átomos de hidrógeno. Los análisis estructurales sobre las trayectorias de DM se llevaron a cabo utilizando el módulo de Cpptraj de AMBER16, realizando cálculos y análisis de componentes de interacción energética ligandos – macromolecular por empleo del método de MMPBSA, tal como se encuentra implementado en el módulo MMPBSA.py. [241,242]. Las trayectorias de DM resultantes se complementaron usando el *software* VMD V.1.9 [243]. En todos los casos, las simulaciones de DM se obtuvieron empleando código de simulación basado en arquitectura CUDA (pmemd.cuda) empleando infraestructura de cómputo proporcionada por el grupo de computación GPGPU de la Facultad de Matemática, Astronomía y Física (FAMAF) de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Whistler D. (1645). Disputo medica inauguralis de Morbo puerili Anglorum, quem patrio idiomate indigenae vocant The rickets Lugduni Batavorum. Tesis para optar al título de Ph. D. de la Universidad de Leyden.
- [2] Mozolowski W. (1939). Jędrzej Sniadecki (1768-1838) On the cure of rickets. *Nature*. 143:121-124.
- [3] Holick M.F. (1990). Vitamin D and the skin: Photobiology, physiology and therapeutic efficacy for psoriasis. *J. Bone Miner. Res.* 7:313-366.
- [4] McCollum E.F., Simmonds N., Becker J.E., Shipley P.G. (1922). Studies on experimental rickets and experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J. Biol. Chem.* 53:293-312.
- [5] Huldschinsky K. (1919). Heilung von Rachitis durch künstlich Hohen-sonne. (The healing of rickets with artificial high altitude sun.) *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 45:712–713 (in German).
- [6] Steenbock H., Black A. (1924). The reduction of growth-promoting and calcifying properties in a ration by exposure to ultraviolet light. *J. Biol. Chem.* 61:408–422.
- [7] Windaus A., Bock F. (1937). Über das provitamin aus dem sterin der schweineschwarte. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*. 245:168-170.
- [8] Morris J.G. (1999). Ineffective Vitamin D Synthesis in Cats Is Reversed by an Inhibitor of 7-Dehydrocholesterol- $\Delta^7$ -Reductase<sup>1,2</sup>. *J. Nutr.* 129:903–908.
- [9] Rauschkolb E.W., Winston D., Fenimore D.C., Black H.S., Fabre L.F. (1969). Identification of vitamin D<sub>3</sub> in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 53:289-293.
- [10] DeLuca H.F. (2014). History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *BoneKEy Rep.* 3.
- [11] Holick M.F., Frommer J.E., McNeill S.C., Richtand N.M., Henley J.W., Potts J.T. (1977). Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D<sub>3</sub> in skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76(1):107-114.
- [12] Esvelt R.P., Schnoes H.K., DeLuca H.F. (1978). Vitamin D<sub>3</sub> from rat skins irradiated in vitro with ultraviolet light. *Arch. Biochem. Biophys.* 188(2):282-286.
- [13] Brockmann H. (1936). Die Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Thunfischleberöl. *Hoppe-Seylers Ztschr. Physiol. Chem.* 241:104–115.
- [14] Windaus A., Linsert O., Luttringhaus A., Weidlinch G. (1932). Über das kristallisierte Vitamin D<sub>2</sub>. *Justis. Liebigs. Ann. Chem.* 492:226-231.
- [15] Okamura W., Do S., Kim H., Jeganathan S., Vu T., Zhu G., Norman A.W. (2001). Conformationally restricted mimics of vitamin D rotamers. *Steroids*. 66:239-247.

- [16] Okamura W., Midland M.M., Hammond M.W., Abd.Rahman N., Dormanen M.C., Nemere I., Norman A.W. (1995). Chemistry and conformation of vitamin D molecules. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53:603-613.
- [17] IUPAC-IUB (JCBN). (1989). *Pure Appl. Chem.* 61:1783-1822. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/steroid>
- [18] IUPAC-IUB (JCBN). (1982). *Pure Appl. Chem.* 54:1511. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/D.html>
- [19] Holick M.F. (2011). Vitamin D deficiency in 2010: health benefits of vitamin D and sunlight: a D-bate. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2:73-75.
- [20] Holick M.F. (2011). Vitamin D: evolutionary, physiological and health perspectives. *Curr. Drug Targets.* 1:4-18.
- [21] DeLuca H.F. (2004). Overview of general physiologic features and functions of Vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:1689S-1696S.
- [22] Holick M.F. (1994). Vitamin D-new horizons for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* 60:619-630.
- [23] Adams J.S., Hewison M. (2010). Update in vitamin D. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95(2):471-478.
- [24] Dusso A.S., Brown A.J., Slatopolsky E. (2005) Vitamin D. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289:F8-28.
- [25] Webb A.R., DeCosta B.R., Holick M.F. (1989). Sunlight Regulates the Cutaneous Production of Vitamin D<sub>3</sub> by Causing Its Photodegradation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68(5):882-887.
- [26] Zhu J., DeLuca, H.F. (2012). Vitamin D 25-hydroxylase—Four decades of searching, are we there yet?. *Arch. Biochem. Biophys.* 523(1):30-36.
- [27] DeLuca H.F., Schnoes H.K. (1983). Vitamin D: Recent advances. *Annu. Rev. Biochem.* 52:411-439.
- [28] Cheng J.B., Levine M.A., Bell N.H., Mangelsdorf D.J., Russell D.W. (2004). Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101(20):7711-7715.
- [29] Giammanco M., Di Majo D., La Guardia M., Aiello S., Crescimannno M., Flandina C., Leto G. (2015). Vitamin D in cancer chemoprevention. *Pharm. Bio.* 53(10): 1399-1434.
- [30] Kochupillai N. (2008). The physiology of vitamin D: current concepts. *Indian J. Med. Res.* 127(3):256-262.

- [31] Yoon P.S., DeLuca H.F. (1980). Purification and properties of chick renal mitochondrial ferredoxin. *Biochemistry*. 19(10):2165-2171.
- [32] Christakos S., Dhawan P., Verstuyf A., Verlinden L., Carmeliet G. (2015). Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol. Rev.* 96(1):365-408.
- [33] Morris H.A., Anderson P.H. (2010). *Autocrine and paracrine actions of vitamin D* (Doctoral dissertation, Australasian Association of Clinical Biochemists).
- [34] Feldman D., KrisNah A.V., Swami S., Giovannucci E., Feldman B.J. (2014). The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat. Rev.Cancer*. 14(5):342-357.
- [35] Jones G. (2007). Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 $\alpha$ -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D (3). In *Seminars in dialysis*. 20(4):316-324.
- [36] Bikle D.D., Gee E., Halloran B., Kowalski M.A., Ryzan E., Haddad J.G. (1986). Assessment of free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63(4): 954-959.
- [37] Jones G., Prosser D.E., Kaufmann M. (2012). 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch. Biochem. Biophys.* 523(1):9-18.
- [38] Beckman M.J., Tadikonda P., Werner E., Pahl J., Yamada S., DeLuca H.F. (1996). Human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-24-hydroxylase, a multicatalytic enzyme. *Biochemistry*. 35(25):8465-8472.
- [39] Chen K.S., Pahl J.M., DeLuca H.F. (1993). Isolation and expression of human 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> 24-hydroxylase cDNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90(10):4543-4547.
- [40] Kumar R. (1984). Metabolism of 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Physiol. Rev.* 64(2):478-504.
- [41] Plum L.A., DeLuca, H.F. (2009). The functional metabolism and molecular biology of vitamin D action. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* 7(1):20-41.
- [42] Norman A.W. (2008). From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am. J. Clin. Nutr.* 88(2):491S-499S.
- [43] St-Arnaud R. (2008). The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* 473(2):225-230.
- [44] Chun R.F., Adams J.S., Hewison M. (2008). Back to the future: a new look at 'old' vitamin D. *J. Endocrinol.* 198(2): 261-269.

- [45] Verboven C., Rabijns A., De Maeyer M., Van Baelen H., Bouillon R., De Ranter C. (2002). A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. *Nature Struct. Biol.* 9:131-136.
- [46] Chun R.F. (2012). New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochem. Funct.* 30(6):445-456.
- [47] Díaz L., Díaz-Muñoz M., García-Gaytán A.C., Méndez I. (2015). Mechanistic effects of calcitriol in cancer biology. *Nutrients.* 7(6):5020-5050
- [48] Rochel N., Wurtz J.M., Mitschler A., Klaholz B., Moras D. (2000). The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol. Cell.* 5(1):173-179.
- [49] Malinska M., Kutner A., Woźniak K. (2015). Predicted structures of new vitamin D receptor agonists based on available x-ray structures. *Steroids.* 104:220-229.
- [50] Orlov I., Rochel N., Moras D., Klaholz B.P. (2012). Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. *The EMBO journal.* 31(2):291-300.
- [51] Yamagishi K., Yamamoto K., Yamada S., Tokiwa H. (2006). Functions of key residues in the ligand-binding pocket of vitamin D receptor: Fragment molecular orbital-interfragment interaction energy analysis. *Chem. Phys. Lett.* 420:465-468.
- [52] Verhave G., Siegert C.E. (2010). Role of vitamin D in cardiovascular disease. *Neth J Med.* 68(3):113-8.
- [53] Brown A.J., Dusso A., Slatopolsky E. (1999). Vitamin D. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 277:157-175.
- [54] Segaert S., Bouillon R. (1998). Vitamin D and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Clin. Nut. Metab. Care.* 1:347-354.
- [55] Teske K.A., Yu O., Arnold L.A. (2016). Chapter Three-Inhibitors for the Vitamin D Receptor-Coregulator Interaction. *Vitamins & Hormones.* 100:45-82.
- [56] Pike, J. W., & Meyer, M. B. (2012). The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 38(1):13-27.
- [57] Norman A.W., Nemere I. and Zhou L.K. (1992). 1,25-dihydroxy Vitamin D3, steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41:231-240.
- [58] Trump D.L., Deeb K.K., Johnson C.S. (2010). Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *J. Cancer.* 16:1-9.

- [59] Nemere I., Safford S.E., Rohe B., DeSouza M.M., Farach-Carson M.C. (2004). Identification and characterization of 1,25D<sub>3</sub>-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D<sub>3</sub>-MARRS) binding protein. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89-90(1-5):281-285.
- [60] Rohe B., Safford S.E., Nemere I., Farach-Carson M.C. (2005). Identification and characterization of 1, 25D<sub>3</sub>-membrane-associated rapid response, steroid (1, 25D<sub>3</sub>-MARRS)-binding protein in rat IEC-6 cells. *Steroids.* 70(5):458-463.
- [61] Chiang K.C., Chen T. (2013). The anti-cancer actions of vitamin D. *Anti-Cancer Agents Me.* 13(1):126-139.
- [62] Haussler M.R., Jurutka P.W., Mizwicki M., Norman A.W. (2011). Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2 vitamin D<sub>3</sub>: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25(4):543-559.
- [63] Irazoqui A.P., Boland R.L., Buitrago C.G. (2014). Actions of 1, 25 (OH) 2-vitamin D<sub>3</sub> on the cellular cycle depend on VDR and p38 MAPK in skeletal muscle cells. *J. Mol. Endocrinol.* 53(3):331-343.
- [64] Buitrago C., Pardo V.G., Boland R. (2013). Role of VDR in 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-dependent non-genomic activation of MAPKs, Src and Akt in skeletal muscle cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 136:125-130.
- [65] Karlsson S., Olausson J., Lundh D., Sögård P., Mandal A., Holmström K.O., Stahel A., Bengtsson J., Larsson D. (2010). Vitamin D and prostate cancer: the role of membrane initiated signaling pathways in prostate cancer progression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121(1):413-416.
- [66] Mizwicki M.T., Norman A.W. (2009). The vitamin D sterol–vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci. Signal.* 2(75):re4-re4.
- [67] Norman A.W. (2005). 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> mediated rapid and genomic responses are dependent upon critical structure-function relationships for both the ligand and receptor(s). In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FH, eds. *Vitamin D*. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press. 381-407.
- [68] DeLuca H.F., Plum L.A. (2016). Analogs of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in Clinical Use. *Vitam. Horm.* Elsevier Inc. Volume 100, p. 151-164.
- [69] Plum L.A., DeLuca H.F. (2010). Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 9:941-955.
- [70] Hanahan D., Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70.
- [71] Hanahan D., Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5):646-674.

- [72] IARC: International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2020 (on line). Disponible en <https://gco.iarc.fr>. Fecha de última consulta: 03-02-21.
- [73] Colston K., Colston M.J., Feldman D. (1981).  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinol.* 108(3):1083-1086.
- [74] Krishnan A.V., Feldman D. (2011). Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51:311-336.
- [75] Artaza J. N., Sirad F., Ferrini M.G., Norris K.C. (2010).  $1, 25$  (OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 119(1):73-83.
- [76] Deeb K.K., Trump D.L., Johnson C.S. (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer.* 7(9):684-700.
- [77] Welsh J. (2007). Targets of vitamin D receptor signaling in the mammary gland. *J. Bone Miner. Res.* 22(Suppl. 2):V86-90.
- [78] Picotto G., Liaudat A.C., Bohl L., Talamoni N.T.D. (2012). Molecular aspects of vitamin D anticancer activity. *Cancer Invest.* 30(8):604-614.
- [79] Pereira F., Larriba M.J., Muñoz A. (2012). Vitamin D and colon cancer. *Endocr.-Relat. Cancer.* 19(3):R51-R71.
- [80] Davis C.D., Milner J.A. (2011). Nutrigenomics, vitamin D and cancer prevention. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics.* 4(1):1-11.
- [81] Larriba M.J., González-Sancho J.M., Barbáchano A., Niell N., Ferrer-Mayorga G., Muñoz A. (2013). Vitamin D is a multilevel repressor of Wnt/b-catenin signaling in cancer cells. *Cancers.* 5(4):1242-1260.
- [82] García-Becerra R., Díaz L., Camacho J., Barrera D., Ordaz-Rosado D., Morales A, Larrea F. (2010). Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 316(3):433-442.
- [83] García-Quiroz J., García-Becerra R., Santos-Martínez N., Barrera D., Ordaz-Rosado D., Avila E., Díaz, L. (2014). In vivo dual targeting of the oncogenic Ether-à-go-go-1 potassium channel by calcitriol and astemizole results in enhanced antineoplastic effects in breast tumors. *BMC Cancer.* 14(1):1.
- [84] Cázares-Ordoñez V., Gonzalez-Duarte R.J., Diaz L., Ishizawa M., Uno S., Ortiz V., Ordonez-Sanchez M.L., Makishima M., Larrea F., Avila, E. (2014). A cis-acting element in the promoter of human ether a go-go 1 potassium channel gene mediates repression by calcitriol in human cervical cancer cells. *Biochem.Cell Biol.* 93(1):94-101.

- [85] Abe E., Miyaura C., Sakagami H., Takeda M., Konno K., Yamazaki T., Yoshiki S., Suda T. (1981). Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1  $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *P. N. A. S.* 78(8):4990-4994.
- [86] Pálmer H.G., González-Sancho J.M., Espada J., Berciano M.T., Puig I., Baulida J., Quintanilla M., Cano A., de Herreros A.G., Lafarga M., Muñoz A. (2001). Vitamin D<sub>3</sub> promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of  $\beta$ -catenin signaling. *J. Cell Biol.* 154(2):369-388.
- [87] Santos-Martínez N., Díaz L., Ordaz-Rosado D., García-Quiroz J., Barrera D., Avila E., Camacho J. (2014). Calcitriol restores antiestrogen responsiveness in estrogen receptor negative breast cancer cells: A potential new therapeutic approach. *BMC Cancer.* 14(1): 230.
- [88] Pepper C., Thomas A., Hoy T., Milligan D., Bentley P., Fegan C. (2003). The vitamin D<sub>3</sub> analog EB1089 induces apoptosis via a p53-independent mechanism involving p38 MAP kinase activation and suppression of ERK. Molecular activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells *in vitro*. *Blood.* 101:2454–2460.
- [89] Wagner N., Wagner K.D., Schley G., Badiali L., Theres H., Scholz H. (2003). 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced apoptosis of retinoblastoma cells is associated with reciprocal changes of Bcl-2 and bax. *Exp. Eye Res.* 77:1–9.
- [90] Guzey M., Kitada S., Reed J.C. (2002). Apoptosis induction by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.* 1:667-677.
- [91] Kizildag S., Ates H., Kizildag S. (2010). Treatment of K562 cells with 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCLXL, and p21. *Ann. Hematol.* 89(1):1-7.
- [92] Chen T.C., Holick M.F. (2003). Vitamin D and prostate cancer prevention and treatment. *Trends Endocrinol. Metab.* 14(9):423-430.
- [93] James S.Y., Mackay A.G., Colston K.W. (1996). Effects of 1, 25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58:395–401.
- [94] Flanagan L., Packman K., Juba B., O'Neill S., Tenniswood M., Welsh J. (2003). Efficacy of Vitamin D compounds to modulate estrogen receptor negative breast cancer growth and invasion. induction of apoptosis in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84:181–192.
- [95] Yu W.D., Ma Y., Flynn G., Muindi J.R., Kong R.X., Trump D.L., Johnson C.S. (2010). Calcitriol enhances gemcitabine antitumor activity *in vitro* and *in vivo* by promoting apoptosis in a human pancreatic carcinoma model system. *Cell Cycle.* 9(15):3022-3029.

- [96] Segovia-Mendoza M., Díaz L., González-González M.E., Martínez-Reza I., García-Quiroz J., Prado-Garcia H., Ibarra-Sanchez M.J., Esparza-Lopez J., Larrea F., García-Becerra R. (2015). Calcitriol and its analogues enhance the antiproliferative activity of gefitinib in breast cancer cells. induction of apoptosis in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 148:122-131.
- [97] Sergeev I.N. (2005). Calcium signaling in cancer and vitamin D. induction of apoptosis in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97(1):145-151.
- [98] Weitsman G.E., Koren R., Zuck E., Rotem C., Liberman U.A., Ravid, A. (2005). Vitamin D sensitizes breast cancer cells to the action of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: mitochondria as a convergence point in the death pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 39(2):266-278.
- [99] Ravid A., Koren R. (2003). The role of reactive oxygen species in the anticancer activity of vitamin D. *Recent Results Cancer Res.* 164:357–367.
- [100] Lee L.R., Teng P.N., Nguyen H., Hood B.L., Kavandi L., Wang G., Syed V. (2013). Progesterone enhances calcitriol antitumor activity by upregulating vitamin D receptor expression and promoting apoptosis in endometrial cancer cells. *Cancer Prev. Res.* 6(7):731-743.
- [101] Sousa Moreira I., Alexandrino Fernandes P., Joao Ramos M. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition-a critical review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 7(2):223-245.
- [102] Bocci G., Francia G., Man S., Lawler J., Kerbel R.S. (2003). Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy. *P. N. A. S.* 100(22):12917-12922.
- [103] Chung I., Han G., Seshadri M., Gillard B.M., Yu W.D., Foster B.A., Trump D.L., Johnson C.S. (2009). Role of vitamin D receptor in the antiproliferative effects of calcitriol in tumor-derived endothelial cells and tumor angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 69(3):967-975.
- [104] Bernardi R.J., Johnson C.S., Modzelewski R.A., Trump D.L. (2002). Antiproliferative effects of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. *Endocrinol.* 143(7):2508-2514.
- [105] Mantell D.J., Owens P.E., Bundred N.J., Mawer E.B., Canfield A.E. (2000). 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Inhibits Angiogenesis *In Vitro* and *In Vivo*. *Circ. Res.* 87:214-220.
- [106] Iseki K., Tatsuta M., Uehara H., Iishi H., Yano H., Sakai N., Ishiguro S. (1999). Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in Wistar rats. *Int. J. Cancer.* 81(5):730-733.

- [107] Allavena P., Garlanda C., Borrello M.G., Sica A., Mantovani A. (2008). Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18:3–10.
- [108] Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature.* 454(7203):436-444.
- [109] Lucia M.S., Torkko K.C. (2004). Inflammation as a target for prostate cancer chemoprevention: pathological and laboratory rationale. *J. Urol.* 171(2 Pt 2):S30-4; discussion S35.
- [110] Adams J.S., Hewison M. (2008). Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Clin. Pract. Endoc. Metabol.* 4(2):80-90.
- [111] Paucarmayta A., Taitz H., McGlorthan L., Casablanca Y., Maxwell G.L., Darcy K.M., Syed V. (2020). Progesterone-Calcitriol Combination Enhanced Cytotoxicity of Cisplatin in Ovarian and Endometrial Cancer Cells In Vitro. *Biomedicines.* 8(4):73.
- [112] Woloszynska-Read A., Johnson C.S., Trump D.L. (2011). Vitamin D and cancer: clinical aspects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25(4):605-615.
- [113] Ferrero D., Bruno B., Pregno P., Stefani S., Larizza E., Ciravegna G., Pileri A. (1996). Combined differentiating therapy for myelodysplastic syndromes: a phase II study. *Leukemia Res.* 20(10):867-876.
- [114] Slapak C.A., Desforges J.F., Fogaren T., Miller K.B. (1992). Treatment of acute myeloid leukemia in the elderly with low-dose cytarabine, hydroxyurea, and calcitriol. *Am. J. Hematol.* 41(3):178-183.
- [115] Dalhoff K., Dancey J., Astrup L., Skovsgaard T., Hamberg K. J., Lofts F. J., Rosmorduc O., Erlinger S., Bach Hansen J., Steward W. P., Skov T., Burcharth F., Evans T. R. (2003). A phase II study of the vitamin D analogue Seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *British J. Cancer.* 89:252-257.
- [116] Woo T.C., Choo R., Jamieson M., Chander S., Vieth R. (2005). Pilot study: potential role of vitamin D (Cholecalciferol) in patients with PSA relapse after definitive therapy. *Nut. Cancer.* 51(1):32-36.
- [117] Amir E., Simmons C.E., Freedman O.C., Dranitsaris G., Cole D.E., Vieth R., Ooi W.S., Clemons M. (2010). A phase 2 trial exploring the effects of high-dose (10,000 IU/day) vitamin D(3) in breast cancer patients with bone metastases. *Cancer.* 116(2):284-291.
- [118] Gross C., Stamey T., Hancock S., Feldman D. (1998). Treatment of early recurrent prostate cancer with 1, 25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J. Urol.* 159(6):2035-2040.

- [119] Scher H.I., Jia X., Chi K., de Wit R., Berry W.R., Albers P., Meluch A.A. (2011). Randomized, open-label phase III trial of docetaxel plus high-dose calcitriol versus docetaxel plus prednisone for patients with castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 29(16):2191-2198.
- [120] Fatemeh H., Behnaz A., Masood I., Kambiz A-A, Mohammadreza V. (2020). Randomized Study of the Effect of Vitamin D and Omega-3 Fatty Acids Cosupplementation as Adjuvant Chemotherapy on Inflammation and Nutritional Status in Colorectal Cancer Patients. *J. Diet Suppl.* 17(4):384-400.
- [121] Muindi J.R., Peng Y., Potter D.M., Hershberger P.A., Tauch J.S., Capozzoli M.J., Egorin M.J., Johnson C.S., Trump D.L. (2002). Pharmacokinetics of high-dose oral calcitriol: Results from a phase 1 trial of calcitriol and paclitaxel. *Clin. Pharm. Ther.* 72(6):648-659.
- [122] Muindi J.R., Potter D.M., Peng Y., Johnson C.S., Trump D.L. (2005). Pharmacokinetics of liquid calcitriol formulation in advanced solid tumor patients: comparison with caplet formulation. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56(5):492-496.
- [123] Beer T.M., Munar M., Henner W.D. (2001). A phase I trial of pulse calcitriol in patients with refractory malignancies. *Cancer.* 91(12):2431-2439.
- [124] Beer T.M., Myrthue A. (2004). Calcitriol in cancer treatment: From the lab to the clinic. *Mol. Cancer Ther.* 3:373-381.
- [125] Trump D.L. (2018). Calcitriol and cancer therapy: A missed opportunity. *Bone Rep.* 9:110–119.
- [126] Ramnath N., Daignault-Newton S., Dy G.K., Muindi J.R., Adjei A., Elingrod V.L., Troeschel S. (2013). A phase I/II pharmacokinetic and pharmacogenomic study of calcitriol in combination with cisplatin and docetaxel in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71(5):1173-1182.
- [127] Leyssens C., Verlinden L., Verstuyf A. (2013). Antineoplastic effects of 1, 25 (OH) 2D3 and its analogs in breast, prostate and colorectal cancer. *Endocr.-Relat. Cancer.* 20(2):R31-R47.
- [128] Mehta R.G., Peng X., Alimirah F., Murillo G., Mehta R. (2013). Vitamin D and breast cancer: Emerging concepts. *Cancer Lett.* 334(1):95-100.
- [129] Bouillon R., Eelen G., Verlinden L., Mathieu C., Carmeliet G., Verstuyf A. (2006). Vitamin D and Cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102:156-162.
- [130] Brown A.J., Slatopolsky E.. (2008). Vitamin D analogs: therapeutic applications and mechanisms for selectivity. *Mol. Aspects Med.* 29(6):433–452.

- [131] Bouillon R., Allewaert K., Xiang D.Z., Tan B.K., Van Baelen H. (1991). Vitamin D analogs with low affinity for the vitamin D binding protein: enhanced in vitro and decreased in vivo activity. *J. Bone Min. Res.* 6(10):1051-1057.
- [132] Bouillon R., Verstuyf A., Zhao J., Tan B.K., Van Baelen H. (1996). Nonhypercalcemic vitamin D analogs: interactions with the vitamin D-binding protein. *Hormones.* 45(3-5):117-121.
- [133] Carlberg C., Molnár, F. (2006). Detailed molecular understanding of agonistic and antagonistic vitamin D receptor ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* 6(12):1243-1253.
- [134] Rochel N., Moras D. (2006). Ligand binding domain of vitamin D receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 6(12):1229-1241.
- [135] Masuda S., Jones G. (2006). Promise of vitamin D analogues in the treatment of hyperproliferative conditions. *Mol. Cancer Ther.* 5:797-808.
- [136] Nagpal S., Na S., Rathnachalam R. (2005). Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr. Rev.* 26:662-687.
- [137] Salomón D.G., Grioli S.M., Buschiazzo M., Mascaró E., Vitale C., Radivoy G., Perez M., Fall Y., Mesri E.A., Curino A.C., Facchinetti M.M. (2011). Novel Alkynylphosphonate Analogue of Calcitriol with Potent Antiproliferative Effects in Cancer Cells and Lack of Calcemic Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* 2:503-508.
- [138] Salomón D.G., Fermento M.E., Gandini N.A., Ferronato M.J., Arévalo J., Blasco J., Andrés N.C., Zenklusen J.C., Curino A.C., Facchinetti M.M. (2014). Vitamin D receptor expression is associated with improved overall survival in human glioblastoma multiforme. *J. Neuro-oncol.* 118(1):49-60.
- [139] Carlberg C., Mourino A. (2003). New vitamin D receptor ligands. *Expert Opin. Ther. Pat.* 13:761-772.
- [140] Bouillon R., Okamura W.H., Norman A.W. (1995). Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev.* 16:200-256.
- [141] Posner G.H., Kahraman M. (2003). Organic Chemistry of Vitamin D Analogues (Deltanoids). *Eur. J. Org. Chem.* 3889-3895.
- [142] Zhu G.D., Okamura W.H. (1995). Synthesis of Vitamin D (Calciferol). *Chem. Rev.* 95:1877-1952.
- [143] Dai H., Posner G.H. (1994). Synthetic Approaches to Vitamin D. *Synthesis.* 12:1383-1398.
- [144] Duffy M.J., Murray A., Synnott N.C., O'Donovan N., Crown J. (2017). Vitamin D analogues: Potential use in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 112:190-197.

- [145] Evans T.R.J., Colston K.W., Lofts F.J., Cunningham D., Anthony D.A., Gogas H., de Bono J.S., Hamberg K.J., Skov T., Mansi J.L. (2002). A phase II trial of the vitamin D analogue Seocalcitol (EB1089) in patients with inoperable pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*. 86(5):680-685.
- [146] Gulliford T., English J., Colston K.W., Munday P., Moller S., Coombes R.C. (1998). A phase I study of the vitamin D analogue EB 1089 in patients with advanced breast and colorectal cancer. *Br. J. Cancer*. 78(1):6-13.
- [147] Schwartz G.G., Hall M.C., Stindt D., Patton S., Lovato J., Torti F.M. (2005). Phase I/II study of 19-nor-1alpha-25-dihydroxyvitamin D2 (paricalcitol) in advanced, androgen-insensitive prostate cancer. *Clin. Cancer Res*. 11(24 Pt 1):8680-8685.
- [148] Lawrence J.A., Akman S.A., Melin S.A., Case L.D., Schwartz G.G. (2013). Oral paricalcitol (19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2) in women receiving chemotherapy for metastatic breast cancer: a feasibility trial. *Cancer Biol. Ther*. 14(6):476-480.
- [149] Medioni J., Deplanque G., Ferrero J.M., Maurina T., Rodier J.M.P., Raymond E., Renaux S. (2014). Phase I safety and pharmacodynamic of inecalcitol, a novel VDR agonist with docetaxel in metastatic castration-resistant prostate cancer patients. *Clin. Cancer Res*. 20(17):4471-4477.
- [150] Bower M., Stein R.C., Hedley A., Coombes R.C., Colston K.W., Gazet J.C., Ford H.T. (1991). Topical calcipotriol treatment in advanced breast cancer. *The Lancet*. 337(8743):701-702.
- [151] Cunningham T.J., Tabacchi M., Eliane J.P., Tuchayi S.M., Manivasagam S., Mirzaalian H., Turkoz A., Kopan R., Schaffer A., Saavedra A.P., Wallendorf M., Cornelius L.A., Demehri S. (2017). Randomized trial of calcipotriol combined with 5-fluorouracil for skin cancer precursor immunotherapy. *J. Clin. Invest*. 127(1):106-116.
- [152] Rosenberg A.R., Cornelius L.A., Demehri S. (2019). Skin cancer precursor immunotherapy for squamous cell carcinoma prevention. *JCI Insight*. 4(6):e125476.
- [153] Attia S., Eickhoff J., Wilding G., McNeel D., Blank J., Ahuja H., Jumonville A., Eastman M., Shevrin D., Glode M., Alberti D., Staab M.J., Horvath D., Straus J., Marnocha R., Liu G. (2008). Randomized, double-blinded phase II evaluation of docetaxel with or without doxercalciferol in patients with metastatic, androgen-independent prostate cancer. *Clin. Cancer Res*. 14(8):2437-2443.
- [154] Liu G., Oettel K., Ripple G., Staab M.J., Horvath D., Alberti D., Arzoomanian R., Marnocha R., Bruskewitz R., Mazess R., Bishop C., Bhattacharya A., Bailey H., Wilding G. (2002). Phase I trial of 1alpha-hydroxyvitamin d(2) in patients with hormone refractory prostate cancer. *Clin. Cancer Res*. 8(9):2820-2827.
- [155] Liu G., Wilding G., Staab M.J., Horvath D., Miller K., Dresen A., Alberti D., Arzoomanian R., Chappell R., Bailey H.H. (2003). Phase II study of 1alpha-

hydroxyvitamin D<sub>2</sub> in the treatment of advanced androgen-independent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 9(11):4077-4083.

[156] Trouillas P., Honnorat J., Bret P., Jouvet A., Gerard J.P. (2001). Redifferentiation therapy in brain tumors: lost-lasting complete regression of glioblastomas and an anaplastic astrocytoma under long term 1- $\alpha$ -hydroxycholecalciferol. *J. Neurooncol.* 51(1):57-66.

[157] Abed A., Morris S. (2005). Reactions of 1-alkynylphosphonates with group (IV) complexes. *J. Organomet. Chem.* 690:2504-2514.

[158] Metcalf W.W., Van der Donk W. (2009). Biosynthesis of Phosphonic and Phosphinic Acid Natural Products. *Annu. Rev. Biochem.* 78:65-94.

[159] Maffei M. (2004). Transition Metal-Promoted Syntheses of Vinylphosphonates. *Curr. Org. Synth.* 1:355-375.

[160] Cristau H.J., Mbianda X.Y., Beziat Y., M.B. Gasc. (1997). Facile and stereoselective synthesis of vinylphosphonates. *J. Organomet. Chem.* 529:301-311.

[161] Lu X. Sun C., Valentine W.J., Shuyu E., Liu J., Tigyi G., Bittman R. (2009). Chiral Vinylphosphonate and Phosphonate Analogues of the Immunosuppressive Agent FTY720. *J. Org. Chem.* 74:3192-3195.

[162] Shie J.J., Fang J.M., Wang S.Y., Tsai K.C., Cheng Y.S.E., Yang A.S., Hsiao S.C., Su C.Y., Wong C.Y. (2007). Synthesis of Tamiflu and its Phosphonate Congeners Possessing Potent Anti-Influenza Activity. *J. Am. Chem. Soc.* 129:11892-11893.

[163] Holstein S.A., Cermak D.M., Wiemer D.F., Lewis K., Hohl R.J. (1998). Phosphonate and bisphosphonate analogues of farnesyl pyrophosphate as potential inhibitors of farnesyl protein transferase. *Bioorg. Med. Chem.* 6:687.

[164] Dauben W.G., Ollman R.R., Funhoff A.S., Leung S.S., Norman A.W., Bishop J.E. (1991). 25-phosphorus analogs of vitamin D<sub>3</sub>. *Tetrahedron Lett.* 32:4643-4646.

[165] Steinmeyer A., Schwarz K., Haberey M., Langer G., Wiesinger G. (2001). Synthesis and biological activities of a new series of secosteroids: vitamin D phosphonate hybrids. *Steroids.* 66:257-266.

[166] Steinmeyer A., Neef G., Kirsch G., Schwarz K., Wiesinger H., Haberey M., Fähnrich M., Langer G. (2003). Vitamin D derivatives with phosphorus atoms in the side chains. US Patent 6531459.

[167] Mascaró E. (2011). Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, 143-154.

[168] Ferronato M.J., Obiol D.J., Fermento M.E., Gandini N.A., Alonso E.N., Salomón D.G., Vitale C., Mascaró E., Fall Y., Raimondi A.R., Curino A.C., Facchinetti M.M. (2015). The alkynylphosphonate analogue of calcitriol EM1 has potent anti-metastatic effects in breast cancer *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 154:285–293.

- [169] Ferronato M.J., Alonso E.N., Salomón D.G., Fermento M.E., Gandini N.A., Quevedo M.A., Mascaró E., Vitale C., Fall Y., Facchinetti M.M., Curino A.C. (2018). Antitumoral effects of the alkynylphosphonate analogue of calcitriol EM1 on glioblastoma multiforme cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 178:22-35.
- [170] Baggiolini E.G., Iacobelli J.A., Hennessy B.M., Batcho A.D., Sereno J.F., Uskokovic M.R. (1986). Stereocontrolled total synthesis of 1.alpha.,25-dihydroxycholecalciferol and 1.alpha.,25-dihydroxyergocalciferol. *J. Org. Chem.* 51:3098-3108.
- [171] Daniewski A.R., Garofalo L.M., Hutchings S.D., Kabat M.M., Liu W., Okabe M., Radinov R., Yiannikouros G.P. (2002). Efficient synthesis of the A-ring phosphine oxide building block useful for 1 alpha,25-dihydroxy vitamin D(3) and analogues. *J. Org. Chem.* 67:1580-1587.
- [172] Mourino A., Torneiro M., Vitale C., Fernandez S., Perez-Sestelo J., Anne S., Gregorio C. (1997). Efficient and versatile synthesis of a-ring precursors of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> and analogues. Application to the synthesis of Lythgoe-Roche phosphine oxide. *Tetrahedron Lett.* 38:4713-4716.
- [173] Zhu G.D., Okamura W.H. (1995). Synthesis of Vitamin D (Calciferol). *Chem. Rev.* 95:1877-1952.
- [174] Lythgoe B., Moran T.A., Nambudiry M.E., Ruston S., Tideswell J., Wright P.W. (1975). Allylic phosphine oxides as precursors of dienes of defined geometry: Synthesis of 3-deoxyvitamin D<sub>2</sub>. *Tetrahedron Lett.* 44:3863-3866.
- [175] Dembitsky V.M., Al-Quntar A.A., Haj-Yehiaa A., Srebnik M. (2005). Recent Synthesis and Transformation of Vinylphosphonates. *Mini-Rev. Org. Chem.* 2:91-109  
91
- [176] Al-Quntar A.A., Srebnik M. (2005). Reactions of 1-alkynylphosphonates with group (IV) complexes. *J. Org. Chem.* 69:2504-2514.
- [177] Baum O., Al-Quntar A.A., Dembitsky V.M., Srebnik M. (2004). A study of the 1,2-addition of group IV metallacycles derived from 1-alkynylphosphonates to conjugated enones. *Tetrahedron.* 60:1359-1364.
- [178] Al-Quntar A.A., Baum O., Shibli A. (2003). Substituted 1,4-Bisallylphosphonates: Preparation from 1-Alkynylphosphonates and Ti(O*i*Pr)<sub>4</sub>/2 *i*PrMgCl. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4777-4779.
- [179] Al-Quntar A.A., Dembitsky V.M., Srebnik M. (2003). Novel One-Pot Synthesis of 3-Amino-1-alkenylphosphonates by Addition of Imines to Alkynylphosphonate Titanium(II) Complexes. *Org. Lett.* 5(3):357-359.
- [180] Al-Quntar A.A., Srebnik M. (2003). Novel addition reactions of titanacycle phosphonates by tuning of Ti(O-*i*-Pr)<sub>4</sub>/2*i*-PrMgCl. *Chem. Commun.* 58-59.

- [181] Ben-Valid S., Al-Quntar a.A., Srebnik M. (2005). Novel Vinyl Phosphonates and Vinyl Boronates by Halogenation, Allylation, and Propargylation of *r*-Boryl- and *r*-Phosphonozirconacyclopentenes. *J. Org. Chem.* 70:3554-3559.
- [182] Al-Quntar A.A., Srebnik M. (2001). Carbon-Carbon Bond Formation of Alkenylphosphonates by Aldehyde Insertion into Zirconacycle Phosphonates. *J. Org. Chem.* 66:6650-6653.
- [183] Gil J.M., Oh D.Y. (1999). Carbocupration of Diethyl 1-Alkynyl Phosphonates: Stereo- and Regioselective Synthesis of 1,2,2-Trisubstituted Vinyl Phosphonates. *J. Org. Chem.* 64:2950-2953.
- [184] Quin L.D. (2000). A Guide to Organophosphorus Chemistry; John Wiley & Sons, Inc: New York, Cap. 7, pág. 207.
- [185] Kulinkovitch O.G., Sviridov S.V., Vasilevskii D.A. (1991). Titanium(IV) Isopropoxide-Catalyzed Formation of 1-Substituted Cyclopropanols in the Reaction of Ethylmagnesium Bromide with Methyl Alkanecarboxylates. *Synthesis.* 234.
- [186] Kulinkovitch O.G., Sviridov S.V., Vasilevskii D.A., Pritytskaya T.S. (1989). Reaction of Ethylmagnesium Bromide with Esters of Carboxylic-Acids in the Presence of Tetraisopropoxytitanium. *Zh. Org. Khim.* 25:2244.
- [187] Sardina F.J. Mourino A., Castedo L. (1986). Studies on the Synthesis of Side-Chain Hydroxylated Metabolites of Vitamin D. Stereocontrolled Synthesis of 25-Hydroxyvitamin D<sub>2</sub>. *J. Org. Chem.* 51:1264-1269.
- [188] Azab A., Moradov D., Al-Quntar .A.A., Srebnik M. (2012). Very Simple One-Step Synthesis of Vinylphosphonates and Enamine Phosphonates by Direct Addition of Organolithium Reagents to 1-Alkynylphosphonates. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, 187:937–943.
- [189] Mei Y.Q., Liu J.T. (2008). Synthesis and selective carbocupration reaction of fluorine-containing enynic esters, enynylphosphine oxides, and enynylphosphates. *Tetrahedron.* 64:8801–8806.
- [190] Sun H., DiMagno S.G. (2005). Anhydrous Tetrabutylammonium Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* 127:2050-2051.
- [191] Cox P.D., Terpinski J., Lawrynowicz W. (1984). "Anhydrous" Tetrabutylammonium Fluoride: A Mild but Highly Efficient Source of Nucleophilic Fluoride Ion. *J. Org. Chem.* 49:3216-3219.
- [192] Rey M.A., Martinez J.A., Fernandez-Gacio A., Halkes K., Fall Y., Granja J., Mouriño A. (1999). New Synthetic Strategies to Vitamin D Analogues Modified at the Side Chain and D Ring. Synthesis of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-16-ene-vitamin D<sub>3</sub> and C-20 Analogues. *J. Org. Chem.* 64:3196-3206.

- [193] Muindi J.R., Modzelewski R.A., Peng Y., Trump D.L., Johnson C.S. (2004). Pharmacokinetics of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in normal mice after systemic exposure to effective and safe antitumor doses. *Oncology*. 66(1):62-66.
- [194] Muindi J.R., Yu W., Ma Y., Engler K.L., Kong R., Trump D.L., Johnson C.S. (2010). CYP24A1 Inhibition Enhances the Antitumor Activity of Calcitriol. *Gen. Endocr.* 151(9):4301-4312.
- [195] Yin Y., Ni J., Chen M., Guo Y., Yeh, S. (2009). RRR- $\alpha$ -vitamin E succinate potentiates the antitumor effect of calcitriol in prostate cancer without overt side effects. *Clin. Cancer Res.* 15(1):190-200.
- [196] Kumagai T., O'Kelly J., Said J.W., Koeffler H.P. (2003). Vitamin D<sub>2</sub> Analog 19-nor-1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>: Antitumor Activity Against Leukemia, Myeloma, and Colon Cancer Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 95:896-905.
- [197] Prudencio J., Akutsu N., Benlimame N., Wang T., Bastien Y., Lin R., Black M.J., Alaoui-Jamali M.A., White J.H. (2001). Action of low calcemic  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analogue EB1089 in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:745-753.
- [198] Light B.W., Yu W.D., Elwain M.C., Russell D.M., Trump D.L., Johnson C.S. (1997). Potentiation of Cisplatin Antitumor Activity Using a Vitamin D Analogue in a Murine Squamous Cell Carcinoma Model System. *Cancer Res.* 57:3759-3764.
- [199] Spina C., Tangpricha V., Yao M., Zhou W., Wolfe M.M., Maehr H., Uskokovic, Adorini L., Holick M.F. (2005). Colon cancer and solar ultraviolet B radiation and prevention and treatment of colon cancer in mice with vitamin D and its Gemini analogs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97(1):111-120.
- [200] González G.H., Álvarez B.L., Hawkins F. (2012). Protocolo terapéutico de la hipercalcemia. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 11(16):976-980.
- [201] Hathcock J.N., Shao A., Vieth R., Heaney R. (2007). Risk assessment for vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(1):6-18.
- [202] OECD. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, guideline 407, the OECD guideline for testing of chemical. 1995.
- [203] Windberger U., Bartholovitsch A., Plasenzotti R., Korak K.J., Heinze G. (2003). Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. *Exp. Physiol.* 88(3):431-440.
- [204] Zittermann A., Schleithoff S.S., Frisch S., Götting C., Kuhn J., Koertke H., Kleesiek K., Tenderich G., Koerfer R. (2009). Circulating calcitriol concentrations and total mortality. *Clin. Chem.* 55(6):1163-1170.

- [205] Wierzbicka J. M., Binek A., Ahrends T., Nowacka J.D., Szydłowska A., Turczyk Ł., Żmijewski M.A. (2015). Differential antitumor effects of vitamin D analogues on colorectal carcinoma in culture. *Int. J. Oncol.* 47(3):1084-1096.
- [206] Liu C., Zhao G.D., Mao X., Suenaga T., Fujishima T., Zhang C.M., Liu Z.P. (2014). Synthesis and biological evaluation of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analogues with aromatic side chains attached at C-17. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 85:569-75.
- [207] Díaz G.D., Paraskeva C., Thomas M.G., Binderup L., Hague A. (2000). Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D<sub>3</sub> and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. *Cancer Res.* 60(8):2304-2312.
- [208] Jones G., Prosser D.E., Kaufmann M. (2014). Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin D: Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J. Lipid Res.* 55:13-31.
- [209] Eelen G., Verlinden L., De Clercq P., Vandewalle M., Bouillon R., Verstuyf A. (2006). Vitamin D Analogs and Coactivators. *Anticancer Res.* 26:2717–2721.
- [210] Luo W., Hershberger P.A., Trump D.L., Johnson C.S. (2013). 24-Hydroxylase in cancer: impact on vitamin D-based anticancer therapeutics. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* 136:252–257.
- [211] Uskokovic M.R., Norman A.W., Manchand P.S., Studzinski G.P., Campbell M.J., Koeffler H.P. (2001). Highly active analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) that resist metabolism through C-24 oxidation and C-3 epimerization pathways. *Steroids.* 66:463–471.
- [212] Diesel B., Radermacher J., Bureik M., Bernhardt R., Seifert M., Reichrath J., Fischer U., Meese E. (2005). Vitamin D<sub>3</sub> metabolism in human glioblastoma multiforme: Functionality of CYP27B1 splice variants, metabolism of Calcidiol, and effect of Calcitriol. *Clin. Cancer Res.* 11:5370–5380.
- [213] Garcion E., Wion-Barbot N., Montero-Menei C.N., Berger F., Wion D. (2002). New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol. Metab.* 13:100–105.
- [214] Anderson M.G., Nakane M., Ruan X., Kroeger P.E., Wu-Wong J.R. (2006). Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57:234–240.
- [215] Skowronski R.J., Peehl D.M., Feldman D. (1993). Vitamin D and prostate cancer: 1 $\alpha$ , 25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinol.* 132:1952–1960.

- [216] Scaranti M., de Castro Júnior G., Hoff A.O. (2016). Vitamin D and cancer: does it really matter?. *Curr. Opin. Oncol.* 28(3):205-209.
- [217] Fermento M.E., Gandini N.A., Salomón D.G., Ferronato M.J., Vitale C.A., Arévalo J., López Romero A., Nuñez M., Jung M., Facchinetti M.M., Curino A.C. (2014). Inhibition of p300 suppresses growth of breast cancer. Role of p300 subcellular localization. *Exp. Mol. Pathol.* 97:411-424.
- [218] Huet T., Laverny G., Ciesielski F., Molnár F., Ramamoorthy T.G., Belorusova A.Y., Pierre A., Potier N., Metzger D., Moras D., Rochel N. (2015). A vitamin D receptor selectively activated by gemini analogs reveals ligand dependent and independent effects. *Cell Rep.* 10:516–526.
- [219] Perrin D.D., Armarego W.L.F. y Perrin D.R. (1996). Purification of Laboratory Chemicals, 4<sup>ta</sup> Ed., Butterworth-Heinemann.
- [220] Liaw D.J., Huang C.C., Kang E.T. (2006). Novel fluorescent polynorbornenes with multi-functional armed structure by using highly stable block macroinitiators via a combination of living ring-opening metathesis polymerization and atom transfer radical polymerization. *Polymer.* 47:3057-3064.
- [221] Taylor R.J.K.. (1995). Organocopper Reagents, A practical approach. Oxford University Press.
- [222] Dorn V.B. (2007). Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, p. 129.
- [223] Urtreger A., Ladeda V., Puricelli L., Rivelli A., Vidal M.C.C., Sacerdote de Lustig E., Bal de Kier Joffé E. (1997). Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated to the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *Int. J. Oncol.* 11:489–496.
- [224] Wang L., Shen W. (1999). The Stille Reaction of 1,1-Dibromo-1-alkenes: Preparation of Trisubstituted Alkenes and Internal Alkynes. *J. Org. Chem.* 64:8873-8879.
- [225] Zerwekh J.E. (2004). The measurement of vitamin D: analytical aspects. *Ann. Clin. Biochem.* 41:272–281.
- [226] Wade, L.G. (2011). Química Orgánica. 5<sup>ta</sup> Ed., Whitman College.
- [227] Sharabani H., Izumchenko E., Wang Q., Kreinin R., Steiner M., Barvish Z., Danilenko M. (2006). Cooperative antitumor effects of vitamin D<sub>3</sub> derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia. *Int. J. Cancer.* 118(12):3012-3021.
- [228] Petit V., Boyer B., Lentz D., Turner C.E., Thiery J.P., Vallés A.M. (2000). Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *J. Cell Biol.* 148(5):957-970.

- [229] MarvinSketch v.6.31, ChemAxon Ltd., <http://www.chemaxon.com>
- [230] Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Rob M.A., Cheeseman J.R., et al. (2003). Gaussian 03.
- [231] Hawkins P.C., Nicholls A. (2012). Conformer generation with OMEGA: learning from the data set and the analysis of failures. *J. Chem. Inf. Model.* 52(11):2919-2936.
- [232] Fred.3.0.0 OpenEye.Scientific.Software, Santa Fe, NM, <http://www.eyesopen.com>
- [233] McGann M. (2011). FRED pose prediction and virtual screening accuracy. *J. Chem. Inf. Model.* 51(3):578-596.
- [234] McGann M. (2012). FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets. *J. Comp. Aided Mol. Des.* 26(8):897-906.
- [235] VIDA.4.2.1. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM <http://www.eyesopen.com>
- [236] Laskowski R.A., Swindells M.B. (2011). LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery.
- [237] Case D.A., Berryman J.T., Betz R.M., Cerutti D.S., Cheatham I.T.E., Darden T., et al. (2015). AMBER 2015, University of California, San Francisco.
- [238] Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C. (2013). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 3(2):198-210.
- [239] Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* 25(9):1157-1174.
- [240] Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* 11:3696–3713.
- [241] Miller B.R., McGee T.D.Jr., Swails J.M., Homeyer N., Gohlke H., Roitberg A.E. (2012). MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* 8:3314–3321.
- [242] Kuhn B., Gerber P., Schulz-Gasch T., Stahl M. (2005). Validation and use of the MM-PBSA approach for drug discovery. *J. Med. Chem.* 48:4040–4048.
- [243] Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14:33–38.

# **SELECCIÓN DE ESPECTROS**

